



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y**  
**MICROBIOLOGÍA**

Riesgo Reproductivo por Exposición a  
Disruptores Endocrinos: Identificación de  
Marcadores Predictivos de Anomalías Cromosómicas  
en Embriones y en Espermatozoides de  
Parejas Sometidas a Tratamientos de  
Reproducción Asistida.

**D<sup>a</sup> Inmaculada Concepción Campos Galindo**  
2016



A  
A  
m i l  
s a  
d i  
u n  
d c  
a o  
n  
d m  
i e  
c t  
i ó  
d o  
i n  
c a  
a l  
e  
s



# ÍNDICE



<b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
1. EXPOSICIÓN AMBIENTAL E INFERTILIDAD.....	15
2. ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS Y SU RELACIÓN.....	16
CON LA INFERTILIDAD.....	18
3. DISRUPTORES ENDOCRINOS.....	18
3.1. Generalidades. Aproximación histórica. Definición.....	20
3.2. Cinética: dosis/respuesta .....	20
3.3. Efecto cóctel.....	20
3.4. Ventana de susceptibilidad a la exposición.....	21
4. DISRUPTORES ENDOCRINOS E INFERTILIDAD .....	21
5. BPA .....	23
6. FTALATOS .....	25
7. PARABENOS.....	27
8. FITOESTRÓGENOS.....	28
9. NICOTINA Y TABAQUISMO.....	30
10. CAFEÍNA.....	30
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	41
2. LUGARES DE EJECUCIÓN .....	41
3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	41
3.1. Pacientes .....	41
3.2. Donantes femeninas .....	42
3.3. Donantes masculinos.....	43
4. MATRICES BIOLÓGICAS .....	44
4.1. Protocolos de recogida de las muestras .....	44
4.2. Orina .....	46
4.3. Semen .....	46
4.4. Líquido folicular .....	47
4.5. Biopsia embrionaria: arrays de CGH.....	47
5. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	48
5.1. Estimación de estilo de vida y factores de riesgo .....	48
5.2. Análisis de niveles de disruptores endocrinos mediante UPLC/ESI-MS .....	49
5.3. Análisis cromosómico de espermatozoides mediante FISH para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y .....	51
5.4. Análisis de aneuploidías embrionarias: PGS .....	55
5.5. Análisis estadístico de los datos .....	59
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
1. RESULTADOS LAS DONANTES DE OVOCITOS .....	63
1.1. Estudio descriptivo .....	63
1.2. Análisis estadístico de los datos .....	72
2. RESULTADOS DE LOS DONANTES DE SEMEN .....	74
2.1. Estudio descriptivo .....	74
2.2. Análisis estadístico de los datos .....	86

3. RESULTADOS DE LAS PACIENTES FEMENINAS .....	90
3.1. Estudio descriptivo .....	90
3.2. Análisis estadístico de los datos .....	99
4. RESULTADOS DE LOS PACIENTES MASCULINOS.....	101
4.1. Estudio descriptivo .....	101
4.2. Análisis estadístico de los datos .....	110
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
1. SOBRE EL DISEÑO DEL ESTUDIO.....	113
2. SOBRE LA METODOLOGÍA.....	113
3. SOBRE LOS RESULTADOS.....	117
4. LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO.....	127
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>153</b>

Anexo I: Informe del Comité Ético de Investigación Clínica.

Anexo II: Documentos de información para pacientes y donantes.

Anexo III: Consentimiento informado.

Anexo IV: Cuestionario.

Anexo V: Descripción del estilo de vida de pacientes y donantes.

## AGRADECIMIENTOS

*Ningún jugador es tan bueno como todos juntos.*  
D. Alfredo Di Stéfano

Cuando la línea de investigación elegida es de carácter multidisciplinar, la colaboración de un gran número de personas es imprescindible; de ahí que quiera expresar mi profundo agradecimiento a todos y cada uno de los que han contribuido en alguna medida a la elaboración de esta tesis doctoral y han compartido conmigo lo más valioso que tenemos: el tiempo.

A la Dra. Carmen Rubio, directora de esta tesis. Pilar básico en mi formación científica, tanto por su profesionalidad, como por su calidad humana. Por haber confiado en mí, por sus consejos y por su paciencia constante.

Al Dr. Francisco Domínguez, codirector de esta tesis. Por haber creído en el proyecto desde el principio, por alentarme a realizarlo y por brindarme todo su apoyo.

Al Dr. Carlos Simón, director científico de IGENOMIX. Por permitirme realizar este proyecto.

A la Dra. Carmina Vidal. Por involucrarse, por aportar ilusión y por su compromiso con el reclutamiento de pacientes.

A la Dra. Pilar Alamá, a Rocío Rivera y a Victoria Fernández. Por su esforzada labor en el reclutamiento de donantes.

Al equipo de FIV del IVI-Valencia. Por su colaboración y por su amable disposición.

A mis compañeros del Laboratorio de DGP Cromosómico. Por su rigor en la realización de los casos de PGS.

A Vanessa Peinado, a Tantra Martínez y a Asunción Martínez por su inestimable ayuda con la evaluación de la FISH espermatozoides.

Al Dr. Nicolás Garrido. Por disponibilidad, por su generosidad al compartir sus conocimientos y por su valiosa ayuda en los análisis estadísticos.

A Alfredo Navarro. Por su cuidadoso trabajo en el análisis de los datos.

Al Dr. Jose Landeras, director del IVI-Murcia y a Mari Carmen Martínez-Romero.  
Por acogerme en su equipo, guiar mi carrera y permitirme cumplir un sueño.

A todos los profesionales del IVI-Murcia, los que están y los que les precedieron. Por haber  
por haber contribuido a mi formación haciéndome partícipe de sus conocimientos y  
experiencia y, por continuar regalándome su cariño.

Al Dr. José Antonio Gabaldón y a Isabel Guillén. Por darme mi primera oportunidad laboral y  
por su afecto.

A mi madre. Por inculcarme el valor del esfuerzo y la perseverancia.

Al Dr. José Vicente Campos, mi padre. Por enseñarme que la medicina es ciencia y  
humanismo.

A Jose. Por seguir llevándome de la mano, por ser la voz de mi conciencia y mi amigo del alma.  
A Belén. Por entenderme. A María. Por estar siempre a mi lado, hacerme feliz y dar luz a mi  
vida como nadie.

A mis amigos. Por hacerme sonreír.

Por último, a los pacientes, quienes pasan por un duro proceso. Por confiar en nuestro talento  
y convertirnos en depositarios de sus esperanzas. Principalmente, a ellos es a quienes está  
dedicado este trabajo.

A todos, gracias.

# RESUMEN



Sabemos que el periodo preconcepcional, periconcepcional y el embarazo son etapas altamente sensibles a los agentes externos. Recientemente, se ha sugerido que ciertos compuestos químicos incluidos en la composición de productos de uso cotidiano, podrían influir en la salud reproductiva de hombres y mujeres. Nuestro objetivo en esta tesis doctoral es determinar una posible asociación entre los niveles corporales de estos compuestos y el resultado del tratamiento de reproducción asistida realizado. Para ello hemos medido los niveles urinarios y en líquido folicular o plasma seminal de ciertos tóxicos ambientales, con capacidad conocida para la disrupción endocrina (BPA, parabenos, ftalatos, metabolitos de la soja, cafeína y nicotina), con la intención de relacionarlos con las aneuploidías encontradas en embriones y espermatozoides y con los resultados reproductivos de parejas con aborto de repetición (AR), fallo repetido de implantación (FI) y factor masculino severo (FM), que se realizan un tratamiento con diagnóstico genético preimplantacional (DGP) para el cribado de aneuploidías mediante arrays de CGH. Se han incluido 10 parejas infértiles por alguna de las indicaciones arriba mencionadas. Se han comparado los resultados obtenidos con un grupo control femenino formado por 31 donantes fértiles de nuestro programa de donación de ovocitos y un grupo control masculino de 25 donantes fértiles de semen. Pacientes y controles han completado un cuestionario para evaluar su estilo de vida y su exposición potencial a diferentes tóxicos ambientales. La medida de los disruptores endocrinos se ha realizado mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI/MS). La determinación de las aneuploidías en espermatozoides se ha valorado mediante FISH y las aneuploidías en embriones mediante arrays de CGH. En nuestro estudio se observaron mayores niveles de disruptores endocrinos en las donantes de ovocitos en comparación con los donantes de semen. Además, se detectaron mayores niveles de disruptores endocrinos en nuestro grupo de pacientes con alto riesgo de aneuploidía, en comparación con los grupos control de donantes de fertilidad probada, destacando mayores niveles de BPA, m-Parabenos y cafeína en pacientes. En las donantes femeninas, se observó disminución de la respuesta ovárica tras exposición a químicos en el lugar de trabajo, y mayor respuesta con el consumo de soja y cafeína. En los donantes masculinos, el mayor consumo de soja se asoció tanto a disminución de la movilidad espermática como a un aumento de aneuploidías en espermatozoides. El m-Parabeno se asoció con disminución de la movilidad y el p-Parabeno con aumento de disomías de cromosomas sexuales en espermatozoides. Dentro de las parejas infértiles, en las mujeres observamos una tendencia a mayor porcentaje de aneuploidias embrionarias a mayor consumo de cafeína y menor concentración de BPA. Sin embargo, en los varones observamos una tendencia a mayor porcentaje de aneuploidias embrionarias en los varones con mayor concentración de BPA. En la evaluación de la pareja infértil destacamos la necesidad de considerar la influencia de la exposición ambiental a disruptores endocrinos como un factor determinante para el resultado del tratamiento de reproducción asistida.

We know that the preconception period, periconception period, and pregnancy are highly sensitive to external agents. Recently, it has been suggested that certain chemical compounds included in the composition of everyday use products could affect the reproductive health of men and women. Our goal is to determine a possible association between the body levels of these compounds and compare them with the outcome of the assisted reproduction treatment performed. In order to achieve our objective, we have measured certain environmental toxics with acknowledged capacity for endocrine disruption (BPA, parabens, phthalates, metabolites of soy, caffeine, and nicotine) in urine, follicular fluid or seminal plasma to correlate them with aneuploidies found in embryos and sperm and reproductive outcomes of couples with recurrent miscarriage (RM), repetitive implantation failure (RIF), and severe male factor (MF) who underwent a treatment with preimplantation genetic diagnosis (PGD) for aneuploidy screening by CGH arrays. We included 10 infertile couples who suffered any of the above mentioned indications. We compared the patients results with a female control group of 31 fertile donors included in our oocyte donation program, and a control group of 25 fertile male sperm donors. Patients and controls answered a questionnaire to assess their lifestyle and potential exposure to different environmental toxics. The assessment of endocrine disruptors was carried out using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-ESI/MS). The determination of aneuploidy in sperm was assessed by FISH, and the aneuploidy in embryos was performed using CGH arrays. In our study, higher levels of endocrine disruptors were found in oocyte donors compared to sperm donors. In addition, higher levels of endocrine disruptors such as BPA, m-paraben and caffeine were detected in our group of patients at high risk of aneuploidy compared with our tested fertility donors (control group). In the female donors decreased ovarian response was observed after exposure to chemicals at workplace, and a greater ovarian response was found with soy and caffeine consumption. In male donors, soy intake was associated with a decrease in sperm motility and an increase of aneuploid cells in sperm. The m-paraben was associated with decreased sperm mobility and p-paraben with increased disomies of sex chromosomes in sperm. Among infertile couples, women tend to have a higher percentage of embryo aneuploidy with caffeine consumption and a lower concentration of BPA. However, men tend to have a higher percentage of aneuploid embryos with highest BPA concentration. Finally, in the evaluation of the infertile couple we notice to consider the influence of environmental exposure to endocrine disruptors as a determinant factor for the outcome of assisted reproduction treatment.

# INTRODUCCIÓN



## 1. EXPOSICIÓN AMBIENTAL E INFERTILIDAD

La infertilidad se define como la incapacidad para concebir después de un año de relaciones sexuales sin protección y tiene una prevalencia global del 9% (Boivin *et al.*, 2007). Entre las parejas infértiles, se estima que en el 38% de los casos la causa es predominantemente femenina y en el 20% principalmente masculina, mientras que el 27% tiene etiología masculina y femenina, y no se ha identificado ninguna causa evidente en el 15% restante (infertilidad idiopática) (Bretveld *et al.*, 2007), a pesar del aumento de los conocimientos sobre la base fisiológica de la infertilidad.

Desde la mitad del siglo XX, numerosos estudios han reportado un aumento en la incidencia de enfermedades de la reproducción humana y la consiguiente disminución de la función reproductiva en todo el mundo (Woodruff *et al.*, 2011). Dado el corto período de tiempo en el que se ha producido este empeoramiento de la capacidad reproductiva, difícilmente esto puede ser explicado por cambios genéticos, por lo que se piensa que exposiciones a ciertos compuestos relacionados con el desarrollo industrial podrían ser responsables de estas tendencias (Woodruff *et al.*, 2008; Balabanic *et al.*, 2011).

El elevado número de compuestos químicos al que estamos expuestos, la variedad de sus posibles efectos adversos y la incertidumbre sobre sus consecuencias clínicas, han generado una preocupación razonable en científicos, y en una gran parte del resto de la sociedad (Porta *et al.*, 2002; Weinhold *et al.*, 2003; Stokstad *et al.*, 2004; Porta *et al.*, 2006). Actualmente, existe un gran interés en la determinación de los efectos sobre la salud del ser humano de una amplia gama de exposiciones ambientales experimentadas a lo largo de la vida. El *exposoma* se compone de cada exposición a la que un individuo se somete desde la concepción hasta la muerte (Wild *et al.*, 2012). El concepto de exposoma se desarrolló para llamar la atención sobre la necesidad de una evaluación más completa de la exposición ambiental en estudios epidemiológicos (Wild *et al.*, 2005; Wild *et al.*, 2009; Wild *et al.*, 2011; Rappaport *et al.*, 2010) definiéndose el entorno en el sentido amplio de la *no-genética*. El exposoma, por lo tanto, complementa el genoma, proporcionando una descripción completa de la historia de la exposición de toda la vida (Wild *et al.*, 2012). Se pueden considerar tres grandes categorías de exposiciones no genéticas: interna, externa específica y externa general (Figura 1) (Wild *et al.*, 2012). En primer lugar, el exposoma comprende procesos internos del cuerpo. Estas condiciones internas inciden sobre el medio ambiente celular. En segundo lugar, encontramos la amplia gama de exposiciones externas específicas que han sido el foco principal de los estudios epidemiológicos y que tratan de vincular los factores ambientales con el riesgo de cáncer. En tercer lugar, el exposoma incluye las influencias sociales, económicas y psicológicas

en el individuo. Aquí se engloban los determinantes sociales de la salud (Wild *et al.*, 2012). Hay una superposición en estos tres dominios y, a veces, dificultad en la colocación de una exposición particular en un dominio u otro (Wild *et al.*, 2012).

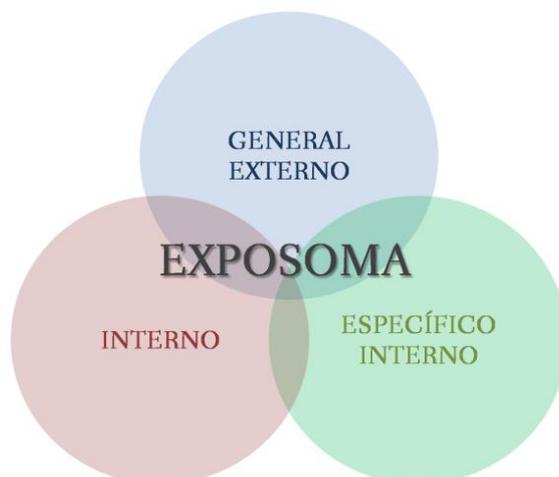


Figura 1: Dominios que comprende el exposoma.

## 2. ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD

Las aneuploidías son alteraciones cromosómicas comunes en los embriones humanos (Harper *et al.*, 1995; Munné *et al.*, 1998). Las trisomías y las monosomías representan al menos un 10% de las gestaciones humanas, y en mujeres cercanas al final de su vida reproductiva pueden superar el 50%. De hecho, la tasa de aneuploidías en los ovocitos y en los embriones es más elevada en mujeres de edad materna avanzada (EMA) (Hassold *et al.*, 1980) probablemente por defectos en la recombinación meiótica debidos a la edad (Lamb *et al.*, 1996). Estos efectos ligados a la edad resultan en una mayor incidencia de aneuploidías en la descendencia, en un incremento de abortos espontáneos y, por tanto, en una reducción de las tasas de implantación.

La presencia de aneuploidías también puede influir en otras parejas infértiles. Por ejemplo, se ha descrito como una de las causas más frecuentes de abortos en parejas con aborto recurrente (AR) (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2012). En parejas con fallo repetido de implantación (FI) el diagnóstico sigue siendo un desafío clínico ya que sus causas pueden ser múltiples, contribuyendo tanto el factor embrionario como el endometrial y se ha propuesto la presencia de aneuploidías como una de sus principales causas (Margalioth *et al.*, 2006). En parejas infértiles con un factor masculino (FM) severo asociado, se ha descrito una mayor incidencia de abortos con alteraciones cromosómicas de gestaciones conseguidas tras inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, del inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*) (Kim *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha descrito una mayor incidencia de anomalías

cromosómicas en los espermatozoides de varones infértiles debido a errores durante la meiosis (Rodrigo *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2001), lo que podría explicar estos resultados. Así, estudios citogenético-moleculares de restos fetales abortivos procedentes de gestaciones espontáneas muestran que el 40,6% presentan alteraciones cromosómicas. Esta incidencia incrementa al 62,7% en gestaciones conseguidas tras tratamientos de reproducción asistida (TRA) en pacientes infértiles con el uso de ovocitos propios, y alcanza el 72,7% cuando existe además un FM asociado (Campos-Galindo *et al.*, 2015) (Figura 2).

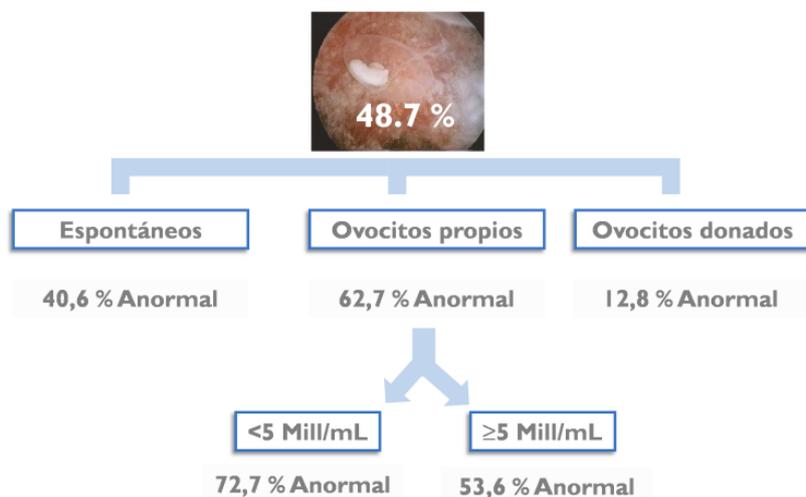


Figura 2: Incidencia de aneuploidías en restos fetales de gestaciones detenidas espontáneamente.

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) permite conocer el contenido genético y cromosómico de los embriones antes de ser transferidos al útero materno, sin afectar negativamente a su desarrollo o capacidad de implantación (Hardy *et al.*, 1990). Ha resultado de gran utilidad en parejas con elevado riesgo de transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia, y para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. A finales de los 90, esta tecnología empezó a aplicarse también como una herramienta adicional para la selección de embriones euploides en varios grupos de pacientes, consideradas como de *mal pronóstico* dentro de los centros de reproducción asistida. En estos casos, se ha denominado cribado genético preimplantacional (PGS, del inglés *Preimplantational Genetic Screening*). El PGS puede realizarse en diferentes estadios: tras biopsia del corpúsculo polar, biopsia embrionaria de una célula en día 3 de desarrollo, o biopsia de blastocisto con la obtención de varias células del trofoectodermo en día 5-6 de desarrollo. Tras la biopsia se aplican técnicas de biología molecular o de citogenética en función del tipo de alteración que interese evaluar. En los últimos 20 años, la tecnología utilizada para el estudio cromosómico ha cambiado a medida que se desarrollaban nuevas técnicas moleculares; mientras que en 1995 la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *Fluorescence in situ Hybridization*) se aplicaba principalmente en blastómeras y permitía el análisis de un número limitado de cromosomas, desde 2008 se comenzaron a utilizar los arrays de hibridación genómica comparada (aCGH,

del inglés *array Comparative Genomic Hybridization*), generalizándose su uso y han permitido el análisis de los 24 cromosomas, no sólo en célula única sino también en biopsia de blastocisto. Otras plataformas de análisis como las de SNP (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) y qPCR (del inglés, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) se han aplicado con éxito también en PGS en los últimos años (Handyside *et al.*, 2013).

### 3. DISRUPTORES ENDOCRINOS.

#### 3.1. Generalidades. Aproximación histórica. Definición.

En 1991, un grupo de científicos de más de una docena de disciplinas, convocado por la Dra. T. Colborn de la Fundación *World Wildlife*, se reunieron para discutir sobre las alteraciones del desarrollo observadas en poblaciones de vida silvestre después de la exposición a compuestos químicos. Allí, se estableció el término *disruptor endocrino* (DE) (Colborn y Clement, 1992) para describir una clase de productos químicos, incluidos los que actúan como agonistas y antagonistas de los receptores de estrógeno (RE), receptor de andrógenos (RA), receptor de la hormona tiroidea y otros (Vandenberg *et al.*, 2009). Desde esta reunión el término DE ha sido ampliamente aceptado en la comunidad científica (Vandenberg *et al.*, 2009).

En la actualidad, se estiman en más de 100.000 las sustancias químicas diferentes catalogadas en Europa para su uso comercial, y se registran cientos de sustancias nuevas cada año (Goldman *et al.*, 2002).

En el seminario europeo sobre el impacto de los DE en la salud humana y animal, que tuvo lugar en Weybridge (Reino Unido) en diciembre de 1996, se consensuó la primera definición general: *Sustancia química exógena que tiene efectos adversos para la salud de un organismo intacto o su descendencia, como consecuencia de cambios en la función endocrina*. La definición emitida por la Unión Europea (UE) en 2012, consistente con la definición de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria en 2013 (EFSA, del inglés *European Food Safety Agency*) establece que un DE es: *Sustancia exógena que causa efectos adversos a la salud en un organismo intacto, o su progenie, secundario a cambios en la función endocrina*.

Los DE pueden dividirse en compuestos naturales, tales como los fitoestrógenos de soja, extractos y fórmulas de varias plantas u hongos y, un amplio espectro de productos manufacturados e industriales (Hampl *et al.*, 2014). Estos últimos productos químicos comprenden los utilizados en la lucha contra la vida silvestre no deseada y las amenazas agrícolas (pesticidas, fungicidas, insecticidas y rodenticidas) o varios compuestos sintéticos

como son las sustancias utilizadas en la producción de plásticos y plastificantes, materiales de embalaje, o una amplia gama de productos químicos industriales utilizados como materiales de construcción, pinturas y materiales de aislamiento (Hampl *et al.*, 2014). Los DE también incluyen muchos medicamentos derivados de las hormonas naturales, en particular todos los anticonceptivos (Hampl *et al.*, 2014).

Los DE se diseñaron originalmente para una acción específica y actualmente se sabe que distorsionan los mecanismos hormonales del cuerpo y producen efectos secundarios cuando son absorbidos porque mimetizan, desplazan, antagonizan, bloquean o incluso amplifican los procesos vitales que se rigen por las hormonas endógenas perturbando la fisiología normal del cuerpo (Martina *et al.*, 2012; Schug *et al.*, 2011). Esta disrupción puede ocurrir alterando los niveles hormonales normales, inhibiendo o estimulando la producción y metabolismo de las hormonas o cambiando la forma en que las hormonas se transportan por el cuerpo e incluso afectando a las funciones que esas hormonas controlan a través de mecanismos de acción diversos (Martina *et al.*, 2012; Schug *et al.*, 2011) (Figura 3).

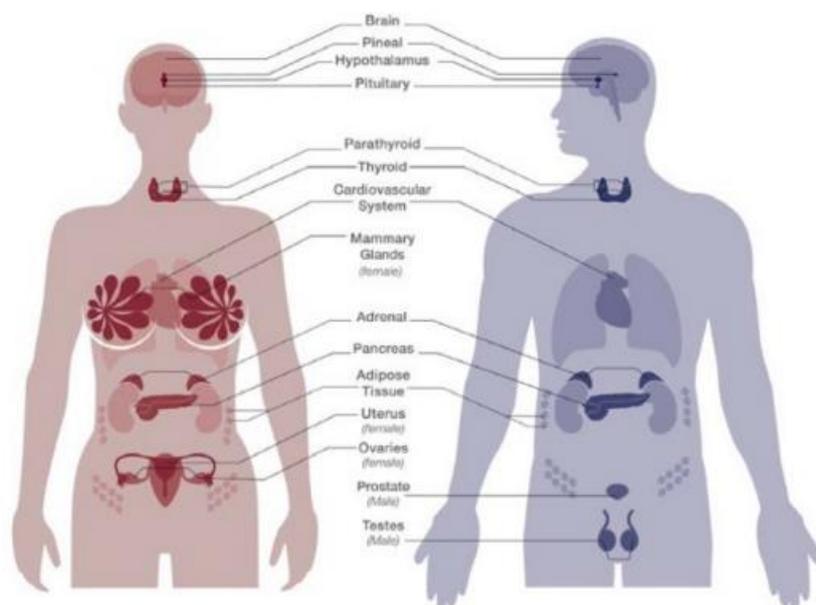


Figura 3: Principales glándulas de sistema endocrino de una mujer (rojo) y de un hombre (azul).  
<http://www.slideshare.net/isaco153/introduction-to-endocrine-disrupting-chemicals-1>

Los DE son omnipresentes se encuentran en los alimentos, en el hogar y en los productos de cuidado personal. La exposición a los DE en el medio ambiente es compleja. Aunque las restricciones en el uso de sustancias tóxicas, se han aplicado en algunos países, algunos DE y sus derivados pueden todavía ser ampliamente detectados en el medio ambiente (Knez *et al.*, 2013). La población, en general, está expuesta a DE a través de la ingestión de alimentos contaminados, la inhalación de aire y polvo contaminado, y el contacto con la piel, mientras

que algunas zonas están sometidas a mayor riesgo debido a razones geográficas y culturales (Nash *et al.*, 2004).

### 3.2. Cinética: dosis/respuesta

Los DE incluso a dosis extremadamente bajas pueden tener profundos efectos en los organismos expuestos. Durante muchos años, al evaluar los efectos tóxicos de los posibles DE, los toxicólogos se han basado en el principio de que *la dosis hace el veneno* (Paracelso, 1493 - 1541), *nada es inocuo, todo es veneno; sólo la dosis hace la diferencia*, lo que implica que se espera que las dosis más altas causen mayor daño, esto es, efectos directamente proporcionales a la dosis ingerida (curva monótonica) (Vandenberg *et al.*, 2009) por lo tanto, los efectos que no se ven a dosis elevadas no se esperan a dosis bajas (Vandenberg *et al.*, 2009). Este modelo identifica una dosis segura mediante la evaluación de diferentes dosis de una sustancia química hasta que se determina el nivel sin efecto observable (NOEL) (del inglés, *No-Observed-Effect Level*). Se ha sugerido que, similar a las hormonas, los DE tienen una curva de respuesta bifásica, en forma de U, con altas respuestas a bajos y altos niveles de exposición, o de U invertida a la dosis, con las mayores respuestas a dosis intermedias (Conolly y Lutz, 2004; Calabrese y Baldwin, 2001) es decir, curva de dosis respuesta no monotónicas (NMDRs, del inglés *Non-Monotonic-Dose-Response*), es decir, dosis muy bajas podrían tener efectos significativos sobre la proliferación celular o el desarrollo (Schug *et al.*, 2011).

### 3.3. Efecto cóctel

Las mezclas de DE pueden dar lugar a efectos combinados. El entorno no nos expone a DE específicos, sino a un cóctel complejo (Knez *et al.*, 2013). Generalmente, se cree que las sustancias estrogénicas (hormonas y DE) actúan de manera aditiva, lo que significa que los efectos de las mezclas se pueden predecir por la concentración de cada sustancia y la afinidad de unión relativa al receptor estrogénico (Howdeshell *et al.*, 2008; Sun, Zha y Wang, 2009). Sin embargo, se ha demostrado recientemente que algunos DE en determinadas concentraciones pueden también actuar en antagonismo competitivo sobre los receptores de estrógeno (Li *et al.*, 2012). Por otra parte, la complejidad de los mecanismos involucrados en las acciones químicas que provocan perturbaciones endocrinas significa que sus efectos sobre la salud pueden ser el resultado de la acción a través de múltiples vías, que podría dar lugar a efectos mayores que el aditivo (Kortenkamp *et al.*, 2007). Tales interacciones podrían incluso permitir que las sustancias que no producirían ningún efecto por sí mismas, podrían producir efectos significativos en las concentraciones presentes ambientalmente (Christiansen *et al.*, 2012).

### 3.4. Ventana de susceptibilidad a la exposición

El período en que se produce la exposición a DE es crucial para su toxicidad. La evidencia sugiere que la exposición temprana a ciertos productos químicos tóxicos puede asociarse directamente con aumentos en las tasas de muchas de las enfermedades humanas más comunes y las enfermedades que más han crecido en los últimos 20 años, incluyendo el asma, los problemas de aprendizaje y de conducta, la pubertad temprana, la infertilidad, el cáncer de mama y de próstata, la enfermedad de Parkinson, y la obesidad, entre otras enfermedades (Yaoi *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2009; Novikova *et al.*, 2008).

En el campo de la disrupción endocrina se ha acuñado el principio de *las bases fetales de la enfermedad adulta* o FeBAD (del inglés, *Fetal Basis of Adult Disease*) para describir las interacciones entre el desarrollo del organismo y el ambiente que determinan la propensión de ese individuo a desarrollar una enfermedad más tarde (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Este concepto se ha extendido más allá del período fetal para incluir el periodo de desarrollo postnatal temprano cuando los órganos continúan viviendo un desarrollo sustancial.

El periodo de desarrollo durante el que se produce la exposición a los DE es un factor crítico en cuanto a las consecuencias para la salud. Aunque la exposición adulta puede causar daños, la exposición de fetos y bebés es aún más relevante, ya que la susceptibilidad a los efectos adversos de los DE es mucho más alta durante estos períodos. Estos efectos dañinos durante los períodos de desarrollo pueden ocurrir con la exposición a dosis mucho más bajas que las que se consideran perjudiciales para adultos (Schug *et al.*, 2011). Las razones de este aumento de la sensibilidad pueden ser explicadas por la falta de mecanismos de protección, en general, presentes en los adultos, como el mecanismo de reparación del ADN, la presencia de enzimas detoxificantes eficientes, la madurez del hígado que permite el aclaramiento sérico de los compuestos químicos, y la protección de la barrera hematoencefálica. En consecuencia, el período en que se produce la exposición a DE tiene un papel crucial en su toxicidad (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

## 4. DISRUPTORES ENDOCRINOS Y INFERTILIDAD

Los DE imitan la acción de las hormonas (Schiffer *et al.*, 2014) que intervienen en la concepción humana y el desarrollo (Vandenberg *et al.*, 2012), a través de la alteración de los procesos mediados por estrógenos o andrógenos por lo que se han relacionado con efectos adversos en la reproducción humana como la disminución de las tasas de fecundidad en el mundo occidental (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Bergman *et al.*, 2013), el cáncer de

testículo y la infertilidad generalizada (Carlsen *et al.*, 1992; Skakkebaek *et al.*, 2001; Bergman *et al.*, 2013; Mortimer *et al.*, 2013).

El papel central de los estrógenos en el sistema reproductivo ha llevado a la sugerencia de que las exposiciones ambientales a compuestos que imitan los efectos biológicos de estradiol son una causa subyacente de los trastornos de la reproducción, de la alta incidencia de enfermedades relacionadas con las hormonas y del cáncer en la población occidental (Byrne *et al.*, 2009).

Los estrógenos son una familia de hormonas esteroides producidas por la modificación enzimática del colesterol y que se sintetizan en diferentes tejidos, pero durante los años reproductivos de la mujer se producen principalmente en los ovarios (Byrne *et al.*, 2009). Los estrógenos tienen efectos sobre muchos niveles de organización biológica, desde la totalidad del individuo a los sistemas de órganos, células y la expresión génica. El principal estrógeno sintetizado en las mujeres durante los años fértiles es el  $17\beta$ -estradiol o estradiol (E2) que deriva de la testosterona por acción de la actividad aromatasa (Schug *et al.*, 2011). Los DE imitan los efectos biológicos de estradiol.

Inicialmente se pensó que los DE ejercían su función únicamente a través de receptores nucleares, incluyendo RE, receptores de progesterona, receptores de hormonas tiroideas y receptores retinoides entre otros (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Sin embargo, actualmente se sabe que los mecanismos por los que actúan los DE son mucho más amplios que los inicialmente identificados lo que lleva a una increíble diversidad y complejidad de acción. De hecho, además de alterar la señalización de los receptores nucleares, los DE son capaces de actuar a través de receptores no esteroides, a través del reclutamiento de coactivadores o correpressores transcripcionales, a través de rutas enzimáticas implicadas en la biosíntesis y metabolismo esteroides, a través de la modificación del aclaramiento plasmático, o actuando directamente sobre la expresión génica por medio de modificaciones epigenéticas y otros numerosos mecanismos que convergen en los sistemas endocrinos y reproductivos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2010; Schug *et al.*, 2011).

La mayoría de los DE actúan a nivel de tejido somático e influyen en la fisiología del organismo expuesto (Skinner, 2011) pero en algunos casos promueven una transmisión a través de sucesivas generaciones (Schug *et al.*, 2011). Este mecanismo de transmisión implica modificaciones epigenéticas de la línea germinal, como cambios en la metilación del ADN y la acetilación de histonas (Schug *et al.*, 2011). Estos efectos son particularmente problemáticos porque las alteraciones en la programación genética durante las etapas tempranas del

desarrollo pueden tener profundos efectos años más tarde y pueden llevar a una herencia transgeneracional de una enfermedad (Skinner, 2011; Costa *et al.*, 2014). Un ejemplo clásico de efecto epigenético secundario a los DE se demostró después de la exposición de mujeres embarazadas a dietilestilbestrol (DES), utilizado para prevenir abortos involuntarios en los 50s y 60s (Newbold *et al.*, 2000; Newbold *et al.*, 2008). Se observó que los fetos femeninos expuestos en el primer trimestre del embarazo tuvieron una mayor incidencia de la infertilidad en la vida adulta, y una mayor incidencia de carcinoma vaginal de células claras (Herbst, Ulfelder y Poskanzer, 1971; Barclay, 1979), disminución de la fertilidad, aumento de las tasas de embarazo ectópico (Goldberg *et al.*, 1999), y menopausia precoz (Hatch *et al.*, 2006). Se observó una mayor incidencia de trastornos de la reproducción en la segunda generación de estas mujeres expuestas al DES en el útero, lo que sugería que los cambios epigenéticos podían ser transmitidos a las generaciones posteriores (Christensen y Marsit, 2011). Como Newbold señalaba, *lo aprendido con el DES en los seres humanos y los animales es que el feto femenino es susceptible de anomalías reproductivas inducidas por factores ambientales, que la organogénesis gonadal es sensible a las hormonas sintéticas e imitadores hormonales durante las ventanas de exposición críticos, y que la enfermedad reproductiva puede no aparecer sino hasta décadas después de la exposición* (Newbold *et al.*, 2004).

## 5. BISFENOL A

El bisfenol A (BPA) [2, 2-bis(4-hidroxifenil) propano] es un monómero químico ampliamente ubicuo (Carwile *et al.*, 2009; Lopez-Cervantes y Paseiro-Losada, 2003) utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato (Brede *et al.*, 2003; Carwile *et al.*, 2009), resinas epoxi y revestimientos de latas de alimentos y bebidas (Bae, Jeong, y Lee, 2002; Carwile *et al.*, 2011) (Figura 4).

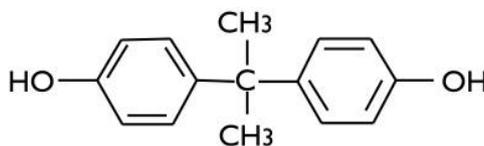


Figura 4: Estructura química del BPA.

Está presente en una amplia variedad de productos (Vandenberg *et al.*, 2013) como biberones y tuberías de suministro de agua, envases de alimentos, equipos médicos (Sasaki *et al.*, 2005; Joskow *et al.*, 2006), discos compactos, electrónica de consumo, papel de copia sin carbón, papel térmico y muchos otros productos (vom Saal y Myers, 2008; Biedermann, Tschudin, y Grob, 2010; Knez *et al.*, 2013; Vandenberg *et al.*, 2007; Geens *et al.*, 2012; Welshons, Nagel, y vom Saal, 2006; Carwile *et al.*, 2009; Rathee, Malik, y Singh, 2012; Vandenberg *et al.*, 2009;

Shelby, 2008). Estudios adicionales han demostrado que el BPA se puede encontrar en muestras de polvo, aire interior y exterior, lixiviados de aguas residuales, y muestras de agua de todo el mundo (Vandenberg *et al.*, 2007).

La ingestión está considerada la principal vía de exposición al BPA en los seres humanos (Kang, Kondo y Katayama, 2006; Geens, 2012). La exposición se cree que se produce principalmente a través lixiviación del BPA de los materiales de embalaje en los productos alimenticios (Vandenberg *et al.*, 2013). El BPA con el tiempo se degrada en su forma monomérica y algunas de estas moléculas pueden migrar y contaminar alimentos y bebidas (Costa *et al.*, 2014), proceso que puede acelerarse por la exposición al calor (Brede *et al.*, 2003; Robeson, 1985) o por altos o bajos niveles de pH (Fernandez y Russo, 2010). Sin embargo, varios autores sugieren que rutas alternativas, como la inhalación o la absorción transdérmica, pueden estar siendo subestimados como fuentes de exposición (Stahlhut, Welshons y Swan, 2009; Vandenberg *et al.*, 2013). Como resultado de la utilización generalizada de este producto la exposición humana a BPA es general y continua (Vandenberg *et al.*, 2007; Harthe *et al.*, 2012), por tanto, es concebible que el BPA se detecte en más de 90% de las muestras de orina procedentes de diferentes poblaciones de referencia y esté presente en la mayoría de las muestras biológicas como suero (Vandenberg *et al.*, 2007), suero de mujeres embarazadas (Schonfelder *et al.*, 2002), leche materna (Kuruto-Niwa *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2004), líquido amniótico (Ikezuki *et al.*, 2002), líquido folicular (Ikezuki *et al.*, 2002), sangre de cordón umbilical, tejido placentario (Schonfelder *et al.*, 2002; Vandenberg *et al.*, 2007), hígado fetal (Nahar *et al.*, 2013), así como en plasma seminal (Inoue *et al.*, 2002; Kaddar *et al.*, 2009). Los niveles relativamente altos de BPA en el suero de las mujeres embarazadas, la sangre del cordón umbilical, y el plasma fetal (Vandenberg *et al.*, 2007) indican que el BPA atraviesa la barrera placentaria materno-fetal (Mahalingaiah *et al.*, 2008).

Los estudios farmacocinéticos han documentado que el BPA ingerido es absorbido rápidamente en el tracto gastrointestinal, conjugado con el ácido glucurónico, metabolito formado en el hígado (Volkel *et al.*, 2002), y luego se excreta por la orina, con tasa de aclaramiento metabólico (vida media biológica) de ~6h (Volkel *et al.*, 2002; Volkel, Bittner y Dekant *et al.*, 2005) con la excreción urinaria casi completa en 24h (Volkel *et al.*, 2002; Volkel, Bittner y Dekant, 2005). La forma BPA glucurónido-conjugado carece de actividad hormonal, sin embargo, la forma no conjugada, es estrogénicamente activa (Callan *et al.*, 2013).

El BPA se considera un DE con toxicidad reproductiva (Vandenberg *et al.*, 2009; Maffini *et al.*, 2006) con una afinidad débil para los RE (Welshons *et al.*, 2003). En estudios *in vitro* y

ensayos bioquímicos se ha demostrado que el BPA puede interactuar con ambos subtipos de receptores de estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ), con aproximadamente 10 veces mayor afinidad para RE $\beta$ . No obstante, la afinidad de BPA por los receptores estrogénicos, es baja cuando se compara con E2, situándose en un orden de 10.000 a 100.000 veces menos potente. Sin embargo, estudios sobre los mecanismos de acción de BPA a bajas concentraciones, han revelado que BPA puede desencadenar toda una batería de respuestas estrogénicas celulares de igual o mayor eficacia y potencia que el propio E2 (Welshons *et al.*, 2003; Welshons, Nagel y vom Saal *et al.*, 2006). También puede exhibir inhibición competitiva en presencia de E2 mediante el bloqueo de la unión del estrógeno natural a los RE para ejercer efectos antiestrogénicos (Gould *et al.*, 1998; Kuiper y Gustafsson, 1997; Li *et al.*, 2012; Richter *et al.*, 2007; Wetherill *et al.*, 2007; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2007). Por otro lado, el BPA interfiere con la producción (Roy *et al.*, 2004; Paris *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Akingbemi *et al.*, 2004) y la función de andrógenos (Akingbemi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2004) y se ha demostrado *in vitro* que puede unirse directamente a los RA, y posiblemente puede actuar como antagonista del receptor de andrógenos (efecto antiandrogénico) (Wetherill *et al.*, 2007; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2007; Kitamura *et al.*, 2005; vom Saal *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2007). También se ha descrito que tiene la capacidad de afectar a la función de las células de Sertoli (Fiorini *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009; Salian, Doshi y Vanage, 2009).

El BPA se une a los receptores *clásicos* nucleares de estrógeno (Richter *et al.*, 2007; Wetherill *et al.*, 2007), así como a los receptores de estrógeno *no clásicos* asociados a la membrana (Luconi *et al.*, 1999; Wozniak, Bulayeva, y Watson, 2005). Al mismo tiempo, el BPA se une fuertemente a los receptores de la membrana celular y del receptor  $\gamma$  relacionados con el estrógeno (RRE $\gamma$ ) (Horard y Vanacker, 2003; Okada *et al.*, 2008).

Varias revisiones han estudiado la exposición humana al BPA y su relación con la enfermedad en adultos, encontrando una asociación con trastornos reproductivos tales como la endometriosis, la infertilidad, el síndrome de ovario poliquístico (SOP), y las enfermedades tiroideas (Rubin *et al.*, 2011; Maffini *et al.*, 2006; Rochester *et al.*, 2013). Además, parece que la exposición prenatal BPA en humanos podría estar relacionada con el parto prematuro, bajo peso al nacer, y la reducción de la circunferencia de la cabeza (Miao *et al.*, 2011, Snijder *et al.*, 2012).

## 6. FTALATOS

Los Diésteres de ácido 1,2-bencenodicarboxílico (ácido ftálico), comúnmente llamados ftalatos, suelen usarse como plastificantes y disolventes en envases de alimentos, cosméticos,

perfumes, lacas de uñas, revestimientos para suelos y otros productos industriales para mejorar la plasticidad de los polímeros industriales y están presentes en muchos productos de uso diario (Knez, 2013) tales como, juguetes, pinturas, adhesivos, lubricantes, envases de alimentos, materiales de construcción, artículos de cuidado personal como cosméticos, electrónica, dispositivos médicos como las bolsas de transfusión de sangre y, siendo una parte inevitable de la vida moderna (Shea *et al.*, 2003) (Figura 5). Los ésteres de ácido ftálico como ftalato de dibutilo (DBP) y dietil ftalato (DEP) se utilizan para retener olores en perfumes y administrar agentes en los aerosoles (Koo y Lee, 2004). El DBP ha mostrado efectos antiandrogénicos en ratas (Howdeshell *et al.*, 2008). Algunos ftalatos pueden tener actividad estrogénica muy débil (Harris *et al.*, 1997).

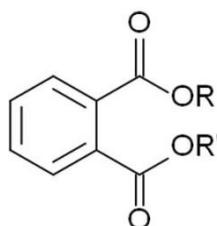


Figura 5: Estructura química de los ftalatos.

Los ftalatos tienen una vida media bastante corta en el medio ambiente con una degradación superior al 50% en 28 días, principalmente a través de la fotodegradación. Estos agentes están unidos no covalentemente a los plásticos lo que los hace susceptibles a la lixiviación de la matriz (Fromme *et al.*, 2013).

Como en el caso del BPA, los seres humanos estamos expuestos a los ftalatos por muchas rutas: oral, dérmica, por inhalación e incluso por vía subdérmica, y la ruta varía dependiendo del ftalato particular (Adibi *et al.*, 2003; Rudel *et al.*, 2003; Rudel y Perovich, 2009). Una vez consumidos los ftalatos son rápidamente metabolizados en el intestino, hígado y sangre mediante esterasas y lipasas (Hannon y Flaws, 2015). La exposición durante las primeras etapas de desarrollo puede ocurrir por vía transplacentaria y durante la lactancia. Los bebés y los niños pequeños son los receptores más vulnerables (Zoeller, 2006).

En los seres humanos, los ftalatos se han detectado en matrices tales como sangre, orina, saliva, líquido amniótico, leche materna y sangre de cordón (Latini *et al.*, 2003b; Main *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2005) e incluso en líquido folicular (Heudorf, Mersch-Sundermann, y Angerer, 2007; (NHANES) 1999-2000; Marsee *et al.*, 2006). Tras la exposición, los ftalatos se metabolizan y se excretan rápidamente en orina y heces.

Varios estudios etiquetan los ftalatos como agentes inocuos que no persisten en el ambiente y que muestran muy poca tendencia a bioacumularse. Sin embargo, es importante destacar que la masiva tasa de síntesis de los ftalatos podría reemplazar la tasa de eliminación natural dirigiendo a una eventual acumulación de estos químicos en el ambiente y por último, en los humanos (James-Todds *et al.*, 2012). Como los seres humanos pueden estar expuestos simultáneamente a varios ftalatos toda evaluación de los riesgos planteados por los ftalatos debe tener en cuenta los efectos combinados de todos ellos (Mankidy *et al.*, 2013).

Los ftalatos alteran la reproducción, producen daño en el esperma (Rozati *et al.*, 2002), inducen el inicio temprano de la pubertad en niñas (Wolff *et al.*, 2010), anomalías del tracto reproductivo (Desdoits-Lethimonier *et al.*, 2012), infertilidad (Rozati *et al.*, 2002; Tranfo *et al.*, 2013) y resultados adversos del embarazo (Latini *et al.*, 2003; Whyatt *et al.*, 2009), del desarrollo neurológico (Engel *et al.*, 2010; Miodovnik *et al.*, 2011) e incluso están relacionados con alergias (Bornehag *et al.*, 2004; Jaakkola, Verkasalo, y Jaakkola, 2000).

## 7. PARABENOS

Los parabenos son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico que se utilizan como conservantes antimicrobianos en productos de cuidado personal y farmacéuticos (Guo y Kannan, 2013) (Figura 6).

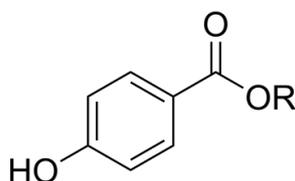


Figura 6: Estructura química de los parabenos.

Es probable que el contacto repetido con productos que contengan parabenos conduzca a una exposición humana generalizada a través de la ingestión, inhalación o contacto dérmico. Los parabenos se excretan en cuestión de horas después de la exposición (Janjua *et al.*, 2008), por tanto, los efectos en la salud están probablemente relacionados con exposiciones recurrentes que se producen con el tiempo (Smith *et al.*, 2012). El Metilparabeno (m-Parabeno) y el Propilparabeno (p-Parabeno) se han detectado en la orina de >99% y >92% respectivamente de una muestra representativa de la población estadounidense participante en la 2005-2006 *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), mientras que el Butilparabeno se ha detectado en el 47% de las muestras de orina analizadas (Calafat *et al.*, 2010).

Se sospecha que los parabenos son DE. Son débilmente estrogénicos, y tienen una afinidad de unión al RE más baja que el estrógeno endógeno. Los parabenos se unen tanto a los RE  $\alpha$  y  $\beta$  (Gómez *et al.*, 2005; Okubo *et al.*, 2001) y su actividad estrogénica aumenta al aumentar la longitud y ramificación de la cadena alquilo (Butilparabeno>p-Parabeno>m-Parabeno) (Byford *et al.*, 2002; Routledge *et al.*, 1998; Vo *et al.*, 2010). Recientes estudios experimentales han reportado que ciertos parabenos pueden actuar también como antiandrógenos (Chen *et al.*, 2007; Darbre y Harvey, 2008). Los parabenos son estructuralmente similares a algunos disruptores de estrógenos (Kester *et al.*, 2002) Un estudio realizado por Prusakiewicz *et al.*, mostró que los parabenos inhibían al estrógeno y la sulfatación del estradiol por inhibición de la actividad sulfotransferasa en la piel, lo que sugería que la aplicación tópica crónica de parabenos podría conducir a efectos estrogénicos prolongados en la piel (Prusakiewicz *et al.*, 2007). Los datos en humanos sobre los efectos en la salud reproductiva de la exposición parabenos son muy limitados. Parece algunos parabenos pueden tener un efecto negativo sobre la función endocrina masculina y femenina pero se necesitan más investigaciones al respecto.

## 8. FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos se clasifican en varios grupos, incluyendo las isoflavonas (como la genisteína y la daidzeína), los lignanos, los cumestanos, y los estilbenos (Byrne *et al.*, 2009). Los primeros estudios ecológicos y epidemiológicos mostraban que las poblaciones asiáticas que consumían dietas ricas en fitoestrógenos tenían una menor incidencia de cáncer de mama planteando la posibilidad de que los fitoestrógenos podían ser agentes quimiopreventivos eficaces contra el cáncer de mama. Sin embargo, la mayoría de los estudios epidemiológicos no mostraron un efecto protector (Peeters *et al.*, 2003; Byrne *et al.*, 2009) (Figura 7).

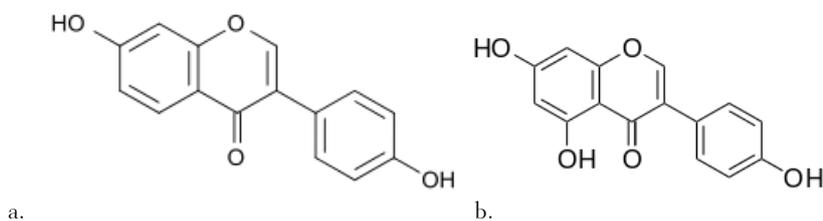


Figura 7: Estructura química de la daidzeína (a) y la genisteína (b).

Las isoflavonas, especialmente genisteína y daidzeína, son compuestos polifenólicos de origen vegetal y se encuentran principalmente en la soja y productos derivados de la soja. Se considera que tienen una actividad estrogénica débil, y dada la similitud estructural y funcional con E2, las isoflavonas de soja se unen débilmente a los RE  $\alpha$  y  $\beta$  siendo capaces de unirse a RE $\alpha$  una con una afinidad 100-1000 veces menor que el E2 (Rostagno *et al.*, 2007;

Miksicek, 1994; Kuiper et al., 1998; Song *et al.*, 1999; Matthews *et al.*, 2000; Branham *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2002) actuando como agonistas o antagonistas débiles de E2 (Hwang *et al.*, 2006; Santell *et al.*, 1997; Kuiper, *et al.*, 1997). Las isoflavonas también se unen fuertemente a RE de membrana (Thomas y Dong, 2006) para ejercer acciones no genómicas potencialmente perjudiciales para la fertilidad masculina (Fraser *et al.*, 2006). Además, las isoflavonas han sido relacionadas con trastornos reproductivos masculinos en los mamíferos, incluyendo la alteración del desarrollo de los órganos reproductivos, especialmente después de la exposición intrauterina (Atanassova *et al.*, 2000).

La actividad biológica de las isoflavonas de soja se ha demostrado ampliamente *in vitro* y en modelos animales, (Dang, 2009; Akiyama *et al.*, 1987; Dang *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008; Kavanagh *et al.*, 2008), así como en humanos adultos (Hooper *et al.*, 2009). Sin embargo pocos estudios, han abordado los efectos a largo plazo sobre el desarrollo y la función reproductiva de la exposición temprana a proteínas de soja (Adgent *et al.*, 2011). Los fitoestrógenos administrados a roedores en altas dosis o en estadios críticos del desarrollo pueden dar lugar a desórdenes graves en el tracto reproductivo (Strauss *et al.*, 1998). Sus potenciales efectos reproductivos fueron descritos inicialmente en el ganado ovino. Un síndrome caracterizado por la feminización de los machos castrados sexualmente inmaduros, metaplasia escamosa de la uretra y los genitales, desarrollo de quistes perianales en *cul-de-sac* que comunicaban con la uretra, hiperplasia mamaria, galactorrea, y disminución de la fertilidad, estaba vinculado a la introducción de pastos de trébol ricos en fitoestrógenos (Bennetts, 1946a; Bennetts, 1946b; Meyer, 1970). Mientras que los efectos nocivos de los fitoestrógenos sobre la reproducción se han descrito en otras especies de mamíferos (Kyselova et al., 2003; Seppen, 2012), no está claro si ocurre lo mismo en los seres humanos.

Los beneficios para la salud de los fitoestrógenos en los trastornos cardiovasculares y en los relacionados con la menopausia (Stark y Madar, 2002) y la aparente ausencia de efectos adversos a largo plazo han llevado a un aumento en el consumo de estas sustancias, principalmente a través de los alimentos a base de soja (Bhatia et al., 2008). Sin embargo, las dosis eficaces pero inocuas aún no se han establecido. Los diferentes estudios han revelado que los bebés que ingirieron preparados a base de soja pueden tener una concentración sérica fitoestrógenica 13.000 a 22.000 veces superior a los niveles de estrógenos endógenos (Setchell *et al.*, 1998), lo que ha llevado a la preocupación por sus posibles efectos adversos sobre el cerebro y morfología de los órganos reproductores y el desarrollo funcional y, en última instancia, sobre la fertilidad (Dinsdale y Ward, 2010).

## 9. NICOTINA Y TABAQUISMO

Un cigarrillo encendido genera cerca de 4000 compuestos tóxicos. Los constituyentes principales que afectan la salud son: nicotina, alquitrán en la fase de partículas y monóxido de carbono en la fase gaseosa (Hammond *et al.*, 2006) (Figura 8). El humo del cigarrillo contiene compuestos sospechosos de alterar la función hormonal (Windham *et al.*, 2005). Debido a la naturaleza de la asociación con enfermedades hormonales, el tabaquismo se ha considerado como potencialmente antiestrogénico (Baron *et al.*, 1990).

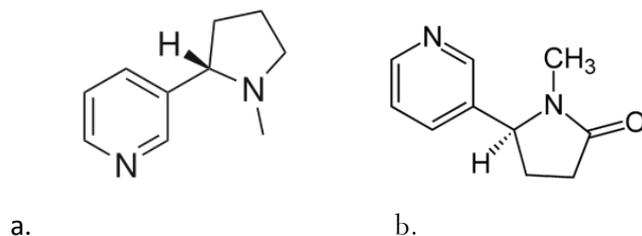


Figura 8: Estructura química de la nicotina (a) y de la cotinina (b)

Se sospecha de una relación causal entre el tabaquismo y la alteración de la fecundidad y la función reproductiva pero los datos disponibles no son concluyentes, tanto en su efecto sobre la calidad del semen en los hombres como, en la función ovárica en las mujeres (Caserta *et al.*, 2013).

## 10. CAFEÍNA

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), un alcaloide xantina, es una droga psicotrópica (Eskenazi, 1993), que está presente de forma natural, y como aditivo en muchos alimentos principalmente en el té, café, refrescos de cola, bebidas energéticas y chocolate y, en medicamentos (Figura 9). Aunque las cantidades varían de país a país, en promedio, una taza de café de 260 ml contiene alrededor de 100 mg de cafeína.

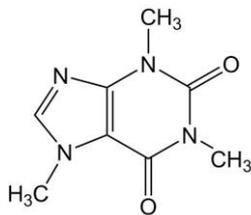


Figura 9: Estructura química de la cafeína.

Algunos estudios muestran que el alto consumo de cafeína puede causar aborto involuntario, parto prematuro o deterioro del crecimiento fetal (Care Study Group, 2010; Bakker *et al.*, 2010; Bracken *et al.*, 2003), aunque otros estudios no encuentran estas asociaciones (Maslowa *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 1993; Clausson *et al.*, 2002).

# HIPÓTESIS



Las anomalías cromosómicas están presentes en el 40-70% de los abortos espontáneos esporádicos y son responsables de problemas reproductivos, como son fallo repetido de implantación, el aborto de repetición y el factor masculino severo, en parejas con cariotipo normal. Nuestra hipótesis es que la exposición a disruptores endocrinos, cafeína y/o cotinina, presentes en la alimentación y otros productos de uso cotidiano puede ser la causa de aneuploidías espermáticas y aneuploidías embrionarias, que son la causa de fallo repetido de implantación, aborto de repetición e infertilidad por factor masculino y, del fracaso de el tratamiento de reproducción asistida.



# OBJETIVOS



**Objetivo general:**

Determinar la relación de ciertos disruptores endocrinos, cafeína y nicotina con la incidencia de anomalías cromosómicas embrionarias y espermáticas y su efecto sobre la función reproductiva.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar los niveles en orina, semen o líquido folicular de varios disruptores endocrinos, cafeína y nicotina en donantes de gametos fértiles.
2. Determinar los niveles en orina, semen o líquido folicular de varios disruptores endocrinos, cafeína y nicotina en parejas con aborto de repetición, fallo de implantación o factor masculino.
3. Relacionar los niveles observados de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina con la estimulación y respuesta ovárica de las pacientes femeninas y las donantes de ovocitos.
4. Relacionar los niveles observados de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina con la calidad seminal de donantes de semen y pacientes masculinos.
5. Relacionar los niveles observados de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina con las alteraciones cromosómicas: en el grupo control de varones con el análisis de aneuploidías en espermatozoides, y en las parejas infértiles con el análisis de aneuploidías embrionarias.
6. Relacionar los niveles observados de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina con estilo de vida y consumo, así como, con la calidad seminal, la respuesta ovárica y las anomalías cromosómicas en embriones y espermatozoides.



# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio descriptivo, exploratorio prospectivo observacional en el que se incluyeron donantes y parejas que aceptaron la participación en el mismo durante el periodo comprendido entre 24 de diciembre de 2013 y el 22 de julio de 2015. Este proyecto de tesis doctoral fue sometido a valoración por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Instituto Universitario IVI-Valencia (IU-IVI Valencia) que concedió su aprobación para la realización del mismo antes de ser iniciado (Código Proyecto: 1307-C-122-CR) (Anexo I). Este estudio ha sido financiado por la Fundación Salud 2000, con el Premio de Investigación MERCK SERONO 2015 en el campo de la Fertilidad.

## 2. LUGARES DE EJECUCIÓN

- Instituto Universitario (IU-IVI). Valencia, España.
- IGENOMIX. Valencia, España.
- Fundación IVI (FIVI). Valencia, España.
- Unidad Analítica, Instituto de Investigación Sanitaria, Fundación Hospital La Fe, Valencia, España.

## 3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

### 3.1. PACIENTES

#### 3.1.1. Criterios de inclusión

Se seleccionó una cohorte de 10 mujeres que se realizaron un diagnóstico genético preimplantacional para cribado de aneuploidías (PGS) con ovocitos propios por una historia de AR, FI o FM severo y edad  $\leq 38$  años, con índice de masa corporal (IMC)  $<30 \text{ kg/m}^2$  así como sus respectivas parejas. Se define AR como al menos dos abortos previos tras gestación espontánea o tras TRA, en las que la etiología del aborto se considere como desconocida tras realizar el estudio previo mencionado a continuación. Se define FI como  $\geq 2$  fallos de implantación en ciclos previos de fecundación *in vitro* (FIV)/ICSI con al menos transfer de 2 embriones frescos y de buena calidad en cada ciclo y sin ninguna anomalía en el estudio de infertilidad previo. Se define como FM severo a varones con concentración seminal  $<2$  millones/ml. Se incluyeron parejas que en el tercer día de desarrollo embrionario tuvieran un mínimo de 4 embriones evolutivos en los que se pudiera realizar la biopsia embrionaria y el análisis cromosómico de los embriones.

Previamente a su inclusión, se realizó un estudio detallado para descartar otras posibles causas de AR o FI. Este estudio previo comprendía: histerosalpingografía, ecografía vaginal 2-D (histerosonografía o histeroscopia cuando era necesario), cariotipo de ambos miembros de la pareja, determinaciones de Anticuerpos Anticardiolipina (IgG o IgM), Anticoagulante lúpico, Antitrombina III, Resistencia a la proteína C activada (APCR) (si positivo, mutación G1691A del factor V Leiden), Proteína C y S, Homocisteína sérica, mutación para Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (mutación C677T), y mutación para el Factor II (mutación G20210A).

Las parejas fueron identificadas para su inclusión en el estudio a través de las Consultas de Ginecología de IVI-Valencia por Facultativos especialistas en reproducción asistida. Una vez identificadas eran informadas del estudio (Anexo II). En ningún caso, la propuesta de inclusión en este estudio modificó la estrategia terapéutica de los pacientes. En ningún caso, se indicaron pruebas médicas con objeto de incluir a ninguna pareja.

### **3.1.2. Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión de las parejas fueron los siguientes: mujeres con anomalías uterinas y/o trombofilias positivas y parejas en las que alguno de los miembros presentó cariotipo alterado. Asimismo, se excluyó aquellas parejas que optaron por el cambio de uno o ambos gametos. De las parejas inicialmente incluidas en el estudio, se excluyó a una que optó por el cambio de gameto masculino. Se excluyó a tres parejas que no entregaron el cuestionario y a una pareja que no entregó las muestras de orina.

No se excluyeron del estudio 2 parejas que no realizaron PGS pero que sí aportaron muestras de las que extrajimos datos que pudimos relacionar con la evolución del ciclo de reproducción asistida. No se realizó PGS cuando el número de embriones fue reducido y se decidió vitrificar para la acumulación de embriones para un próximo ciclo o cuando se realizó la transferencia de los embriones sin análisis cromosómico.

## **3.2. DONANTES FEMENINAS**

### **3.2.1. Criterios de inclusión**

El grupo control femenino estuvo formado por 31 donantes de ovocitos fértiles pertenecientes al programa de donación de ovocitos de IVI-Valencia que realizaron donación de forma anónima y altruista. Los criterios de inclusión específicos fueron los siguientes: fertilidad probada (al menos un hijo nacido vivo y/o interrupción voluntaria del embarazo), IMC normal

(18-30 kg/m<sup>2</sup>), ciclos menstruales regulares entre 25-35 días, estudio hormonal basal normal (FSH<10UI/L y E2<50 pg/ml). Todas las mujeres debían cumplir los criterios de inclusión del programa de donación de ovocitos de IVI, que incluía la realización de una exploración física general y ginecológica normales, ausencia de enfermedades hereditarias familiares, cariotipo normal, negatividad en el estudio del síndrome de X-Frágil y ausencia de exposición previa a radiaciones, productos tóxicos o drogas intravenosas. No se podía haber tomado medicación de efecto endocrino (incluyendo gonadotropinas o anticonceptivos orales) durante los tres meses previos. Además las donantes debían tener edad comprendida entre 18 y 35 años, y serologías negativas para enfermedades de transmisión sexual como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de la hepatitis C y B, y el *Treponema pallidum*.

Las donantes de ovocitos eran identificadas para su inclusión en el estudio a través de las Consultas de ginecología de IVI-Valencia por Facultativos especialistas en reproducción asistida. Una vez identificadas eran informadas del estudio. (Anexo II)

### **3.2.2. Criterios de exclusión**

Se excluyeron del estudio las donantes con endometriosis, dos o más abortos espontáneos previos y/o SOP (según criterios de Rotterdam) definido por la ausencia de al menos dos de los siguientes criterios: hiperandrogenismo clínico o analítico (testosterona >1,9 ng/ml), alteración menstrual tipo oligomenorreas y patrón ecográfico característico (12 ó más folículos de 2-9 mm).

## **3.3. DONANTES MASCULINOS**

### **3.3.1. Criterios de inclusión**

El grupo control masculino lo compusieron 25 donantes de semen pertenecientes al programa de donación de semen de IVI-Valencia. Solo fueron aceptadas muestras de semen con más de 90 millones de espermatozoides móviles progresivos en el eyaculado con >14% de formas normales, con marcadores negativos para *Chlamydia* en una muestra de orina mediante PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) y un cultivo negativo para gonorrea en una muestra de semen (Garrido et al., 2002). Los criterios de inclusión para los donantes de semen fueron: edad comprendida entre 18 y 35 años, con exploración física y cariotipo normales; sin historia familiar de enfermedades hereditarias o cromosómicas y con serologías negativas para enfermedades de transmisión sexual como el VIH, los virus de la hepatitis C y B, y el *Treponema pallidum*. El criterio para seleccionar la muestra de semen de nuestro banco fue

que el donante tuviera fertilidad probada dentro del programa de inseminación artificial de IVI-Valencia.

Los donantes de semen eran identificados para su inclusión en el estudio a través del laboratorio de andrología de IVI-Valencia por Biólogos especializados en reproducción asistida. Una vez identificados eran informados del estudio (Anexo II).

### **3.3.2. Criterios de exclusión**

Se excluyeron aquellos donantes sin fertilidad probada en el momento del estudio, con concentración espermática menor a la estipulada el día de la obtención de la muestra del estudio o que tuvieran algún resultado positivo en las analíticas efectuadas.

## **4. MATRICES BIOLÓGICAS**

### **4.1. PROTOCOLOS DE RECOGIDA DE LAS MUESTRAS**

A todos los sujetos de estudio (donantes y pacientes) se les entregó una hoja informativa del estudio (Anexo III) y aquellos que aceptaron participar firmaron el correspondiente consentimiento informado (Anexo III). Se informó del estudio en la consulta médica (Figuras 10, 11, 12 y 13).

De los 26 donantes de semen reclutados inicialmente, entraron en el estudio 25. El semen del donante con referencia interna Dh-022 no fue apto para FISH de espermatozoides por lo que se excluyó del estudio. De las 32 donantes reclutadas inicialmente, continuaron en el estudio 31. La donante con referencia interna Dm-028 no entregó las muestras de orina y fue excluida. De las 15 parejas incluidas en el estudio, quedaron fuera de él cinco: la pareja con referencia interna P-007, cambió el gameto masculino, la pareja con referencia interna P-014 no entregó las muestras de orina y las parejas con referencia interna P-010, P-011 y P-013 no entregaron los cuestionarios.

Día de la consulta			
En la consulta		PRESENTACIÓN ESTUDIO	♀ ♂
		CUESTIONARIO (Cumplimentar en casa)	
		INFORMACIÓN y CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Día de la punción			
En casa		ORINA (1ª orina de la mañana) Entregar CUESTIONARIO	♀ ♂
En el Lab. de FIV		LÍQUIDO FOLICULAR	♀
		SEMEN	♂
Día del transfer			
En casa		ORINA (1ª orina de la mañana)	♀ ♂

Figura 10: Protocolo de recogida de muestras de pacientes.

Día de la visita			
En la Consulta		PRESENTACIÓN ESTUDIO	
		CUESTIONARIO (cumplimentar en casa)	
		INFORMACIÓN y CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Día de la punción			
En casa		Entregar CUESTIONARIO	Mantener en frigorífico hasta envío
En el Lab. Gnal		ORINA (1ª orina de la mañana)	
		SANGRE (EDTA)	
En el Lab. FIV		LÍQUIDO FOLICULAR	
Día 5 tras donación			
En casa		ORINA (1ª orina de la mañana)	Mantener en frigorífico hasta envío

Figura 11: Protocolo de recogida de muestras de donantes femeninas.

Día de la visita			
En la Consulta		PRESENTACIÓN ESTUDIO	
		CUESTIONARIO (cumplimentar en casa)	
		INFORMACIÓN y CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Día de la donación			
En casa		Entregar CUESTIONARIO	Mantener en frigorífico hasta envío
En el Lab.		ORINA (1ª orina de la mañana)	
		SEMEN	
Día 5 tras donación			
En casa		ORINA (1ª orina de la mañana)	Mantener en frigorífico hasta envío

Figura 12: Protocolo de recogida de muestras de donantes masculinos.

Día de la punción			
En el lab. de FIV		LÍQUIDO FOLICULAR	
		SEMEN	
NO SE MODIFICA EL PROTOCOLO DE TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA			
En el Lab. de FIV		Día 0 de la FIV	
		FIV/ICSI	
		Día 3/ Día 5 del desarrollo embrionario	
En el Lab. de DGP		BIOPSIA EMBRIONARIA	
		Día 4/ Día 6 de desarrollo embrionario	
		PGS	

Figura 13: Protocolo de recogida de muestras en el Laboratorio de FIV.

## 4.2. ORINA

Para la determinación de los disruptores endocrinos, caféina y cotinina se recogieron dos muestras de orina, tal y como se detalla a continuación:

- Los pacientes (ambos miembros de la pareja) recogieron la primera orina de la mañana, tanto el día de la punción como el día correspondiente a la transferencia embrionaria (5 días después de la punción folicular).
- El grupo control femenino recogió la primera orina de la mañana, el día de la punción y otra muestra 5 días después.
- El grupo control masculino recogía la primera orina de la mañana el día que deja la muestra de semen y 5 días después.

Se utilizaron frascos de orina de polipropileno estériles (Maran Medical, Madrid, España) para la recolección de orina (libres de BPA). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el envío a nuestro laboratorio (menos de 4 horas de almacenaje). Una vez en nuestro laboratorio las muestras fueron alicuotadas en tubos eppendorf Safe-Lock de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y centrifugadas a 13000 rpm, durante 15 minutos a 4°C e inmediatamente se congelaron a -80 °C y se mantuvieron congeladas hasta la medida de los DE. Las muestras congeladas fueron enviadas a la Unidad Analítica, del Instituto de Investigación Sanitaria, de la Fundación Hospital La Fe, para su análisis. Las concentraciones urinarias de los DE se midieron utilizando *Ultra-Performance Liquid Chromatography/Electrospray–Mass Spectrometry* (UPLC/ESI-MS). Todas las concentraciones urinarias de los DE, de la caféina y la cotinina fueron normalizados por creatinina (Ann Arbor, MI, USA).

En la orina de donantes y pacientes se valoraron los siguientes compuestos: BPA, m-Parabeno, p-Parabeno, Mono (2-etilhexil) ftalato (MEHP), genisteína, daidzeína, cotinina y caféina (Tabla 1).

## 4.3. SEMEN

Las muestras de eyaculado se recogieron por ipsación en un recipiente estéril (libre de BPA), previo lavado aséptico de manos y genitales. Se recomendó un período de abstinencia sexual no inferior a tres días, asegurando así un volumen seminal óptimo para obtener la mayor cantidad posible de espermatozoides con la eyaculación.

En el caso de los pacientes, el día de la punción se proponía la entrega de una muestra del semen sobrante, en fresco, tras ICSI, en tubo de polipropileno (libre de BPA) (Biologix, TX,

Estados Unidos). En el caso de los donantes recibimos 1 ml de muestra de semen en fresco en tubo de polipropileno (libre de BPA) (Biologix, TX, Estados Unidos). En todos los casos, antes de procesar la muestra se realizó un seminograma completo en el laboratorio de andrología de IVI-Valencia.

En el plasma seminal (PS) se analizaron los siguientes compuestos: BPA, m-Parabeno, p-Parabeno, MEHP, genisteína, daidzeína, cotinina y cafeína (Tabla 1).

En espermatozoides aislados tras centrifugación del plasma seminal se realizó una FISH para el análisis de anomalías cromosómicas (Tabla 1).

#### **4.4. LÍQUIDO FOLICULAR**

El día de la punción, tras la aspiración folicular se recogió aproximadamente 10 ml líquido folicular (LF) en tubos de polipropileno de 15 ml (Biologix, TX, Estados Unidos), tras el aislamiento de los complejos corona-ovocito. El LF se alicuotó una vez recibido en nuestro laboratorio en tubos eppendorf Safe-Lock de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se mantuvo a -80°C hasta su análisis para la valoración de diferentes DE.

En LF se analizaron los siguientes compuestos: BPA, m-Parabeno, p-Parabeno, MEHP, genisteína, daidzeína, cotinina y cafeína (Tabla 1).

#### **4.5. BIOPSIA EMBRIONARIA: ARRAYS DE CGH**

En las pacientes de estudio, incluidas en el programa de PGS para alguna de las indicaciones antes mencionadas, el análisis de aneuploidías embrionarias se realizó mediante aCGH (Tabla 1). Tras la estimulación ovárica y el correspondiente ciclo de FIV, se realizó la biopsia de una única blastómera en el tercer día de desarrollo embrionario. En todos nuestros casos, la biopsia se realizó en día 3 y la blastómera obtenida se depositó en un tubo de PCR y se transportó congelada al Laboratorio de DGP Cromosómico para su análisis. En este estudio solo evaluamos la dotación cromosómica de blastómeras de embriones obtenidos con gametos propios de las parejas incluidas en el estudio. En ningún caso se analizaron blastómeras de embriones obtenidos con gametos de los individuos incluidos en los grupos de donantes (casos ovodón-banco).

La técnica de arrays de CGH aplicada a DGP para el cribado de aneuploidías permite el análisis simultáneo de los 23 pares de cromosomas humanos de una única célula, siendo capaz

de detectar desequilibrios cromosómicos mayores de 5 Mb a lo largo de todo el genoma humano.

TIPO DE MATRIZ	DETERMINACIÓN	METODOLOGÍA
ORINA LÍQUIDO FOLICULAR PLASMA SEMINAL	BPA	UPLC/ESI-MS
	m-Parabeno	
	p-Parabeno	
	MEHP	
	Cafeína	
	Cotinina	
	Genisteína	
	Daidzeína	
ESPERMATOZOIDES	Aneuploidías	FISH
BLASTÓMERA	Aneuploidías	aCGH

Tabla 1: Compuestos analizados en las diferentes matrices y metodología utilizada.

Todas las muestras recogidas en este estudio se transportaron en frío hasta la llegada a nuestro laboratorio donde orina, semen y líquido folicular de donantes y pacientes, fueron preprocesadas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis y las biopsias embrionarias de día 3 de los embriones de las parejas del estudio entraron en protocolo rutinario de nuestro laboratorio de DGP Cromosómico informándose de resultados en el día 5 del desarrollo embrionario.

## 5. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

### 5.1. ESTIMACIÓN DE ESTILO DE VIDA Y FACTORES DE RIESGO

A los participantes se les entregó un cuestionario para cumplimentar en casa (Anexo IV). El cuestionario contenía información sobre parámetros antropométricos, nivel de estudios, profesión, exposición a químicos en el trabajo, demografía, historia médica reproductiva, antecedentes clínicos, lugar de residencia, actividad física (horas de sueño, actividad física en el trabajo, tiempo caminando, en bicicleta, tiempo dedicado a las tareas del hogar, a hacer deporte,...), frecuencia de consumo de diferentes alimentos en fresco, envasados y enlatados, frecuencia de consumo de soja en diferentes formas, rutina de uso de contenedores de plástico para comida, frecuencia de uso de distintos productos de higiene personal, tabaquismo, y tratamientos farmacológicos. Este cuestionario está basado en el cuestionario de frecuencia alimentaria (CFA) de 101 ítems (Vioque *et al.*, 2013) a su vez basado en el original de 93

ítems, utilizado en población de mujeres embarazadas en los distintos centros del Estudio INMA.

## 5.2. ANÁLISIS DE NIVELES DE DE MEDIANTE UPLC/ESI-MS

### 5.2.1. Procedimiento extracción de metabolitos en orina.

Se partió de 1 ml de orina al que se añadieron 100 µl de Acetato de Amonio ( $\text{AcONH}_4$ ) 1M (pH=6) y 10 µl  $\beta$ -Glucuronidasa E. coli K12 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). La orina se incubó durante 2h a 37 °C. Una vez finalizada la desconjugación, se centrifugó 15 min (13000 rpm; 4°C) y con el sobrenadante se procedió como sigue:

- Para los metabolitos que se encontraban en mayor concentración en orina y que se midieron mediante el modo ESI+, se precipitó y centrifugó. Para medir la cafeína se diluyó la muestra unas 20 veces (punto 5.2.1.1).
- Para los metabolitos que se encontraban a baja concentración, se realizó una extracción líquido-líquido (L-L), se evaporó y redisolvió para preconcentrar los analitos y poder detectarlos instrumentalmente (punto punto 5.2.1.2).

#### 5.2.1.1. Precipitado de metabolitos y centrifugación.

A partir de 150 µl de orina incubada y se añadieron 75 µl de Metanol (MeOH) frío, se centrifugó (15 min; 13000 rpm; 4°C) y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante (unos 180 µl) se le añadieron 10 µl de Cotinine-d3 (1ppm en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y 10 µl del marcador Cafeína-13C (1ppm en  $\text{H}_2\text{O}$ ) para medir cotinina, genisteína y daidzeína. Por otro lado, a 20 µl de sobrenadante, se le añadieron 160 µl de  $\text{H}_2\text{O}$  y 10 µl del marcador Cotinine-d3 (1ppm en  $\text{H}_2\text{O}$ ) además de 10 µl del marcador Cafeína-13C (1ppm en  $\text{H}_2\text{O}$ ) para medir cafeína, ya que hubo que diluirla unas 20 veces.

#### 5.2.1.2. Extracción líquido-líquido

Se partió de 1 ml de orina incubada a la que se le añadieron 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% Fórmico) más 1,5 ml de Acetato de etilo (AcOEt) (Merck, Darmstadt, Germany) en tubos de 15 ml de polipropileno (Biologix, TX, Estados Unidos). Se agitó durante 15 minutos y, a continuación, se separó la fase orgánica (AcOEt), repitiendo la extracción con 1,5 ml de AcOEt. Se juntaron las fases orgánicas y se evaporaron a sequedad mediante un concentrador SpeedVac Concentrator (SPD121P, Thermo Savant, Waltham, MA, USA) en tubos eppendorf Safe-Lock de 2 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Finalmente, se redisolvieron en 100 µl de MeOH

con patrones internos BPA-d16, m-Par-13C y p- Par-13C a un nivel de concentración de 1000, 100 y 100 ng/ml, respectivamente.

### 5.2.2. Procedimiento extracción de metabolitos para líquido folicular y plasma seminal.

Se partió de 1 ml de muestra aproximadamente, que se centrifugó a 300g, 10 min a temperatura ambiente (25°C). A continuación, se separó el sobrenadante en alícuotas de 500 µl en tubos eppendorf Safe-Lock de 2 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se añadieron 50 µl de AcONH<sub>4</sub> 1M pH=6 y 5 µl de β-Glucuronidasa EColi K12 para desconjugar, durante 2h a 37 °C. A continuación, se centrifugó durante 15 min (13000 rpm; 4°C) y del sobrenadante (500 µl) se realizó una extracción L-L, añadiendo 100 µl de H<sub>2</sub>O (0,1% Fórmico) y 500 µl de AcOEt. Se agitó durante 5 min y se centrifugó 5 min a 12500 rpm (4°C). Se recogió el sobrenadante (aprox 500 µl) y se repitió dos veces más la extracción L-L. Se juntaron todos los extractos y se evaporaron a sequedad en un concentrador SpeedVac Concentrator (SPD121P, Thermo Savant, Waltham, MA, USA) a 25 °C. Posteriormente, se redisolvió en 100 µl de MeOH (con IS a un nivel de concentración de 100 ng/ml excepto para bisphenol A-d16 que era de 1000 ng/ml. Se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min, se separó una alícuota de 10 µl y se llevó a un volumen final de 200 µl en Acetonitrilo (ACN)/H<sub>2</sub>O (1:1) (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) para medir cafeína y se tomó otra alícuota de 70 µl y se llevó a 100 µl en MeOH (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) para analizar el resto de metabolitos por UPLC/ESI-MS.

### 5.2.3. Separación y UPLC/ESI-MS

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un cromatógrafo de alta presión Waters (UPLC) mediante una columna cromatográfica ACQUITY HSS T3 1.8 µm (2.1 x 100 mm) (Waters Corporation, Milford, USA). Para separar los metabolitos por cromatografía se utilizaron las siguientes condiciones:

Fases móviles:

- Agua (0.1% Agua (A)) y Acetonitrilo (0.1% fórmico (B)) para medir en ESI (+)
- AcONH<sub>4</sub> (10 mM pH 8.5 (A)) y ACN para medir en ESI (-)

Flujo: 0,4 ml/min

T<sup>a</sup> Col: 30°C

Volumen inyección: 5 µl

Los gradientes variaron dependiendo de si el instrumento operaba en modo ESI(+) o ESI(-) según la Tabla 2. En cuanto al espectrómetro de masas, el instrumento usado para realizar las mediciones fue el Agilent 6460 Triple Quad LC/MS. La temperatura de operación fue de 325°C, el flujo de gas de 10 l/min y la adquisición de datos se realizó en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) dinámico. En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los parámetros usados para cada uno de los metabolitos medidos:

Gradiente ESI (+)		Gradiente ESI (-)	
Tiempo (min)	Fase móvil (%)	Tiempo (min)	Fase móvil (%)
0-1	5% B	0-1	40% B
1-2.25	5%B- 80% B	1-5	40%B- 95% B
2.25-3	80% B- 95% B	5-6	95% B- 95% B
3-5	95% B	6.1-7	40% B
5.1-6	5% B		

Compuesto	Transición (m/z)	Fragmento	VoltajeColl	Polaridad
BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	227>227	110	0	ESI (-)
m-Parabeno (Bellefonte, PA, USA)	151>92	100	20	ESI (-)
p-Parabeno (Sigma St. Louis, MO, USA)	179>92	120	20	ESI (-)
MEHP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	277>134	100	10	ESI (-)
Cafeína (Sigma, St. Louis, MO, USA)	195>138	100	15	ESI (+)
Cotínina (Sigma, St. Louis, MO, USA)	177>80	100	20	ESI (+)
Daidzeína (Sigma, St. Louis, MO, USA)	255>199	150	30	ESI (+)
Genisteína (Sigma, St. Louis, MO, USA)	271>153	150	25	ESI (+)
Cafeína-13C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	198>140	100	15	ESI (+)
Cotínina-d3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	180>80	100	20	ESI (+)
BPA-d16 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	241>241	100	0	ESI (-)
m-Par-13C (FLUKA eu-Ulm, Germany)	157>98	100	20	ESI (-)
p-Par-13C (FLUKA eu-Ulm, Germany)	185>98	120	20	ESI (-)

Tabla 2: Gradientes ESI, estándares utilizados y condiciones de medida.

Los límites de detección de la técnica utilizada se muestran en la Tabla 3:

	Cafeína	Cotínina	Daidzeína	Genisteína	BPA	MEHP	MP	PP
LdD (ng/ml)	0,44	0,44	0,44	0,44	1,66	0,41	0,41	0,41

Tabla 3: Límites de detección de UPLC/ESI-MS para cafeína, cotínina y DE. LdD: Límite de detección

### 5.3. ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE FISH PARA LOS CROMOSOMAS 13, 18, 21, X E Y.

La FISH utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos de un cromosoma, de modo que se pueden enumerar las copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de los espermatozoides. Los espermatozoides son fijados y extendidos en portaobjetos y posteriormente descondensados y desnaturalizados, para poder hibridar con sondas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. La valoración de las señales de hibridación se realiza bajo

microscopio de fluorescencia utilizando criterios estrictos. Se evalúa la incidencia de espermatozoides haploides, diploides y disómicos para alguno de los cromosomas analizados en cada una de las muestras.

### 5.3.1. Fijación de las muestras de eyaculado

La FISH en espermatozoides requiere de un paso previo de fijación y extensión en portaobjetos de las muestras de espermatozoides. Tras esperar a que licue la muestra, se lleva a cabo un seminograma con recuento de volumen, concentración, movilidad y morfología, y se deposita la muestra en un tubo cónico de 15 ml de polipropileno (Biologix, TX, Estados Unidos). El semen fresco se centrifuga 10 minutos, a 1700 rpm, a 4°C. Se recoge el plasma seminal para la determinación de DE en un tubo eppendorf Safe-Lock de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se resuspende el pellet con Carnoy (Metanol:Ácido acético glacial (3:1)(Merck, Darmstadt, Germany) como solución de fijación. La solución de fijación, se añade, gota a gota agitando con el vórtex, hasta un volumen final de 3-4 ml. Se centrifuga 5 minutos a 600 g, se elimina el sobrenadante y se repite este paso una vez más. Tras la segunda centrifugación, se descarta el sobrenadante y se añade de nuevo Carnoy hasta conseguir una dilución semitransparente. Finalmente, se extienden los espermatozoides, dejando caer una gota de la dilución en el centro de un portaobjetos Superfrost desde una altura de 20-25 cm. Se comprueba al microscopio de contraste de fases, en nuestro caso, un Microscopio de fluorescencia OLYMPUS Provis AX-70 equipado con objetivo de contraste de fases de 10X (Olympus, Center Valley, Pennsylvania, Estados Unidos) que los espermatozoides están dispersos y no solapados, y se almacenan los portaobjetos a -20°C hasta la hibridación (Figura 14).

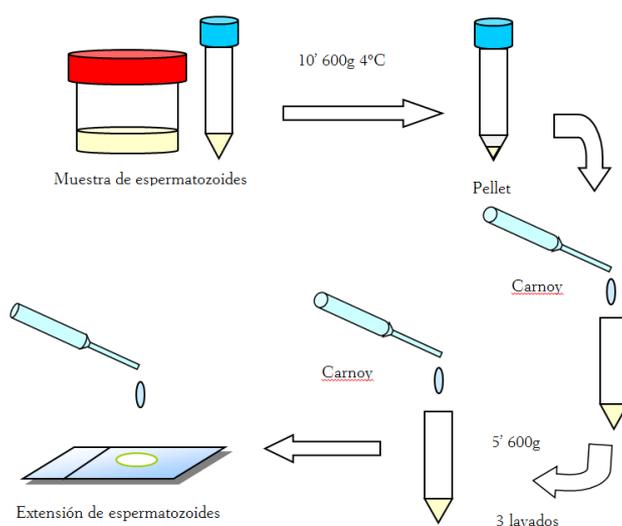


Figura 14: Fijación de muestras de eyaculado.

### 5.3.2. Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH)

Se trata de una técnica de análisis citogenético que consiste en marcar con sondas de ADN fluorescentes secuencias centroméricas (CEP, del inglés *Chromosome-specific Centromeric Enumeration Probes*) o específicas de locus (LSI, del inglés *Locus Specific Identifier*). Para el presente estudio se utilizaron las sondas: CEP X (SpectrumGreen™), CEP Y (SpectrumOrange™), CEP 18 (SpectrumAqua™), LSI 13q14 (SpectrumGreen™) y LSI 21q22.13-q22.2 (SpectrumOrange™) (Kit Aneuvysion, Vysis Inc., USA).

Se analizaron los cromosomas X, Y y 18 en un portaobjetos y los cromosomas 13 y 21 en otro portaobjetos con los espermatozoides fijados y extendidos previamente. El área del portaobjetos donde estaban localizados los espermatozoides se marcó con un lápiz de tungsteno, correspondiendo a un área de 15x15 mm. Seguidamente, se lavaron las extensiones en 2xSSC (del inglés, *Saline Sodium Citrate*) (pH: 7,0-7,5) durante 5 minutos. Sin dejar secar, se deshidrataron las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 85%, 100%) durante 2 minutos en cada alcohol y se dejó secar por completo.

- **DESCONDENSACIÓN:** Se incubaron las muestras durante 5-7 minutos en una cubeta Coplin con DTT (pH: 7,4; 1,4-DTT (Roche, Mannheim, Germany) 5mM/Tris (Roche, Mannheim, Germany) y Triton X-100 (Roche, IN, Estados Unidos) atemperado a 37°C. Posteriormente, se realizó un lavado de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente. Sin dejar secar, se deshidrataron las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70 %, 85 %, 100 %) durante 2 minutos en cada alcohol y se dejaron secar.
- **DESNATURALIZACIÓN:** A continuación, se incubaron las muestras durante 5 minutos a 73°C en formamida al 70% (pH: 7,3) (Roche, Mannheim, Germany). Sin dejar secar, se deshidrataron las muestras en una serie creciente de etanol (70%, 85%, 100%) durante 2 minutos en cada alcohol y se dejaron secar.
- **HIBRIDACIÓN:** Se aplicaron 2 µl de la sonda sobre el área de hibridación marcada al inicio, se colocó un cubreobjetos de 12x12 mm, y se selló con cola. A continuación, se hibridaron las muestras en una placa calefactora Hybrite (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, U.S.A) a 37°C con hibridaciones entre 8-24 horas.
- **DETECCIÓN E INTERPRETACIÓN:** Tras la hibridación, se eliminó la cola, se retiró el cubreobjetos deslizándolo suavemente y se lavaron las muestras 1 minuto y 30

segundos a 73°C en 0,4xSSC (pH=7,0-7,5). Sin dejar secar, se lavaron las muestras 30 segundos en 2xSSC/0,1% NP-40 (pH: 7,0-7,5; (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, Estados Unidos) a temperatura ambiente y se dejaron secar. Finalmente, se aplicaron 5 µl de una contratinción de DAPI II (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, Estados Unidos), se colocó un cubreobjetos de 15x15 mm, se selló con esmalte de uñas y se almacenaron los portaobjetos a -20°C hasta la evaluación al microscopio de fluorescencia (Figura 15).



Figura 15: Hibridación de las muestras de semen

- **EVALUACIÓN DE LAS SEÑALES DE HIBRIDACIÓN:** La visualización de las señales de hibridación se realiza bajo microscopio de fluorescencia, en nuestro caso el Microscopio de fluorescencia OLYMPUS Provis AX-70, (Olympus, Center Valley, Pennsylvania, Estados Unidos) equipado con filtros adecuados para los haptenos utilizados. Debido a la baja tasa de anomalías cromosómicas que suelen presentar los espermatozoides para un determinado cromosoma, se analizaron entre 2000-5000 espermatozoides, aproximadamente, por donante. Para la interpretación de las señales de hibridación se siguieron los criterios de evaluación descritos por Blanco, Egozcue y Vidal (Blanco, Egozcue y Vidal, 1996) que se detallan a continuación (Figura 16):
  - Espermatozoide haploide normal: si presenta una señal única para cada cromosoma analizado.
  - Espermatozoide disómico: si presenta dos señales para un cromosoma concreto y una señal única para el resto de cromosomas analizados.
  - Espermatozoide diploide: si presenta dos señales para cada uno de los cromosomas analizados.

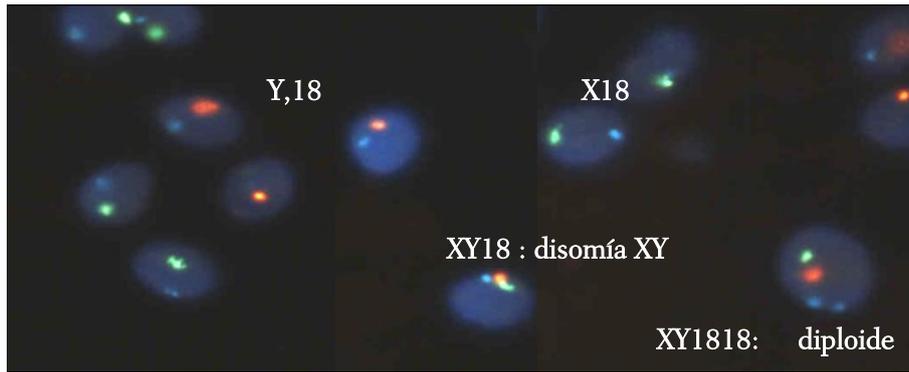


Figura 16: Triple FISH: CEP X (Spectrum Green), CEP Y (Spectrum Orange), CEP 18 (Spectrum Aqua).

Los resultados obtenidos tras el estudio de FISH de espermatozoides se compararon mediante un test estadístico Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ) con los valores de referencia de muestras obtenidas de una población control de donantes fértiles normozoospermicos. Así, si se observó un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de alteraciones cromosómicas para al menos uno de los cromosomas analizados, se consideró que la muestra analizada presentaba un resultado de FISH anormal.

#### 5.4. ANÁLISIS DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS: PGS

##### 5.4.1. Estimulación ovárica y cultivo embrionario

La estimulación ovárica de las pacientes se realizó mediante FSH recombinante (FSHrec, Gonal®, Merck-Serono, Ginebra, Suiza) o hMG Gonadotropina menopáusica humana altamente purificada (hp-hMG, Menopur®, Ferring Pharmaceuticals, Copenhague, Dinamarca) siguiendo los protocolos establecidos en IVI-Valencia. El desencadenante de la ovulación se produjo mediante la administración de hCG (hormona gonadotropina coriónica, 6500 unidades internacionales (UI), Ovitrelle®, Merck-Serono, Madrid, España) o con un análogo de la GnRH (Decapeptyl®, Ferring Pharmaceuticals, Barcelona, España) y se realizó cuando al menos dos folículos alcanzaron 18-18,5 mm de diámetro medio, programando la punción folicular 36 horas más tarde bajo sedación general.

Tras la recuperación y lavado de los ovocitos se procedió al ICSI. Transcurridas 17-20 h horas de la microinyección se evaluó la correcta fecundación de los ovocitos y los embriones fueron mantenidos en medio de cultivo IVF/CCM (Scandinavian IVF, Goteborg, Sweden) y la división embrionaria fue evaluada cada 24h.

### 5.4.2. Biopsia embrionaria

En el presente estudio, la biopsia embrionaria se realizó en día 3 de desarrollo. Solo se biopsiaron aquellos embriones con al menos 6 blastómeras de similar tamaño y menos del 25% de fragmentación, es decir, con morfología normal y desarrollo adecuado (Mir *et al.*, 2013). (Figura 17).



Figura 17: Desarrollo embrionario y cronología de un ciclo de DGP.

La biopsia embrionaria se realizó en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (G-PGD, Vitrolife, Scandinavian IVF, Suecia) suplementado con albúmina, utilizando un sistema de láser de infrarrojos (Octax Laser Shot™, Fertilase®, Herbron, Alemania). Por otro lado, las blastómeras extraídas fueron lavadas de forma individual en un medio de 1% polivinilpirrolidona (PVP)/ *Phosphate Buffered Saline* (PBS) y depositadas en un tubo de 0,2 mL de PCR con 2  $\mu\text{l}$  de PBS (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La transferencia embrionaria de embriones euploides se realizó en día 5 de desarrollo embrionario.

### 5.4.3. Arrays de CGH

Tras la recepción de los tubos eppendorf de 0,2  $\mu\text{l}$  con las blastómeras, en el laboratorio de genética se comenzó con una etapa de amplificación que se realiza en condiciones de esterilidad y en una campana de flujo laminar. A continuación, se detallan las diferentes etapas del protocolo de arrays de CGH para el estudio de los 23 pares de cromosomas utilizando la plataforma *24sure* (Illumina, Cambridge, UK) (Figura 18).

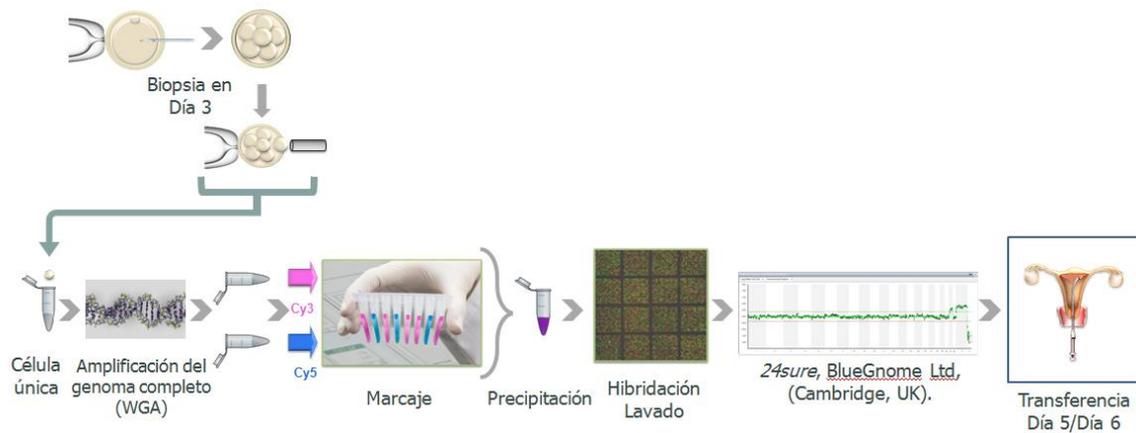


Figura 18: Esquema del protocolo de arrays de CGH para el estudio de aneuploidías de 23 pares de cromosomas sobre blastómeras.

- Amplificación genómica completa (de inglés, Whole Genome Amplification, WGA):** Consta de una fase de lisis en la que se añaden 3  $\mu\text{l}$  de *Cell Extraction Buffer* en el tubo de PCR con la blastómera a amplificar y 5  $\mu\text{l}$  de un mix compuesto por 4,8  $\mu\text{l}$  de *Dilution buffer* y 0,2  $\mu\text{l}$  de *Extraction Enzyme*. Se llevan los tubos al termociclador con el programa de termociclado proporcionado por la casa comercial. Seguidamente, se realiza una pre-amplificación en la que se añade a cada tubo 5  $\mu\text{l}$  del mix compuesto por 4,8  $\mu\text{l}$  de *Pre-amplification Buffer* y 0,2  $\mu\text{l}$  de *Pre-amplification Enzyme*. Se llevan los tubos al termociclador con el programa de pre-amplificación establecido por la casa comercial. Por último, se realiza la amplificación, en la que se añade a cada tubo 60  $\mu\text{l}$  del mix compuesto por 34,2  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  (*Nuclease-free wáter*), 25  $\mu\text{l}$  de *Amplification Buffer* y 0,8  $\mu\text{l}$  de *Amplification Enzyme*. Se introducen los tubos en el termociclador con el programa de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial (todos los reactivos provienen del Kit de amplificación, *Sureplex* (Illumina, Cambridge, UK)). Se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia/ausencia de amplicones.
- Marcaje:** En una placa de 96 pocillos se dispensan 5  $\mu\text{l}$  de *Primer Solution*. A continuación, se añaden 8  $\mu\text{l}$  de ADN amplificado de cada blastómera destinando 2 pocillos al control masculino *SureRef male reference* (BlueGnome, UK) y 2 pocillos al control femenino *SureRef female reference* (BlueGnome, UK). Se introducen los tubos en el termociclador y se desnaturaliza el ADN a 94°C durante 5 minutos. Posteriormente, se extraen los tubos del termociclador y se pasan inmediatamente a una gradilla refrigerada a 4°C durante 5 minutos. Seguidamente, se preparan dos tubos eppendorf de 1,5 ml, uno para el mix con el fluorocromo *Cyanine 3* (Cy3) y otro para el mix con *Cyanine 5* (Cy5). En ambos tubos se añaden 5  $\mu\text{L}$  de *Reaction Buffer* por muestra/control, 5  $\mu\text{l}$  de *dCTP mix* por muestra/control y 1  $\mu\text{l}$  de enzima de marcaje

*Klenow* por muestra/control. A uno de los tubos se le añade 1 µl del fluoróforo *Cy3 dCTP* por muestra/control y al otro 1 µL del fluoróforo *Cy5 dCTP* por muestra/control. Se dispensan 12 µL del mix con *Cy3* a las filas impares de la placa de 96 pocillos y 12 µL del mix con *Cy5* a las filas pares de la placa de 96 pocillos. Esta placa se lleva al termociclador y durante 2 horas a 37°C se marcará el ADN amplificado (Kit *Labelling System*, Illumina, Cambridge, UK).

- **Precipitación:** Finalizado el marcaje, se extraen la placa del termociclador. Se dispensan 25 µL de *COT Human DNA*. Se combina el contenido de la primera fila de la placa marcada con *Cy3* con la segunda fila de la placa marcada con *Cy5*, la tercera con la cuarta y así sucesivamente. Se lleva a cabo la precipitación del ADN mediante centrifugación en vacío a 75°C durante 1h (Genevac, Ipswich, UK) (Kit de precipitación, Illumina, Cambridge, UK).
- **Hibridación:** Se añaden 21µL de tampón de hibridación (Illumina, Cambridge, UK) atemperado a 75°C y se desnaturaliza el ADN precipitado en un termobloque Hybex (SciGene, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) a 75°C durante 10 minutos. Tras dejar enfriar, y en la campana de extracción de gases, se añaden 18 µl de cada muestra a un cubreobjetos de 22x22 mm, y se monta sobre el área de hibridación del array. Los arrays se incuban toda la noche en una cámara de hibridación que contiene una solución de SSC y formamida (Roche, IN, Estados Unidos) y se hibridan incubando estas cámaras en un baño térmico a 47 °C.
- **Lavado:** En campana de extracción de gases, se sacan los arrays de la cámara de hibridación y se elimina el cubreobjetos por deslizamiento humedeciéndolos con una solución de 2xSSC/0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA). Sin dejar secar, se lavan en agitación a 850 rpm y temperatura ambiente en 2xSSC/0,05% Tween20 (10 min) y 1xSSC (10 min) en 0,1xSSC a 60°C (5 min) y finalmente en 0,1xSSC a temperatura ambiente (1 min). Finalmente, se secan los arrays centrifugándolos 3 minutos a 180 ref y se almacenan a temperatura ambiente hasta su lectura.
- **Escaneado de arrays e interpretación de resultados:** La lectura de los arrays de CGH se realiza con un scanner (Powerscanner, TECAN, Männedorf, Switzerland) equipado con láser de dos canales, un canal verde (532 nm) para la excitación y la lectura de la señal *Cy3* y un canal rojo (635 nm) para la excitación y lectura de la señal *Cy5*. Las imágenes *.TIFF* generadas por el scanner se analizaron con un programa informático

*BlueFuse* (Illumina, Cambridge, UK) que genera gráficas de las que se infiere visualmente la ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) de cromosoma/s concreto/s (Figura 19).

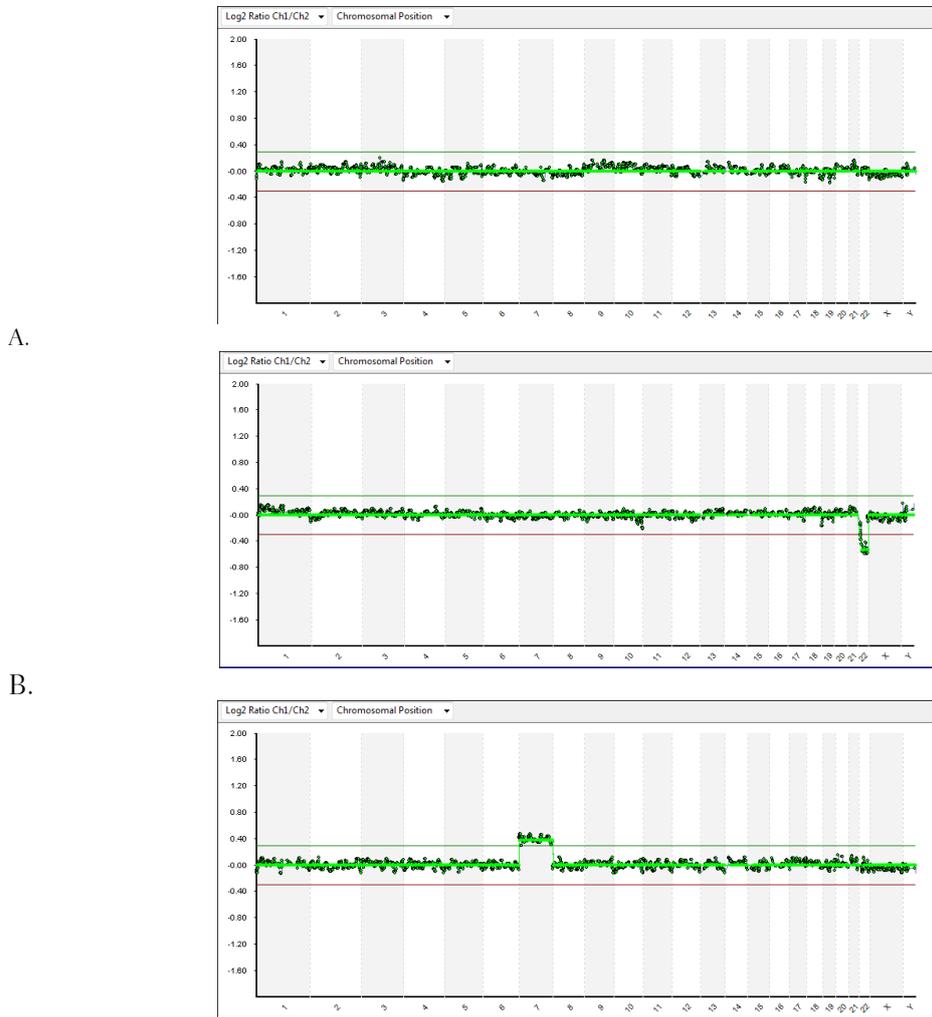


Figura 19: A. Perfil de un array de CGH correspondiente a una blastómera normal, XY. B. Perfil de un array de CGH correspondiente a una blastómera anormal, -22,XY. C., Perfil de un array de CGH correspondiente a una blastómera anormal, +7,XY.

## 5.5. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

A continuación, se describen las variables del estudio y los tests estadísticos utilizados en este trabajo.

- Variables de exposición:
  - Analitos: BPA, m-Parabeno, p-Parabeno, MEHP, genisteína, daidzeína, cotinina y cafeína.
  - Cuestionario sobre el estilo de vida (Anexo IV)

- Variables de resultados:
  - Parámetros de estimulación y respuesta ovárica: Días estimulación, número de folículos antrales, E2 el día de la hCG, dosis diaria de FSH, dosis total de FSH, dosis hMG, número de ovocitos recuperados el día de la punción y número de ovocitos Metafase II (MII) recuperados el días de la punción.
  - Parámetros del seminograma: volumen de eyaculado, concentración de espermatozoides/ml, concentración de espermatozoides total, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, porcentaje de espermatozoides no progresivos y porcentaje de espermatozoides inmóviles.
  - Parámetros de la FISH de espermatozoides: porcentaje de disomías de autosomas, porcentaje de disomías de cromosomas sexuales, porcentaje de espermatozoides diploides.
  - Parámetros del ciclo de PGS: porcentaje de embrión anormal por ciclo y tasa de gestación clínica.
  
- Para el análisis descriptivo hemos desarrollado un informe exploratorio de los datos utilizando el soporte informático R-project (R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). Se han presentado las medias y las desviaciones típicas de los datos continuos. El análisis exploratorio nos ha permitido detectar errores de introducción de los datos y hemos homogeneizado las categorías de las variables correspondientes.
  
- Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, E.E.U.U.) para la realización de test Kruskal Wallis. En todas las pruebas estadísticas realizadas con las variables de resultados, se estableció un nivel de significación estadística  $p < 0,05$ . Para la comparación de medias y DS (desviación estándar) y el FISH de espermatozoides utilizamos el programa estadístico *InStat* (GraphPad INSTAT Software).

# RESULTADOS



## 1. RESULTADOS DE LAS DONANTES DE OVOCITOS

### 1.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

#### 1.1.1. Variables demográficas: características poblacionales

Nuestro estudio incluyó 31 donantes pertenecientes al programa de donación de ovocitos de IVI-Valencia. El intervalo de edad de las donantes de ovocitos fue 18-34 años con una edad media de  $28,4 \pm 4,0$  años. El intervalo de IMC de las donantes de ovocitos fue de 17,6 a 27,2  $\text{kg/m}^2$  con un IMC medio de  $21,8 \pm 2,4 \text{ kg/m}^2$  (Tabla 8). De las donantes de ovocitos, 25 (78,1%) habían nacido en España, todas eran de raza caucásica y todas tenían su residencia en la ciudad de Valencia o alrededores. En cuanto a su nivel educativo, una de las donantes (3,2%) habían cursado estudios universitarios, 8 (25,8%) formación profesional, 14 (45,2%) educación secundaria y una (3,2%) de las donantes había cursado educación primaria. Debido a la profesión desarrollada por las donantes, 2 (6,5%) de ellas estaban expuestas laboralmente a compuestos químicos.

#### 1.1.2. Variables de exposición

##### 1.1.2.1. Estilo de vida

Tras el análisis de los cuestionarios cumplimentados por el grupo de las donantes de ovocitos, en el Anexo V se detalla la distribución de la población en cuanto a la actividad física realizada, consumo de alimentos varios y bebidas, rutina en la higiene personal, tabaquismo, contacto con plásticos y consumo de fármacos.

##### 1.1.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina

###### 1.1.2.2.1. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina

De las 32 donantes reclutadas inicialmente, entraron en el estudio 31. La donante con referencia interna Dm-028 pese a que inicialmente aceptó participar en el estudio, no aportó las muestras de orina que se le solicitaban por lo fue excluida. Recogimos la primera orina de la mañana el día que se realizaba la punción de los ovocitos para donación (orina 1) y otra orina 5-7 días después (orina 2). De las 31 donantes de ovocitos incluidas en el estudio, 26 aportaron las dos muestras de orina (orinas 1 y 2).

Salvo en dos muestras en las que no se detectó genisteína porque su concentración fue inferior al límite de detección de la técnica ( $< \text{LdD}$ ), en todas las primeras orinas (orina 1) fueron detectados todos los disruptores endocrinos analizados, así como la cafeína y la cotinina. En las

segundas orinas (orina 2) no fue detectado BPA en dos de las orinas y MEHP en dos de las orinas. En la siguiente tabla se muestran los valores mínimos y máximos que se encontraron en la orina de las donantes de ovocitos de nuestro estudio. (Tabla 4).

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ng creatinina)	0,149	0,020	0,347	0,176	0,003	0,036	0,036	0,002
Valor máx. (ng/ng creatinina)	82,279	39,685	221,929	85,921	0,822	28,121	4,263	4,689
Media±DS	18,353±22,531	11,124±13,489	24,936±52,669	8,041±16,531	0,127±0,169	1,065±5,025	0,549±1,008	0,474±1,055

Tabla 4: Valores mínimos y máximos medios y, media±DS de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos detectados en la orina de las donantes de ovocitos.

En la siguiente tabla (Tabla 5) se muestran los niveles de cafeína, cotinina y de los disruptores endocrinos analizados en orina de las donantes femeninas. Para la descripción de los resultados consideraremos, siempre que dispongamos de él, el valor medio de las orinas 1 y 2.

Respecto a la *cafeína*, fue detectada en todas las muestras de orina que se recibieron con un valor medio mínimo de 0,149 ng/ng creatinina y un valor medio máximo de 82,279 ng/ng creatinina. Las concentraciones más altas se encontraron en donantes que se declararon grandes consumidoras de café y refrescos con cafeína (5-6 veces a la semana o más). Se observaron considerables diferencias de concentración en la orina 1 y 2 independientemente del consumo de café o refrescos de cafeína.

La *cotinina* fue detectada en todas las muestras orina que se recibieron con un valor medio mínimo de 0,020 ng/ng creatinina y un valor medio máximo de 39,685 ng/ng creatinina. Las menores concentraciones de cotinina se detectaron en las donantes que no habían fumado nunca y en exfumadoras. El valor medio mínimo detectado en fumadoras fue de 0,887 ng/ng creatinina. Las fumadoras consumían una media de 9,6 cigarrillos/día. Se observó cierto aumento de cotinina conforme se incrementaba el consumo de cigarrillos al día.

La *daidzeína* se detectó en todas las muestras de orina con un valor medio mínimo de 0,347 ng/ng creatinina y un valor medio máximo de 221,929 ng/ng creatinina. Se observó una gran variación de concentración en la orina 1 y 2, curiosamente, aunque casi la totalidad de las donantes no consumían nunca soja en ninguna de las formas en las que fueron preguntadas.

La *genisteína* fue detectada en todas las orinas salvo en dos muestras de orina 1 en las que la concentración fue inferior al LdD. El valor medio mínimo fue 0,176 ng/ng creatinina y el valor

medio máximo de 85,921 ng/ng creatinina. En las concentraciones menores se observó poca variación entre la concentración de la orina 1 y 2. La concentración media en orina fue independiente de lo que las donantes de ovocitos respondieron en el cuestionario respecto al consumo de soja y derivados.

El *BPA* se detectó en todas las muestras de orina salvo en dos de las orinas 2, en las que la concentración fue inferior a LdD. La concentración media mínima en orina fue de 0,003 ng/ng creatinina y la máxima de 0,822 ng/ng creatinina. Las concentraciones en la orina 1 y 2 fueron similares pero las diferencias aumentaban en aquellas donantes con concentraciones medias mayores. La concentración media de BPA en orina fue independiente del consumo de agua embotellada, envasados y enlatados. Tampoco se observó relación con almacenar los alimentos en plástico o calentarlos en recipiente de plástico, así como tampoco con reutilizar la botella de plástico o ser portadora de empastes.

El *MEHP* se detectó en todas las muestras de orina salvo en dos de las orinas 2, en las que la concentración fue inferior a LdD con una concentración mínima media de 0,036 ng/ng creatinina y una concentración media máxima de 28,121 ng/ng creatinina. Los valores de las orinas 1 y 2 fueron similares. En la orina 1 de la donante con referencia interna Dm-002 encontramos un valor anormalmente elevado, 56,179 ng/ng creatinina. La concentración media de MEHP en orina fue independiente del consumo de agua embotellada, envasados y enlatados. Tampoco se observó relación con calentar los alimentos en recipiente de plástico así como tampoco con reutilizar la botella de plástico o ser portadora de empastes. Las mayores concentraciones medias se observaron en donantes que almacenaban los alimentos en recipiente de plástico y en usuarias frecuentes (varias veces a la semana o más) de leche corporal, maquillaje y desmaquillante.

El *m-Parabeno* aparecía en la orina de todas las donantes de ovocitos. La concentración media mínima detectada fue de 0,036 ng/ng creatinina y la máxima 4,263 ng/ng creatinina. Las mayores concentraciones medias se detectaron en donantes que eran usuarias frecuentes (varias veces a la semana o más) de maquillaje y desmaquillante.

El *p-Parabeno* aparecía en la orina de todas las donantes de ovocitos. La concentración media mínima detectada fue de 0,002 ng/ng creatinina y la máxima 4,689 ng/ng creatinina. Las mayores concentraciones se detectaron en donantes que eran usuarias frecuentes (varias veces a la semana o más) de crema hidratante, leche corporal y maquillaje.

CONCENTRACIONES MEDIAS NORMALIZADAS DE CAFÉINA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN ORINA (ng/ng creatinina)								
REF INT	CAFÉINA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Dm-001	5,832	4,430	9,358	1,661	0,090	0,066	1,140	1,135
Dm-002	6,125	0,934	76,730	15,341	0,277	28,121	0,097	0,117
Dm-003	13,136	11,434	4,292	4,466	0,197	0,078	4,263	4,689
Dm-004	11,063	0,020	0,347	0,542	0,012	0,059	0,232	0,037
Dm-005	62,268	0,062	6,439	2,405	0,394	0,417	0,216	0,017
Dm-006	60,625	0,041	4,388	2,276	0,028	0,073	0,114	0,019
Dm-007	1,848	5,773	38,821	8,110	0,003	0,067	0,211	0,035
Dm-008	1,068	15,753	1,030	2,875	0,044	0,221	0,498	0,714
Dm-009	0,149	7,095	3,268	2,520	0,220	0,230	0,042	3,578
Dm-010	10,161	3,653	0,868	1,511	0,065	0,052	0,716	1,677
Dm-011	18,291	28,392	2,983	1,308	0,078	0,152	0,295	0,286
Dm-012	61,327	31,735	0,439	0,994	0,091	0,074	0,062	0,020
Dm-013	16,256	0,080	8,337	2,629	0,030	0,148	1,980	0,570
Dm-014	10,135	0,056	221,929	42,294	0,228	0,095	0,081	0,085
Dm-015	2,133	0,133	62,538	10,501	0,822	0,094	0,972	0,056
Dm-016	2,219	10,278	4,714	1,383	0,012	0,043	0,157	0,143
Dm-017	3,598	0,097	13,753	17,388	0,049	0,055	0,048	0,019
Dm-018	55,624	0,129	3,193	5,316	0,109	0,230	0,188	0,283
Dm-019	0,803	0,887	11,545	2,186	0,030	0,036	0,046	0,014
Dm-020	25,123	0,105	2,010	0,681	0,047	0,801	0,395	0,086
Dm-021	14,375	0,101	3,780	2,220	0,016	0,048	0,083	0,017
Dm-022	22,813	31,684	2,974	2,496	0,084	0,325	3,721	0,596
Dm-023	82,279	39,685	197,776	85,921	0,093	0,113	0,159	0,048
Dm-024	0,191	35,680	1,355	0,176	0,164	0,096	0,130	0,096
Dm-025	13,472	39,531	9,124	2,268	0,021	0,069	0,071	0,060
Dm-026	18,792	19,178	8,713	6,591	0,058	0,107	0,325	0,086
Dm-027	7,165	4,728	1,880	0,705	0,026	0,038	0,070	0,035
Dm-029	1,340	15,318	7,347	7,248	0,052	0,211	0,480	0,085
Dm-030	1,186	10,980	37,256	7,000	0,451	0,734	0,110	0,039
Dm-031	2,949	26,802	1,899	0,504	0,037	0,055	0,036	0,002
Dm-032	36,583	0,069	23,944	7,756	0,115	0,110	0,072	0,054

Tabla 5: Concentraciones medias normalizadas de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en la orina de las donantes de ovocitos.

### 1.1.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en líquido folicular

En la siguiente tabla (Tabla 6) se muestran los valores mínimos y máximos en el líquido folicular de los donantes de ovocitos de nuestro estudio. No recibimos líquido folicular de dos de las donantes de ovocitos.

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ml)	2,741	0,162	0,119	0,191	---	0,449	0,139	0,029
Valor máx. (ng/ml)	2716,380	70,435	25,402	21,043	57,794	2,399	5,197	4,382
Media±DS	572,141±669,560	26,826±23,337	2,291±5,731	1,860±4,018	57,794	1,424±1,379	0,894±1,359	1,030±1,585
# <LdD (%)	0 (0%)	9 (31,0%)	5 (17,2%)	0 (0%)	28 (96,6%)	27 (93,1%)	10 (34,5%)	13 (44,8%)

Tabla 6: Valores mínimos y máximos, media±DS y, número de muestras en las que no se detectaron en líquido folicular de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos (<LdD).

Como el líquido folicular fue recogido el mismo día que la orina 1, usaremos como referencia la media esta orina para establecer correlaciones. Las concentraciones detectadas en líquido folicular se recogen en la Tabla 7.

La concentración de *cotinina* fue inferior al LdD en el 31,0% de las muestras de líquido folicular, *daidzeína* en el 17,2 %, *BPA* en el 96,6%, *MEHP* en el 93,1%, *m-Parabeno* en el 34,5% de las muestras y *p-Parabeno* en el 44,8% de las muestras.

La concentración mínima detectada en líquido folicular de *cafeína* fue de 2,741 ng/ml y la máxima de 2716,380 ng/ml. Las mayores concentraciones en el líquido folicular correspondían a las mayores concentraciones detectadas en orina 1 y éstas aparecían en donantes que eran consumidoras frecuentes (5-6 veces a la semana o más) de café y refrescos de cafeína.

La *cotinina* presentó una concentración mínima de 0,162 ng/ml y un valor máximo de 70,435 ng/ml. Las mayores concentraciones se detectan el líquido folicular de fumadoras con una concentración mínima de 0,567 ng/ml. La concentración en líquido folicular fue inferior a LdD en las no fumadoras y en las que se declararon fumadoras pasivas. Las mayores concentraciones en líquido folicular correspondieron con las mayores concentraciones detectadas en la orina 1. La concentración en líquido folicular parece estar relacionada con el número de cigarrillos consumidos al día.

La *daidzeína* aparecía en líquido folicular con una concentración mínima de 0,119 ng/ml y un valor máximo de 25,402 ng/ml. Las mayores concentraciones detectadas en líquido folicular aparecían en las donantes con las mayores concentraciones en la orina 1. Estas donantes respondieron en el cuestionario que nunca consumían ninguno de los productos de soja y derivados que se les plantearon.

La *genisteína* fue detectada en todas las muestras de líquido folicular con una concentración mínima de 0,191 ng/ml y una concentración máxima de 21,043 ng/ml. Al igual que ocurría con la daidzeína, y en las mismas donantes, se detectan las mayores concentraciones en líquido folicular y orina 1. Estas donantes según lo contestado en el cuestionario no consumían nunca soja o sus derivados.

EL *BPA* solo fue detectado en uno de los líquidos foliculares con una concentración de 57,794 ng/ml. Este valor en líquido folicular corresponde a un valor de concentración intermedio detectado en la orina 1. Esta donante declaró un consumo de 2 ó 3 veces al día de refrescos enlatados y zumos envasados y, una reutilización de 4 veces o más de las botellas de plástico de agua.

El *MEHP* se detectó en dos muestras de líquido folicular. En el resto la concentración era inferior a LdD. Estas dos muestras pertenecían a donantes que eran consumidoras muy frecuentes (consumo diario) de agua embotellada, almacenaban la comida en recipiente de plástico y eran usuarias frecuentes (2-4 veces a la semana o más) de leche corporal, maquillaje y esmalte de uñas.

El *m-Parabeno* se detectó en líquido folicular con concentración mínima de 0,139 ng/ml y máxima de 5,197 ng/ml, sin relación con la concentración detectada en orina 1. Las donantes con mayores concentraciones en líquido folicular declararon usar diariamente crema hidratante.

El *p-Parabeno* se encontró en líquido folicular con una concentración mínima de 0,029 ng/ml y una concentración máxima de 4,382 ng/ml. No se observó relación con la concentración detectada en orina 1. Las donantes con mayores concentraciones en líquido folicular declararon usar diariamente crema hidratante y eran las mismas que presentaban mayores concentraciones de m-Parabeno en líquido folicular.

CONCENTRACIONES DE CAFÉINA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN LÍQUIDO FOLICULAR (ng /ml)								
REF INT	CAFÉINA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Dm-001	230,605	12,519	1,258	1,358	<LdD	<LdD	0,397	0,221
Dm-002	215,389	0,567	14,860	8,755	<LdD	0,449	<LdD	<LdD
Dm-003	801,722	26,873	0,681	1,417	<LdD	<LdD	0,482	0,172
Dm-004	770,012	<LdD	<LdD	0,319	<LdD	<LdD	0,222	0,217
Dm-005	2716,380	<LdD	0,836	0,757	<LdD	<LdD	0,384	0,373
Dm-006	1771,087	<LdD	0,613	0,490	<LdD	<LdD	0,220	0,029
Dm-007	70,566	3,471	2,191	1,950	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-008	57,589	46,463	<LdD	0,451	<LdD	<LdD	1,006	3,855
Dm-009	7,510	7,598	0,407	0,896	<LdD	<LdD	5,197	4,382
Dm-010	805,926	7,752	<LdD	0,523	<LdD	<LdD	1,144	0,363
Dm-011	440,044	65,041	1,050	1,117	<LdD	<LdD	4,024	4,365
Dm-012	1545,139	70,435	<LdD	0,227	<LdD	<LdD	0,587	0,513
Dm-013	542,422	<LdD	1,139	1,729	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-014	221,296	<LdD	25,402	21,043	<LdD	<LdD	0,383	0,254
Dm-015	201,203	32,042	1,167	2,966	<LdD	<LdD	0,139	<LdD
Dm-016	81,514	10,001	0,119	0,191	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-017	109,102	<LdD	0,217	1,147	<LdD	2,399	<LdD	<LdD
Dm-018	333,344	<LdD	0,227	0,914	<LdD	<LdD	0,184	0,185
Dm-019	54,165	1,154	0,994	1,092	<LdD	<LdD	0,198	<LdD
Dm-020	1953,958	0,162	0,399	0,348	<LdD	<LdD	0,558	0,176
Dm-021	436,270	<LdD	0,333	1,766	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-022	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Dm-023	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Dm-024	2,741	67,796	0,242	0,427	<LdD	<LdD	0,267	0,286
Dm-025	356,019	31,861	1,020	0,927	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-026	1225,580	35,008	0,158	0,251	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-027	303,734	4,805	0,179	0,376	<LdD	<LdD	0,152	<LdD
Dm-029	89,662	46,791	0,689	1,095	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-030	77,523	35,681	0,205	0,531	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dm-031	514,847	30,499	0,591	0,671	57,794	<LdD	0,381	0,319
Dm-032	656,744	<LdD	<LdD	0,197	<LdD	<LdD	1,058	0,776

Tabla 7: Concentraciones de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en el líquido folicular de las donantes de ovocitos.  
<LdD: inferior al límite de detección de la técnica. N/A: dato no disponible.

### 1.1.3. Variables clínicas

#### 1.1.3.1. Estimulación y respuesta ovárica

A continuación, se describen las variables clínicas más relevantes relacionadas con el protocolo de estimulación ovárica aplicado y los resultados en cuanto al E2 obtenido el día de la administración de la hCG para el desencadenamiento de la ovulación y, la respuesta ovárica valorada por el número total de ovocitos aspirados y el número de ovocitos MII.

El promedio de días de estimulación fue  $9,5 \pm 0,9$  días. La media de folículos antrales fue de  $17,3 \pm 5,3$  folículos. La media de E2 fue  $2685,9 \pm 1263,1$  pg/ml. La dosis media diaria de FSH fue de  $213,9 \pm 54,1$  mUI/ml. La dosis media total de FSH fue de  $1912,3 \pm 500,9$  mUI/ml. La dosis media de hMG fue de  $1197,6 \pm 805,0$  mUI/ml. El número medio de ovocitos por punción fue de  $13,8 \pm 4,5$  El número medio de ovocitos metafase II por punción fue de  $10,7 \pm 3,7$  (Tabla 8).

REF INT	EDAD	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Estimulación (Días)	N° antrales	E2 (pg/ml) (Día hCG)	Dosis diaria FSH (mUI/ml)	Dosis total FSH (mUI/ml)	hMG (mUI/ml)	N° ovocitos punción	MII
Dm-001	26	21,2	11	7+8	2799	150	1650	825	9	9
Dm-002	26	25,6	9	7+7	3475	300	2700	675	16	15
Dm-003	23	19,1	9	16+10	1770	150	1350	N/A	14	14
Dm-004	23	18,9	9	7+10	2124	150	1350	675	13	11
Dm-005	29	25,1	12	7+7	1732	225	2700	N/A	14	13
Dm-006	33	21,3	9	10+13	3771	200	1750	N/A	20	16
Dm-007	31	22,7	9	8+12	3295	200	1750	N/A	10	1
Dm-008	22	27,2	10	5+6	2487	225	2250	750	24	15
Dm-009	30	21,5	9	11+7	2003	225	2025	675	10	7
Dm-010	33	24,2	9	N/A	1873	225	2025	675	13	12
Dm-011	32	19,7	9	4+6	4824	N/A	N/A	2700	17	14
Dm-012	26	22,9	10	8+9	3726	150	1500	1500	18	14
Dm-013	24	20,8	9	9+9	1921	225	2025	675	12	11
Dm-014	30	23,1	9	9+10	2248	225	2025	675	10	8
Dm-015	31	22,0	8	5+4	770	300	2400	300	7	6
Dm-016	29	24,3	10	11+7	4071	150	1500	750	15	14
Dm-017	18	23,4	10	10+12	831	187	1870	N/A	13	10
Dm-018	31	25,2	10	12+10	5318	N/A	N/A	2250	15	9
Dm-019	29	20,4	11	10+15	2358	N/A	N/A	2057	10	9
Dm-020	30	22,3	11	12+10	4484	225	2475	N/A	18	14
Dm-021	27	23,9	8	8+6	3339	300	1650	750	14	10
Dm-022	31	17,8	9	14+12	2397	150	1350	N/A	18	10
Dm-023	31	24,5	10	10+10	3023	225	2250	N/A	20	17
Dm-024	24	19,5	11	8+6	857	250	1000	N/A	12	11
Dm-025	30	20,7	10	8+8	5716	N/A	N/A	2250	14	12
Dm-026	29	18,0	9	8+7	1960	150	1350	N/A	17	14
Dm-027	33	20,8	9	5+5	2735	N/A	N/A	2700	7	6
Dm-029	31	20,6	9	5+5	1789	225	2025	675	7	5
Dm-030	22	17,6	9	18+10	2092	150	1350	N/A	13	10
Dm-031	34	21,8	9	8+3	1535	300	2700	N/A	6	6
Dm-032	33	20,8	9	7+7	1940	300	2700	N/A	21	10
Media±DS	28,4±4,0	21,8±2,4	9,5±0,9	17,3±5,3	2685,9±1263,1	213,9±54,1	1912,3±500,9	1197,6±805,0	13,8±4,5	10,7±3,7

Tabla 8: Edad, IMC, estimulación y respuesta ovárica de las donantes de ovocitos. N/A: dato no disponible.

## 1.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

### 1.2.1. Relación entre estilo de vida y variables clínicas

De todas las variables de exposición que aparecen en el cuestionario, se detallan a continuación aquellas en las que se observaron diferencias significativas:

- En cuanto a la **ACTIVIDAD FÍSICA**, las donantes fueron preguntadas por la frecuencia con la que caminaban al día. Las respuestas se categorizaron como sigue: no camina casi nunca, menos de 20 minutos al día, 20-40 minutos al día, 40-60 minutos al día, entre 1 y 1 hora y media al día o más de 1 hora y media al día. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el **número de folículos antrales** y el tiempo caminando ( $p=0,039$ ). Respecto al tiempo que las donantes hacían bicicleta a la semana, las respuestas se categorizaron en tres grupos: menos de 20 minutos a la semana, de 20 a 60 minutos a la semana y más de una hora a la semana. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el tiempo dedicado a hacer bicicleta a la semana con el **número de ovocitos metafase II** ( $p=0,033$ ) y con la **dosis total de FSH** ( $p=0,037$ ).
- Si tenemos en cuenta la **EXPOSICIÓN A QUÍMICOS** (sí/no), se observó una disminución estadísticamente significativa en el **número de folículos antrales** ( $p=0,044$ ), el **número total de ovocitos** ( $p=0,042$ ) y el **número de ovocitos MII** ( $p=0,042$ ).
- Respecto al **CONSUMO DE SOJA**, en concreto, harina de soja, yogur de soja, leche de soja, soja en bruto, soja germinada, natto, tempeh, miso, tofu y salsa de soja, las respuestas se clasificaron en dos grupos: nunca o alguna vez al mes. Se observó un incremento estadísticamente significativo en el **número de folículos antrales** con el consumo de harina de soja ( $p=0,019$ ), el consumo de yogur de soja ( $p=0,011$ ), el consumo de leche de soja ( $p=0,025$ ), y el consumo de tofu ( $p=0,025$ ).
- Para el **CONSUMO DE ALIMENTOS VARIOS**, las respuestas fueron categorizadas en tres grupos: consumo alguna vez al mes, consumo una o varias veces a la semana y consumo una vez al día o más. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el **número total ovocitos** y la frecuencia de consumo de **verdura fresca** ( $p=0,011$ ), entre **dosis total de FSH** y el consumo de **pescado blanco** ( $p=0,049$ ) y, entre **refrescos enlatados** y **HMG** ( $p=0,038$ ).
- Las donantes fueron preguntadas si usaban **ENVASES DE PLÁSTICO** para

almacenar alimentos (sí/no) y si calentaban los alimentos contenidos en un envase de plástico (sí/no). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el **número de folículos antrales** y la costumbre de calentar alimentos en recipiente de plástico ( $p=0,048$ ) y entre almacenar comida en plástico y la **dosis total de FSH** ( $p=0,040$ ).

- Se recogieron datos de la frecuencia de uso de productos de **HIGIENE PERSONAL** como crema hidratante, leche corporal, fotoprotector solar, autobronceador, maquillaje, desmaquillante y esmalte de uñas. Se agruparon las respuestas en tres categorías: semanal/diariamente, mensualmente y nunca. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el **número de folículos antrales** y el uso crema hidratante ( $p=0,021$ ) y, entre el uso de leche corporal ( $p=0,046$ ) y autobronceador con la **dosis total de FSH** ( $p=0,047$ ).

### 1.2.2. Relación entre concentraciones de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina y líquido folicular y, variables clínicas

De todas las mediciones realizadas en líquido folicular y orina, sólo se observaron diferencias significativas en la concentración de **CAFEÍNA**, mostrando una relación positiva estadísticamente significativa entre el **número total de ovocitos** con la cafeína media en orina ( $p=0,002$ ) y con la cafeína en líquido folicular ( $p=0,040$ ). También se observó esta relación entre el **número de ovocitos MII** y la cafeína media en orina ( $p=0,005$ ) y la cafeína en líquido folicular ( $p=0,008$ ) (Figura 20).

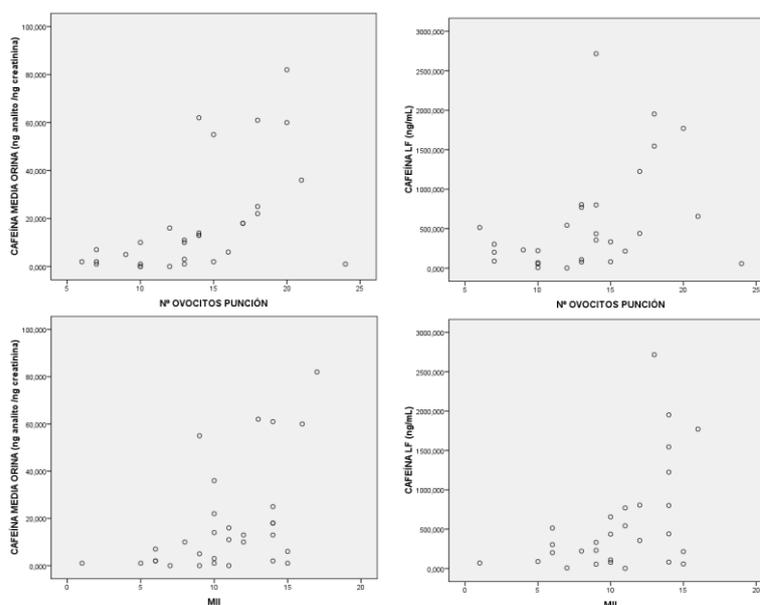


Figura 20: Relación entre la concentración de cafeína en orina y líquido folicular y el número de ovocitos y el número de ovocitos MII.

## 2. RESULTADOS DE LOS DONANTES DE SEMEN

### 2.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

#### 2.1.1. Variables demográficas: características poblacionales

Nuestro estudio incluyó 25 donantes pertenecientes al programa de donación de semen de IVI-Valencia. El intervalo de edad de los donantes de semen fue de los 18-34 años con una edad media de  $24,4 \pm 4,7$  años. El intervalo de IMC de los donantes de semen fue entre 19,6 y  $35,7 \text{ kg/m}^2$  con un IMC medio de  $23,9 \pm 4,0 \text{ kg/m}^2$  (Tabla 13). Todos los donantes de semen habían nacido en España, eran de raza caucásica y tenían su residencia en la ciudad de Valencia o alrededores. En cuanto al nivel educativo de los donantes, 8 de los 25 (32%) habían cursado estudios universitarios, 8 (32%) formación profesional, 8 (32%) educación secundaria y uno (4%) de los donantes había cursado educación primaria. Debido a su profesión, 3 de los donantes (12%) estaban expuestos ocupacionalmente a compuestos químicos.

#### 2.1.2. Variables de exposición

##### 2.1.2.1. Estilo de vida

Tras el análisis de los cuestionarios cumplimentados por el grupo de los donantes de semen, en el Anexo V se detalla la distribución de la población en cuanto a la actividad física realizada, consumo de alimentos varios y bebidas, rutina en la higiene personal, tabaquismo, contacto con plásticos y consumo de fármacos.

##### 2.1.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina

###### 2.1.2.2.1. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina

De los 25 donantes de semen incluidos en el estudio, 22 aportaron dos muestras de orina (orinas 1 y 2). En todas las primeras orinas (orina 1) fueron detectados todos los disruptores endocrinos analizados así como, la cafeína y la cotinina. En las segundas orinas (orina 2) no fue detectada cafeína en una de las orinas, m-Parabeno en 3 de las orinas y p-Parabeno en 12 de las orinas analizadas. En la siguiente tabla se muestran los valores mínimos y máximos que se encontraron en la orina de los donantes de semen de nuestro estudio (Tabla 9).

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ng creatinina)	0,031	0,013	0,018	0,065	0,006	0,031	0,004	0,001
Valor máx. (ng/ng creatinina)	20,272	40,284	86,702	22,815	0,632	1,838	1,574	0,327
Media±DS	3,654±5,056	5,589±10,623	10,942±20,579	4,530±6,377	0,116±0,150	0,216±0,354	0,176±0,341	0,053±0,092

Tabla 9: Valores mínimos y máximos medios y, media±DS de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos detectados en la orina de los donantes de semen.

En la siguiente tabla (Tabla 10) se muestran los niveles de cafeína, cotinina y los disruptores endocrinos analizados en orina de los donantes masculinos. Para la descripción de los resultados consideraremos, siempre que dispongamos de él, el valor medio de las orinas 1 y 2 (orina media).

La *cafeína* fue detectada en todas las muestras de orina salvo en una de ellas en la que la concentración era inferior al LdD de la técnica. El valor medio mínimo de cafeína detectado en orina fue 0,031 ng/ng creatinina y el máximo fue 20,272 ng/ng creatinina. Observamos que los donantes que se declararon grandes consumidores de cafeína (tomaban café 5 ó 6 veces a la semana o más), en general, tenían concentraciones superiores a 1,080 ng de cafeína/ng de creatinina. Si tomamos como referencia de alto consumo 1,080 ng de cafeína/ng de creatinina, en los donantes poco consumidores de bebidas con cafeína (café y refrescos) encontramos concentraciones similares en las orinas 1 y 2. También observamos que en grandes consumidores se detectan grandes diferencias de concentración en las orinas 1 y 2.

Con respecto a la *cotinina*, fue detectada en todas las muestras de orina (orinas 1 y 2). El valor medio mínimo de cotinina detectado en orina fue 0,013 ng/ng creatinina y el máximo fue 40,284 ng/ng creatinina. Aquellos donantes que eran fumadores presentaban concentraciones medias en orina entre 4,561 ng/ng creatinina y 40,284 ng/ng creatinina. Aquellos donantes que eran no fumadores presentaban concentraciones medias en orina mucho menores cercanas a cero, entre 0,013 ng/ng creatinina y 0,410 ng/ng creatinina. La concentración de cotinina media en orina no parecía dependiente del número de cigarrillos fumados. En los no fumadores se obtuvieron valores de cotinina similares en ambas orinas.

La *daidzeína* se detectó en todas las muestras de orina. Los donantes, en general, declararon escaso o nulo consumo de soja en diversas formas pero el valor medio mínimo de daidzeína en orina fue 0,018 ng/ng creatinina y el máximo fue 86,702 ng/ng creatinina. Las concentraciones

de daidzeína parecen independientes del consumo de soja en diferentes formas. A partir de una concentración media de 1,802 ng/ng creatinina se observa una alta variación entre las concentraciones de la orina 1 y 2.

La *genisteína* se detectó en todas las muestras de orina. Al igual que ocurría con la daidzeína, los donantes declararon escaso o nulo consumo de soja en diversas formas pero el valor medio mínimo de genisteína detectado en orina fue 0,065 ng/ng creatinina y el máximo fue 22,815 ng/ng creatinina. Las concentraciones de genisteína parecen independientes del consumo de soja en diferentes formas. A partir de una concentración media de 4,426 ng/ng creatinina observa una alta variación entre las concentraciones de la orina 1 y 2.

El *BPA* fue detectado en todas las muestras de orina con concentraciones similares en las orina 1 y 2. El valor medio mínimo de BPA detectado en orina fue 0,006 ng/ng creatinina y el máximo fue 0,632 ng/ng creatinina. Se obtuvieron valores de BPA similares en ambas orinas. La concentración de BPA media en orina parece independiente del consumo de agua embotellada, pero se observan concentraciones medias en orina más altas en consumidores frecuentes (5 ó 6 veces a la semana o más) de zumos envasados y embutidos envasados. La concentración de BPA media en orina parece independiente de reutilizar la botella de agua de plástico. La concentración de BPA media en orina también parece independiente del almacenamiento de alimentos en plástico, aunque las mayores concentraciones se encuentran en donantes que almacenaban alimentos en recipientes de plástico. La concentración de BPA media en orina parece independiente de calentar la comida en recipiente de plástico, de reutilizar la botella de plástico o incluso de ser portador de empastes.

En cuanto al *MEHP*, se detectó en todas las muestras de orina. Las concentraciones en las orinas 1 y 2 fueron muy similares. El valor medio mínimo de MEHP encontrado en orina fue 0,031 ng/ng creatinina y el máximo 1,838 ng/ng creatinina. Se obtuvieron valores de MEHP similares en ambas orinas. La concentración de MEHP media en orina parecía independiente del consumo de bebidas embotelladas, enlatados, envasados y, productos de higiene personal.

El *m-Parabeno* se detectó en todas las muestras de orina menos en 3 muestras (orina 2) en las que la concentración fue inferior a LdD. El valor medio mínimo de m-Parabeno detectado en orina fue 0,004 ng/ng creatinina y el máximo fue 1,574 ng/ng creatinina. Se obtuvieron concentraciones similares en ambas orinas. Las mayores concentraciones se observaron en donantes que utilizaban con frecuencia crema hidratante y fotoprotector solar.

Finalmente, el *p-Parabeno* se detectó en todas las orinas 1, pero fue inferior a LdD en 12 de las muestras. El valor medio mínimo de p-Parabeno encontrado en orina fue 0,001 ng/ng creatinina y el máximo fue 0,327 ng/ng creatinina. Las mayores concentraciones se observaron en los donantes que usaban con cierta frecuencia crema hidratante, leche corporal y fotoprotector solar (de una a 3 veces a la semana o más).

CONCENTRACIONES MEDIAS NORMALIZADAS DE CAFEÍNA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN ORINA (ng/ng creatinina)								
REF INT	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Dh-001	20,272	0,062	36,899	13,439	0,133	0,078	0,046	0,023
Dh-002	0,237	0,015	0,147	0,957	0,014	0,206	0,191	0,062
Dh-003	3,868	2,216	28,247	11,896	0,051	0,099	0,019	0,003
Dh-004	6,431	4,737	0,526	0,196	0,051	0,164	0,860	0,020
Dh-005	5,415	13,502	2,617	1,335	0,032	0,186	0,034	0,118
Dh-006	3,805	0,025	2,558	1,889	0,141	0,390	0,026	0,006
Dh-007	1,080	40,284	11,677	2,023	0,012	0,052	0,213	0,015
Dh-008	4,474	0,058	0,177	0,304	0,235	0,282	1,574	0,327
Dh-009	1,114	2,856	1,046	1,047	0,059	1,838	0,206	0,023
Dh-010	0,975	0,020	6,297	5,346	0,380	0,350	0,100	0,019
Dh-011	0,352	0,013	0,259	0,649	0,379	0,145	0,028	0,006
Dh-012	0,779	0,015	0,487	0,499	0,085	0,031	0,030	0,008
Dh-013	3,448	8,417	1,087	1,176	0,079	0,116	0,081	0,150
Dh-014	1,954	0,059	13,367	8,114	0,104	0,131	0,076	0,067
Dh-015	3,350	0,410	1,675	1,575	0,038	0,056	0,353	0,327
Dh-016	18,515	0,079	2,757	0,725	0,007	0,106	0,041	0,002
Dh-017	0,031	13,486	14,222	6,903	0,011	0,078	0,038	0,008
Dh-018	2,428	8,883	86,702	21,368	0,039	0,071	0,015	0,005
Dh-019	3,679	1,839	1,802	2,304	0,026	0,405	0,013	0,002
Dh-020	0,418	0,021	2,539	4,426	0,163	0,093	0,236	0,102
Dh-021	3,544	0,126	53,618	22,815	0,006	0,045	0,041	0,004
Dh-023	1,417	0,048	0,234	1,520	0,018	0,172	0,025	0,007
Dh-024	0,572	2,104	1,309	1,674	0,047	0,060	0,004	0,001
Dh-025	0,438	35,891	3,276	1,004	0,170	0,124	0,111	0,004
Dh-026	2,743	4,561	0,018	0,065	0,632	0,133	0,028	0,005

Tabla 10: Concentraciones medias normalizadas de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en la orina de los donantes de semen.

### 2.1.2.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en plasma seminal

En la Tabla 11, se muestran los valores mínimos y máximos que encontramos en plasma seminal de los donantes masculinos incluidos en este estudio.

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA ORINA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ml)	1,281	0,126	0,144	0,584	0,734	0,094	0,097	0,106
Valor máx. (ng/ml)	713,354	101,269	210,662	69,844	2,182	2,258	1,963	0,279
Media±DS	153,075±202,206	22,876±29,363	12,159±43,542	10,381±18,297	1,244±0,813	0,490±0,786	0,690±0,713	0,191±0,085
# <LdD (%)	0 (0%)	10 (40%)	2 (8%)	0 (0%)	22 (88%)	18 (72%)	18 (72%)	21 (84%)

Tabla 11: Valores mínimos y máximos media±DS y, número de muestras en las que no se detectaron en plasma seminal cafeína, cotinina y disruptores endocrinos (<LdD).

Como el plasma seminal fue recogido el mismo día que la orina 1, usaremos como referencia esta orina para establecer correlaciones. Las concentraciones detectadas en líquido folicular se recogen en la Tabla 12.

La concentración de *cotinina* fue inferior al LdD en el 40% de las muestras de plasma seminal, *daidzeína* en el 8%, *BPA* en el 88%, *MEHP* en el 72%, *m-Parabeno* en el 72% de las muestras y *p-Parabeno* en el 84% de las muestras.

La *cafeína* fue detectada en todos los plasma seminales de los donantes con concentraciones que iban de los 1,281 ng/ml a 713,354 ng/ml. En la mayoría de casos concentraciones altas de cafeína en orina suponían concentraciones altas en plasma seminal.

La concentración mínima de *cotinina* detectada fue 0,126 ng/ml y la máxima 101,269 ng/ml. Las mayores concentraciones de cotinina en plasma seminal se observaron en los grandes fumadores. En cuatro de los donantes que declararon no haber fumado nunca, se encontró cotinina en plasma seminal. En los otros nueve, la concentración era inferior a LdD. Cuando la concentración en orina era igual o superior a 0,086 ng/ng creatinina, ésta era detectada en plasma seminal.

Por otro lado, la *daidzeína* sólo pudo ser detectada en dos de las muestras de plasma seminal. La concentración mínima observada fue 0,144 ng/ml y la máxima 210,662 ng/ml. Pese a que los donantes no consumían soja en ninguna de las formas por las que eran preguntados, se

detectaba daidzeína en altas concentraciones que coincidían con los donantes con mayores concentraciones en orina 1.

La *genisteína* se detectó en todas las muestras de plasma seminal. La concentración mínima detectada fue 0,584 ng/ml y la máxima 69,844 ng/ml. Al igual que ocurría con la daidzeína, se encontró genisteína en el plasma seminal en diferentes concentraciones, aunque respondieron en el cuestionario que nunca consumían productos de soja y derivados.

Sólo se detectó *BPA* en 3 de los plasmas seminales. En el resto de muestras la concentración fue inferior al LdD. No encontramos ningún tipo de relación con las concentraciones encontradas en orina.

El *MEHP* se detectó en 7 de las muestras de plasma seminal. La concentración mínima detectada fue 0,094 ng/ml y la máxima 2,258 ng/ml. Dos de las mayores concentraciones más altas en orina coincidían con las concentraciones más altas en plasma seminal.

El *m-Parabeno* fue detectado en 7 de las muestras de plasma seminal, en el resto la concentración era inferior al LdD. La concentración mínima detectada fue 0,097 ng/ml y la máxima 1,963 ng/ml. Las mayores concentraciones en la orina 1, se relacionaban con altas concentraciones en plasma seminal.

Por último, el *p-Parabeno* fue detectado sólo en 4 de las muestras de plasma seminal en el resto la concentración era inferior al LdD. Solo en 3 de las muestras se detectó m-Parabeno y p-Parabeno. En estos 3 casos, los donantes declararon no usar nunca ninguno de los productos de higiene personal por los que fueron preguntados.

CONCENTRACIONES DE CAFEÍNA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN PLASMA SEMINAL (ng/ml)								
REF INT	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Dh-001	177,850	<LdD	6,992	6,259	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-002	1,317	<LdD	0,391	1,765	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-003	31,205	3,561	17,940	13,461	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-004	304,445	12,420	0,440	1,667	<LdD	0,101	0,453	<LdD
Dh-005	400,018	31,581	0,195	2,671	<LdD	<LdD	0,097	<LdD
Dh-006	100,516	<LdD	6,574	11,224	<LdD	0,094	<LdD	<LdD
Dh-007	29,896	101,269	2,702	1,547	<LdD	<LdD	1,963	0,247
Dh-008	33,987	0,126	1,048	1,264	<LdD	<LdD	0,117	<LdD
Dh-009	36,927	5,601	1,689	10,310	2,182	2,258	0,773	0,131
Dh-010	20,764	<LdD	16,472	17,972	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-011	37,898	<LdD	0,576	6,840	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-012	76,849	<LdD	1,307	4,358	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-013	184,564	14,358	1,609	2,016	<LdD	0,303	<LdD	0,106
Dh-014	47,468	<LdD	<LdD	7,605	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-015	696,394	1,084	0,735	3,255	<LdD	0,142	<LdD	<LdD
Dh-016	283,653	0,131	1,089	1,771	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-017	1,281	27,683	1,911	5,973	<LdD	<LdD	1,298	0,279
Dh-018	21,464	37,769	1,158	1,308	0,818	0,178	0,127	<LdD
Dh-019	34,041	8,959	0,535	15,487	<LdD	0,351	<LdD	<LdD
Dh-020	10,885	<LdD	0,144	1,339	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-021	301,125	<LdD	210,662	69,844	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-023	17,934	<LdD	0,333	68,055	0,734	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-024	25,331	10,011	4,799	2,160	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-025	713,354	75,634	0,352	0,782	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
Dh-026	237,717	12,958	<LdD	0,584	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD

Tabla 12: Concentraciones de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en el plasma seminal de los donantes de semen. <LdD: inferior al límite de detección.

### 2.1.3. Variables clínicas

#### 2.1.3.1. Parámetros seminales

Los parámetros seminales considerados (volumen, concentración, número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles) mostraron, en todos los casos, valores normales según los criterios establecidos por el programa de donación de semen de IVI-Valencia (Tabla 13).

El volumen del eyaculado osciló entre 2,1-6,5 ml con un volumen medio de  $3,8 \pm 1,1$  ml. La concentración/ml varió entre 22-113 millones/ml y la concentración media fue de  $55,3 \pm 24,3$  millones/ml. La concentración total varió de 66-376 millones siendo la concentración media fue  $199,0 \pm 79,0$  millones/ml. Los espermatozoides móviles progresivos variaron entre 21-72%. La media de espermatozoides móviles progresivos fue  $47,5 \pm 11,6\%$ . Los espermatozoides móviles no progresivos variaron entre 6-28%. La media de espermatozoides móviles no progresivos fue  $13,1 \pm 5,5\%$ . Los espermatozoides inmóviles variaron entre 19-64%. La media de espermatozoides móviles no progresivos fue de  $39,4 \pm 10,9\%$ .

REF INT	EDAD	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Volumen (ml)	Concentración (millones/ml)	Concentración Total (millones)	Progresivos (%)	No progresivos (%)	Inmóviles (%)
Dh-001	29,0	22,1	5,3	33,6	178,1	52,0	6,0	42,0
Dh-002	22,0	21,0	3,0	53,0	159,0	45,0	24,0	31,0
Dh-003	18,0	22,0	2,5	101,0	252,5	54,0	18,0	28,0
Dh-004	19,0	29,8	2,1	55,0	115,5	36,0	17,0	47,0
Dh-005	28,0	23,9	4,0	60,0	240,0	36,0	28,0	36,0
Dh-006	23,0	24,9	3,0	52,0	156,0	43,0	9,0	48,0
Dh-007	34,0	25,5	4,0	30,0	120,0	42,0	13,0	45,0
Dh-008	25,0	20,6	3,0	22,0	66,0	37,0	17,0	46,0
Dh-009	20,0	24,8	3,5	34,0	119,0	53,0	12,0	35,0
Dh-010	21,0	27,8	3,0	22,0	66,0	37,0	17,0	46,0
Dh-011	34,0	22,6	4,5	44,0	198,0	38,0	10,0	52,0
Dh-012	18,0	24,2	3,2	49,3	157,8	52,0	6,0	42,0
Dh-013	20,0	20,9	5,5	66,6	366,3	68,0	13,0	19,0
Dh-014	23,0	31,2	4,2	48,0	201,6	53,0	17,0	30,0
Dh-015	20,0	22,7	2,6	113,0	293,8	42,0	11,0	47,0
Dh-016	27,0	35,8	4,0	44,0	176,0	49,0	7,0	44,0
Dh-017	29,0	21,3	2,5	86,6	216,5	56,0	16,0	28,0
Dh-018	24,0	21,5	4,7	80,0	376,0	59,0	12,0	29,0
Dh-019	28,0	23,2	2,5	81,0	202,5	21,0	15,0	64,0
Dh-020	29,0	20,3	3,2	78,0	249,6	62,0	6,0	32,0
Dh-021	24,0	25,7	5,3	36,6	194,0	42,0	15,0	43,0
Dh-023	23,0	21,6	6,5	27,0	175,5	57,0	10,0	33,0
Dh-024	21,0	23,5	4,2	37,0	155,4	35,0	9,0	56,0
Dh-025	30,0	24,0	4,0	70,0	280,0	72,0	8,0	20,0
Dh-026	21,0	16,3	4,5	58,0	261,0	47,0	12,0	41,0
Media±DS	24,4±4,7	23,9±4,0	3,8±1,1	55,3±24,3	199,0±79,0	47,5±11,6	13,1±5,5	39,4±10,9

Tabla 13: Edad, IMC, parámetros seminales y medias±DS de los donantes de semen.

### 2.1.3.2. FISH de espermatozoides

Se evaluaron un total de 2000 a 9000 espermatozoides para los cromosomas X, Y, 18 y 2000 a 8000 espermatozoides para los cromosomas 13 y 21. Los valores de disomías para cada uno de los cromosomas y el porcentaje de espermatozoides diploides tras el estudio de FISH de espermatozoides de nuestro grupo control se compararon con los valores de referencia de muestras obtenidas de una población control de 10 donantes fértiles normozoospermicos fueron en todos los casos similares a los previamente publicados en pacientes normozoospermicos y se consideraron dentro de los valores normales, sin ningún hallazgo relevante (Tabla 15). Los resultados obtenidos se encuentran en los valores obtenidos en nuestro grupo control, siendo el resultado de todas las FISH de espermatozoides normal. A nivel clínico, consideramos que un resultado de FISH es anormal cuando se observa un incremento significativo de disomías y diploidías para los cromosomas analizados al compararlos con los de la población control (Tabla 14).

Espermatozoides analizados		DISOMÍAS AUTOSOMAS (%)			DISOMÍAS CROMOSOMAS SEXUALES (%)	DIPLOIDÍA TOTAL (%)
XY/18	13/21	Cr-13	Cr-16	Cr-21		
6821	7467	12 (0,16)	3 (0,004)	19 (0,25)	23 (0,34)	39 (0,27)

Tabla 14: Tabla grupo control en espermatozoides de testículo (Rodrigo et al, 2011).

REF INT	Sptz. X,Y,18	% sptz.X	% sptz.Y	% DIS X,Y	% DIS 18	% DIPL.X,Y,18	Sptz.13,21	% DIS 13	%DIS 21	% DIP 13,21
Dh-001	9552	50,23	49,77	0,06	0,01	0,02	7469	0,03	0,01	0,01
Dh-002	5472	48,73	51,27	0,07	0,00	0,02	2046	0,05	0,10	0,00
Dh-003	5631	50,63	49,37	0,14	0,00	0,00	5136	0,02	0,02	0,02
Dh-004	6119	50,28	49,72	0,03	0,00	0,08	5842	0,00	0,02	0,00
Dh-005	4438	50,19	49,81	0,02	0,00	0,00	2016	0,00	0,15	0,00
Dh-006	5624	49,64	50,36	0,04	0,02	0,00	3094	0,00	0,00	0,00
Dh-007	6038	50,34	49,66	0,13	0,00	0,12	3250	0,00	0,00	0,00
Dh-008	6986	50,92	49,08	0,04	0,00	0,04	7089	0,01	0,01	0,00
Dh-009	5772	52,99	47,01	0,03	0,00	0,02	5823	0,00	0,05	0,00
Dh-010	5685	51,01	48,99	0,00	0,00	0,04	4598	0,02	0,02	0,00
Dh-011	6529	50,54	49,46	0,08	0,08	0,41	8069	0,01	0,04	0,06
Dh-012	5652	51,22	48,78	0,04	0,02	0,02	2053	0,00	0,00	0,00
Dh-013	4426	50,73	49,27	0,02	0,05	0,00	2007	0,00	0,00	0,00
Dh-014	2078	48,00	52,00	0,05	0,00	0,00	2101	0,00	0,14	0,00
Dh-015	4900	49,48	50,52	0,00	0,00	0,02	5079	0,02	0,00	0,00
Dh-016	4387	49,08	50,92	0,11	0,00	0,02	4201	0,05	0,02	0,00
Dh-017	2009	49,63	50,37	0,10	0,00	0,00	2064	0,00	0,15	0,00
Dh-018	2034	51,84	48,16	0,05	0,00	0,00	2047	0,00	0,05	0,00
Dh-019	2189	52,61	47,39	0,00	0,05	0,00	2002	0,10	0,10	0,00
Dh-020	4981	49,99	50,01	0,04	0,02	0,02	5002	0,00	0,02	0,02
Dh-021	5065	49,18	50,82	0,08	0,00	0,00	5050	0,04	0,06	0,02
Dh-023	2028	47,40	52,60	0,10	0,10	0,05	2106	0,00	0,09	0,00
Dh-024	5346	49,29	50,71	0,11	0,04	0,00	5003	0,04	0,06	0,00
Dh-025	3898	47,25	52,75	0,03	0,03	0,05	2580	0,04	0,00	0,00
Dh-026	2165	47,82	52,18	0,23	0,09	0,00	2099	0,00	0,05	0,00
Media±DS	4760,16±1868,80	49,96±1,46	50,04±1,46	0,06±0,05	0,02±0,03	0,04±0,08	3913,04±1956,86	0,02±0,02	0,05±0,05	0,01±0,01

Tabla 15: Resultado de la FISH de espermatozoides de los donantes de semen. Sptz: Espermatozoides. DIS: disomía. DIPL: diploidía.

## 2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.2.1. Relación entre estilo de vida y variables clínicas

De todas las variables de exposición que aparecen en el cuestionario, se detallan, a continuación, aquellas en las que se observaron diferencias significativas:

- En cuanto a la **ACTIVIDAD FÍSICA**, los donantes fueron preguntados por la frecuencia con la que caminaban al día. Las respuestas se categorizaron como sigue: no camina casi nunca, menos de 20 minutos al día, 20-40 minutos al día, 40-60 minutos al día, entre 1 y 1 hora y media al día ó más de 1 hora y media al día. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tiempo dedicado a las tareas del hogar y el porcentaje de **disomías de los cromosomas sexuales** ( $p=0,020$ ).
- Respecto al **CONSUMO DE SOJA**, a los donantes se les preguntó con qué frecuencia consumían harina de soja, yogur de soja, leche de soja, soja en bruto, soja germinada, natto, tempeh, miso, tofu y salsa de soja. Las respuestas se clasificaron en dos grupos: nunca o alguna vez al mes. Se encontró un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de **disomías de autosomas** con el consumo de miso ( $p=0,041$ ), el consumo de soja germinada ( $p=0,047$ ) y el consumo de tofu y ( $p=0,041$ ). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas positivas para las **disomías de cromosomas sexuales** y el consumo de yogur de soja ( $p=0,050$ ) y de soja germinada ( $p=0,044$ ). Se encontró un incremento estadísticamente significativo en el **volumen de eyaculado** con el consumo de miso ( $p=0,024$ ) y con el consumo de tofu y el ( $p=0,024$ ). Se observó una disminución estadísticamente significativa del **porcentaje de espermatozoides progresivos** ( $p=0,045$ ) y un aumento del **porcentaje de espermatozoides inmóviles** ( $p=0,030$ ) con el consumo de leche de soja.
- Los donantes informaron de su frecuencia de consumo de **ALIMENTOS VARIOS**. Sus respuestas fueron categorizadas en tres grupos: consumo alguna vez al mes, consumo una o varias veces a la semana y consumo una vez al día o más. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las **disomías de autosomas** con el consumo de yogur ( $p=0,022$ ) y con el consumo de carne ( $p=0,046$ ). También se encontró correlación para **porcentaje de diploides totales** con el consumo de vísceras ( $p=0,023$ ), con el consumo de aceitunas enlatadas ( $p=0,042$ ) y con el consumo aún enlatado ( $p=0,028$ ). El consumo de verdura fresca se correlacionó con el **porcentaje de espermatozoides inmóviles** ( $p=0,007$ ) y con el **porcentaje de espermatozoides progresivos** ( $p=0,027$ ).

- Las respuestas sobre el uso de productos de **HIGIENE PERSONAL** como crema hidratante, leche corporal, fotoprotector solar, autobronceador, maquillaje, desmaquillante y esmalte de uñas, se agruparon en tres categorías: semanal/diariamente, mensualmente y nunca. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la **concentración total** de espermatozoides y el uso de fotoprotector solar ( $p=0,047$ ).
- Los donantes fueron preguntados si usaban **ENVASES DE PLÁSTICO** para almacenar alimentos (sí/no) y si calentaban los alimentos contenidos en un envase de plástico (sí/no). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre calentar comida en recipiente de plástico y el **porcentaje de espermatozoides no progresivos** ( $p=0,001$ ).

### 2.2.2. Relación entre concentraciones de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina y plasma seminal y, variables clínicas

De las determinaciones realizadas en orina y plasma seminal se observaron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes analitos:

- Con respecto a la **DAIDZEÍNA**, se observó un incremento estadísticamente significativo del **porcentaje de disomías de autosomas** y la concentración en orina ( $p=0,031$ ) y en plasma seminal ( $p=0,004$ ) y para el **porcentaje de diploides totales** y la concentración en plasma seminal ( $p=0,008$ ) (Figura 21).

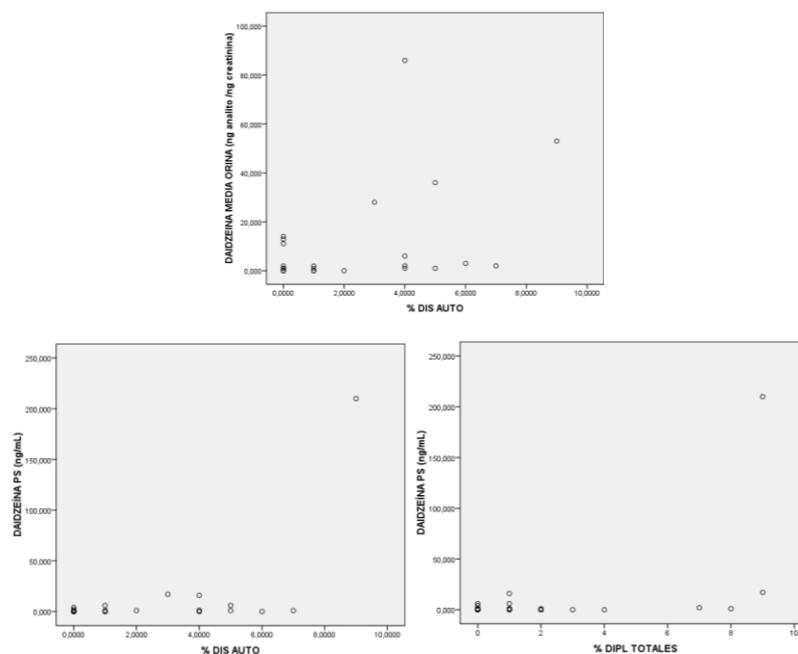


Figura 21: Relación entre la concentración de daidzeína en orina y plasma seminal y el porcentaje de disomías de autosomas y de diploides totales.

- En el caso de la **GENISTEÍNA**, se observó un aumento estadísticamente significativo en el **porcentaje de disomías de cromosomas sexuales** ( $p=0,027$ ) y en el **volumen** del eyaculado ( $p=0,025$ ) y la concentración en el plasma seminal (Figura 22).

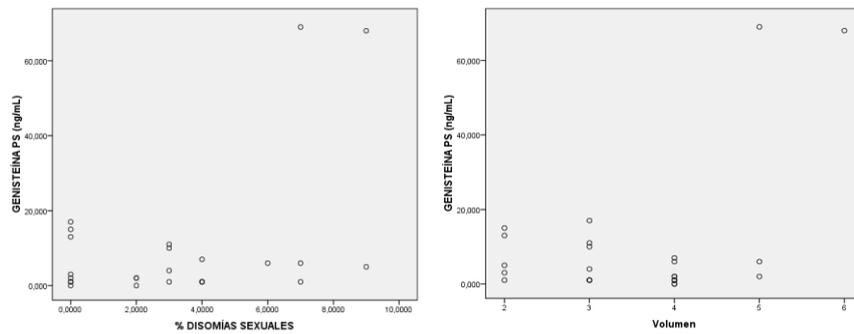


Figura 22: Relación entre la concentración de genisteína en plasma seminal y el porcentaje de disomías de cromosomas sexuales y el volumen de eyaculado.

- Se observaron diferencias estadísticamente significativas positivas entre la concentración de **m-PARABENO** en plasma seminal y el **porcentaje de espermatozoides no progresivos** ( $p=0,003$ ) (Figura 23).

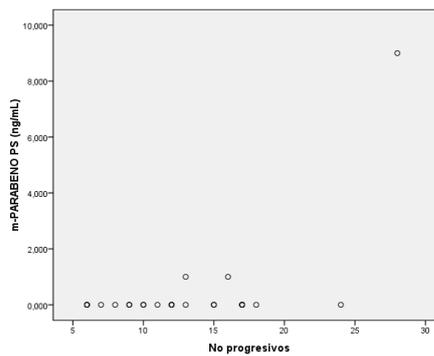


Figura 23: Relación entre la concentración de m-Parabeno en plasma seminal y porcentaje de espermatozoides no progresivos.

- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas positivas entre la concentración media de **p-PARABENO** en orina y el porcentaje de **disomías de cromosomas sexuales** ( $p=0,008$ ) (Figura 24).

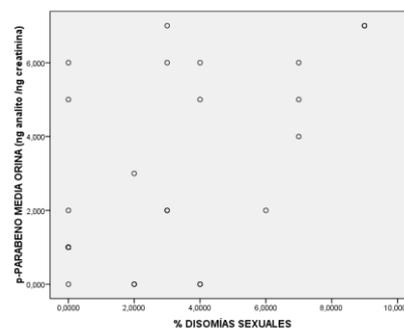


Figura 24: Relación entre la concentración de p-Parabeno en orina y porcentaje de disomías de cromosomas sexuales.

- Se observaron diferencias significativas positivas entre la concentración media en orina de **MEHP** y la **concentración/ml** ( $p=0,035$ ) (Figura 25).

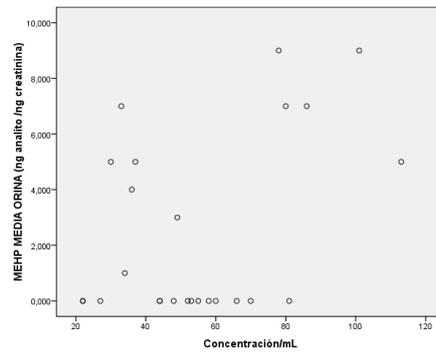


Figura 25: Relación entre la concentración de MEHP en orina y la concentración/ml.

### 3. RESULTADOS DE LAS PACIENTES FEMENINAS

#### 3.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

##### 3.1.1. Variables demográficas: características poblacionales

Nuestro estudio incluyó diez pacientes femeninas que acudían a TRA en IVI-Valencia. El rango de edad de las mujeres incluidas fue de 30-38 años y la edad media fue de  $34,5 \pm 3,0$  años. El rango de IMC de las pacientes femeninas fue de 17,7 a  $30 \text{ kg/m}^2$  y la media de  $23,0 \pm 4,1 \text{ kg/m}^2$  (Tabla 19). Nueve de las pacientes femeninas (90%) habían nacido en España, todas eran de raza caucásica y 7 tenían su residencia en la ciudad de Valencia o alrededores y las restantes en otras provincias españolas. En cuanto al nivel educativo de las pacientes femeninas, 7 de las 10 pacientes femeninas (70%) habían cursado estudios universitarios, 1 (10%) formación profesional, una (10%) educación secundaria y una de las pacientes femeninas (10%) había cursado educación primaria. Debido a la profesión desarrollada por las pacientes femeninas, una de ellas (10%) estaba expuesta ocupacionalmente a compuestos químicos.

##### 3.1.2. Variables de exposición

###### 3.1.2.1. Estilo de vida

Tras el análisis de los cuestionarios cumplimentados por el grupo de las pacientes femeninas, en el Anexo V se detalla la distribución de la población en cuanto a la actividad física realizada, consumo de alimentos varios y bebidas, rutina en la higiene personal, tabaquismo, contacto con plásticos y consumo de fármacos.

###### 3.1.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina

###### 3.1.2.2.1. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina

De los 10 pacientes femeninas incluidas en el estudio, seis aportaron dos muestras de orina (orinas 1 y 2). En la tabla 16 se detallan los valores mínimos y máximos que se encontraron en las orinas de las pacientes femeninas de nuestro estudio. En las primeras orinas fueron detectados todos los disruptores endocrinos analizados y la cafeína. La cotinina solo fue detectada en tres de las orinas 1, el resto presentaba una concentración inferior al LdD. En las segundas orinas (orina 2) no fue detectado p-Parabeno ( $< \text{LdD}$ ) en una de las muestras, ni la cotinina en cinco de las muestras analizadas ( $< \text{LdD}$ ).

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ng creatinina)	1,532	0,008	1,249	1,146	0,057	0,025	0,051	0,004
Valor máx. (ng/ng creatinina)	37,242	8,068	307,371	83,902	2,422	0,127	2,624	0,568
Media±DS	17,116±14,513	3,662±4,259	58,445±94,684	19,747±26,756	0,490±0,761	0,070±0,043	0,850±0,931	0,117±0,182

Tabla 16: Valores mínimos y máximos medios y,  $media \pm DS$  de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos detectados en la orina de las pacientes femeninas.

Para la descripción de los resultados consideraremos siempre que dispongamos de él, del valor medio de las orinas 1 y 2. En la Tabla 17 se muestran los niveles de cafeína, cotinina y todos los disruptores endocrinos analizados en orina de las pacientes femeninas.

En cuanto a la *cafeína*, fue detectada en todas las muestras de orina, con valor medio mínimo de 1,532 ng/ng creatinina y máximo de 37,242 ng/ng creatinina. Las pacientes femeninas que se declararon grandes consumidoras de cafeína (tomaban café diariamente) tenían concentraciones superiores a 7,486 ng cafeína/ng creatinina.

Con respecto a la *cotinina* fue detectada tres muestras de orina 1 y en una muestra de la orina 2. En el resto la concentración fue inferior al LdD. El valor medio mínimo de cotinina encontrado en orina fue 0,008 ng/ng creatinina y el máximo 8,068 ng/ng creatinina. La concentración de cotinina fue inferior al LdD en no fumadoras y exfumadoras. Las mayores concentraciones medias en orina fueron detectada en la única paciente fumadora y en una paciente que se declaró exfumadora.

La *daidzeína*, se detectó en todas las muestras de orina. Las pacientes declararon nulo consumo de soja en diversas formas pero el valor medio mínimo de daidzeína encontrado fue 1,249 ng/ng creatinina y el máximo 307,371 ng/ng creatinina. Las concentraciones de daidzeína parecían independientes del consumo de soja en diferentes formas. Se observaba una alta variación entre las concentraciones de la orina 1 y 2.

La *genisteína* se detectó en todas las muestras de orina. Aunque las pacientes femeninas declararon nulo consumo de soja en diversas formas, el valor medio mínimo de genisteína fue 1,146 ng/ng creatinina y el máximo 83,902 ng/ng creatinina. Las concentraciones de genisteína parecían independientes del consumo de soja en diferentes formas, con una alta variación entre las concentraciones de las orinas 1 y 2.

Por otro lado, el *BPA* fue detectado en todas las muestras de orina. El valor medio mínimo de BPA detectado en orina fue 0,057 ng/ng creatinina y el máximo 2,422 ng/ng creatinina. La concentración de BPA media en orina parecía independiente del consumo de agua del grifo, enlatados y envasados pero, se observaban concentraciones medias en orina más altas en consumidoras frecuentes (consumo diario) de agua en botella de plástico. La concentración de BPA media en orina parecía independiente de reutilizar la botella de agua de plástico, de almacenar alimentos en recipiente de plástico, de calentar la comida en recipiente de plástico y de ser portadora de empastes.

En cuanto al *MEHP*, se detectó en todas las muestras de orina. Las concentraciones en las orinas 1 y 2 fueron similares. El valor medio mínimo de MEHP encontrado en orina fue 0,025 ng/ng creatinina y el máximo 0,127 ng/ng creatinina. La concentración de MEHP media en orina parecía independiente del consumo de bebidas embotelladas, enlatados y envasados y del contacto con plásticos. Las mayores concentraciones de MEHP se observaron en pacientes usuarias frecuentes de leche corporal y fotoprotector solar.

El *m-Parabeno* se detectó en todas las muestras de orina. El valor medio mínimo detectado en orina fue 0,051 ng/ng creatinina y el máximo 2,624 ng/ng creatinina. Se obtuvieron concentraciones similares en ambas orinas. Las mayores concentraciones se observaron en pacientes femeninas que utilizaban con frecuencia leche corporal y fotoprotector solar.

Finalmente, el *p-Parabeno* se detectó en todas las orinas. El valor medio mínimo de p-Parabeno detectado en orina fue 0,004 ng/ng creatinina y el máximo 0,568 ng/ng creatinina. Las mayores concentraciones se detectaron en las pacientes femeninas que usaban diariamente leche corporal.

CONCENTRACIONES MEDIAS NORMALIZADAS DE CAFEÍNA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN ORINA (ng/ng creatinina)								
REF INT	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Pm-001	1,532	<LdD	307,371	35,291	1,133	0,042	1,958	0,307
Pm-002	3,645	<LdD	15,163	83,902	0,057	0,025	0,225	0,004
Pm-003	35,872	8,068	4,352	2,702	0,060	0,034	0,098	0,008
Pm-004	5,348	<LdD	1,249	1,146	0,078	0,113	1,034	0,112
Pm-005	7,486	0,017	16,878	3,688	0,116	0,109	1,654	0,030
Pm-006	32,602	<LdD	91,359	31,689	0,077	0,028	0,642	0,048
Pm-008	28,370	0,008	4,796	2,743	0,275	0,027	0,106	0,041
Pm-009	10,472	<LdD	101,470	31,835	0,595	0,127	2,624	0,568
Pm-012	37,242	<LdD	3,593	2,161	2,422	0,077	0,105	0,040
Pm-015	8,587	6,555	38,220	2,314	0,092	0,119	0,051	0,014

Tabla 17: Concentraciones medias normalizadas de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en la orina de las pacientes femeninas.  
<LdD: inferior al límite de detección de la técnica.

### 3.1.2.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en líquido folicular

Recibimos líquido folicular de nueve de las diez pacientes incluidas en este estudio. En la Tabla 18, se muestran los valores mínimos y máximos que encontramos en líquido folicular de las pacientes femeninas.

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ml)	2,830	0,008	0,000	0,260	0,355	0,532	0,852	0,479
Valor máx. (ng/ml)	910,733	19,165	0,000	1,602	15,343	13,749	2,561	1,024
Media±DS	385,429±298,370	4,126±7,689	0,000±0,000	0,978±0,676	4,425±5,345	2,727±4,195	1,307±0,577	0,681±0,214
# <LdD (%)	0 (0%)	3 (33,3%)	9 (100%)	6 (66,7%)	2 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (44,4%)

Tabla 18: Valores mínimos y máximos, media±DS y, número de muestras en las que no se detectaron en líquido folicular de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos (<LdD).

Como el líquido folicular fue recogido el mismo día que la orina 1, usaremos como referencia la media esta orina para establecer correlaciones. Las concentraciones detectadas en líquido folicular se recogen en la Tabla 19.

La concentración de *cotinina* fue inferior al LdD en el 33,3% de las muestras de plasma seminal, *daidzeína* en el 100%, *genisteína* en el 66,7%, *BPA* en el 22,2%, y *p-Parabeno* en el 44,4% de las muestras.

La *cafeína* fue detectada en concentraciones que iban de 2,830 ng/ml a 910,733 ng/ml. Las concentraciones altas de cafeína en orina suponían concentraciones altas en el líquido folicular. Las mayores concentraciones de cafeína aparecían en el líquido folicular de consumidoras diarias de café.

En cuanto a la *cotinina*, fue detectada en seis de los líquidos foliculares. La concentración mínima detectada fue 0,008 ng/ml y la máxima 19,165 ng/ml. Las mayores concentraciones de cotinina en líquido folicular se observaron en la única paciente fumadora y en una paciente que se declaró exfumadora.

La *daidzeína* no pudo ser medida ninguna de las muestras de líquido folicular. La *genisteína* se detectó en tres de los nueve líquidos foliculares, coincidiendo con las mayores concentraciones encontradas en la orina 1. En el resto, la concentración fue inferior al LdD. Las

concentraciones mínima y máxima encontradas fueron 0,260 ng/ml y 1,602 ng/ml. Ninguna de las pacientes consumía productos de soja y derivados.

Se detectó *BPA* en 7 de los líquidos foliculares. Las concentraciones mínima y máxima detectadas fueron 0,355 ng/ml y 15,343 ng/ml, sin relación con las concentraciones detectadas en orina. No se encontró relación con el consumo de alimentos enlatados, o envasados, ni con el contacto con plásticos para almacenar o calentar alimentos.

El *MEHP* se detectó en todas las muestras de líquido folicular. Las concentraciones mínima y máxima encontradas fueron 0,532 ng/ml y 13,749 ng/ml. Las mayores concentraciones en líquido folicular no se correlacionaron con las encontradas en la orina. No se observó relación con el consumo de enlatados, envasados, con almacenar o calentar alimentos en plástico ni con el uso de ninguno de los productos de higiene personal por los que fueron preguntadas.

El *m-Parabeno* fue detectado todas las muestras de líquido folicular. Las concentraciones mínima y máxima detectadas fueron 0,852 ng/ml y 2,561 ng/ml. Las mayores concentraciones en la orina no se relacionaban con altas concentraciones en líquido folicular y se observaron en usuarias de leche corporal.

Por último, *p-Parabeno* fue detectado en 5 de las muestras de líquido folicular en mujeres usuarias diarias de leche corporal. Las concentraciones mínima y máxima detectadas fueron 0,479 ng/ml y 1,024 ng/ml.

CONCENTRACIONES DE CAFEÍNA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN LÍQUIDO FOLICULAR (ng/ml)								
REF INT	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Pm-001	25,097	<LdD	0,000	<LdD	0,355	1,277	1,451	0,479
Pm-002	2,830	<LdD	0,000	1,602	6,898	2,323	1,124	<LdD
Pm-003	262,912	5,520	0,000	<LdD	3,493	1,420	0,942	<LdD
Pm-004	291,828	0,036	0,000	<LdD	<LdD	2,600	2,561	1,024
Pm-005	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Pm-006	477,347	<LdD	0,000	1,073	<LdD	13,749	0,852	<LdD
Pm-008	910,733	0,008	0,000	<LdD	15,343	0,578	0,954	0,638
Pm-009	452,895	0,016	0,000	0,260	0,768	0,532	0,976	0,537
Pm-012	729,522	0,010	0,000	<LdD	3,485	0,781	0,993	<LdD
Pm-015	315,700	19,165	0,000	<LdD	0,632	1,284	1,911	0,726

*Tabla 19: Concentraciones de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en el líquido folicular de las pacientes femeninas.  
<LdD: inferior al límite de detección. N/A: no disponible.*

### 3.1.3. Variables clínicas

#### 3.1.3.1. Estimulación y respuesta ovárica

A continuación, se describen las variables clínicas más relevantes relacionadas con el protocolo de estimulación ovárica aplicado y los resultados en cuanto al E2 obtenido el día de la administración de la hCG para el desencadenamiento de la ovulación y, la respuesta ovárica valorada por el número total de ovocitos aspirados y el número de ovocitos MII.

La media de días de estimulación fue  $10,0 \pm 1,6$ . El número medio de folículos antrales fue  $15,3 \pm 8,1$ . La media de E2 fue  $1853,0 \pm 862,5$  pg/ml. La dosis media diaria de FSH fue de  $189,4 \pm 47,3$  mUI/ml. La dosis media total de FSH fue de  $1932,6 \pm 750,8$  mUI/ml. La dosis media de HMG fue de  $839,1 \pm 358,5$  mUI/ml. El número medio de ovocitos por punción fue de  $13,5 \pm 8,0$ . El número medio de ovocitos metafase II por punción fue de  $9,2 \pm 4,9$  (Tabla 20).

REF INT	EDAD	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Estimulación(Días)	N° antrales	E2 (Día hCG) (pg/ml)	Dosis diaria FSH (mUI/ml)	Dosis total FSH (mUI/ml)	hMG (mUI/ml)	N° ovocitos punción	MII
Pm-001	37	20,31	7	10+6	839	193	1.350	750	9	8
Pm-002	34	22,58	9	N/A	1.808	200	1.800	N/A	31	16
Pm-003	30	19,05	10	14+12	2.733	150	1.500	N/A	19	18
Pm-004	30	21,72	10	N/A	1.911	173	1.725	488	8	5
Pm-005	37	31,24	10	N/A	850	190	1.900	750	7	4
Pm-006	37	27,41	11	N/A	2.853	200	2.200	1.650	5	4
Pm-008	32	17,69	9	N/A	3.262	100	900	675	20	12
Pm-009	34	25,65	10	N/A	950	180	1.800	600	9	7
Pm-012	36	24,51	11	3+4	1.725	225	2.475	825	16	11
Pm-015	38	20,7	13	4+8	1.599	283	3.675	975	11	7
Media±DS	34,5±3,0	23,1±4,1	10,0±1,6	15,3±8,1	1853,0±862,5	189,4±47,3	1932,6±750,8	839,1±358,5	13,5±8,0	9,2±4,9

Tabla 20: Edad, IMC, estimulación y respuesta ovárica de las pacientes. N/A: dato no disponible.

### 3.1.3.2. Resultados de los ciclos de PGS

De las 10 parejas incluidas en el estudio, siete llevaron a cabo el análisis de los embriones mediante PGS (dos por FI, dos por AR y tres por FM). De estas diez parejas, una vitrificó para acumular embriones y dos hicieron transferencia embrionaria sin PGS. Tres de las parejas hicieron el PGS a partir de ovocitos frescos, dos de ellas a partir de embriones vitrificados en día 3 de desarrollo (D3) y dos de ellas hicieron un ciclo mixto D3 (ovocitos frescos y embriones vitrificados en D3). Las parejas tuvieron una media de  $6,0 \pm 1,7$  embriones analizados. La media del porcentaje de embriones anormales fue del  $60,8 \pm 15,8\%$ . Seis de las siete parejas que hicieron PGS tuvieron al menos un embrión euploide para transferir. Tres de las parejas con transferencia tuvieron gestación clínica (Tabla 21).

REF INT	Indicación	Origen embriones	Nº embriones analizados	% embrión anormal	Transferencia	Gestación
P-001	FI	Vitrificados D3	4	75,0	SÍ	NO
P-002	FI	Vitrificados D3	4	50,0	SÍ	SÍ
P-003	FM	Ovocito fresco	8	62,5	SÍ	NO
P-004	Transferencia sin PGS					
P-005	AR	Mixto D3	6	50,0	SÍ	SÍ
P-006	AR	Mixto D3	7	85,7	SÍ	NO
P-008	FM	Ovocito fresco	5	40,0	SÍ	SÍ
P-009	Transferencia sin PGS					
P-012	FM	Ovocito fresco	8	62,5	NO	NO
P-015	Vitrificación					
Media±DS			$6,0 \pm 1,7$	$60,8 \pm 15,8$		

Tabla 21: Resultados de los ciclos de PGS.

## 3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

### 3.2.1. Relación entre estilo de vida y variables clínicas

No encontramos relación estadísticamente significativa entre ninguno de los parámetros relacionados con el estilo de vida (cuestionario) y las variables clínicas (estimulación y respuesta ovárica y, tasa de embrión anormal y tasa de gestación en el ciclo de PGS).

### 3.2.2. Relación entre concentraciones de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina y líquido folicular y, variables clínicas

De las determinaciones realizadas en orina y líquido folicular solo se observó una asociación negativa estadísticamente significativa entre la concentración de **BPA** en líquido folicular y el porcentaje de **embrión anormal** por ciclo ( $p=0,015$ ) (Figura 26).

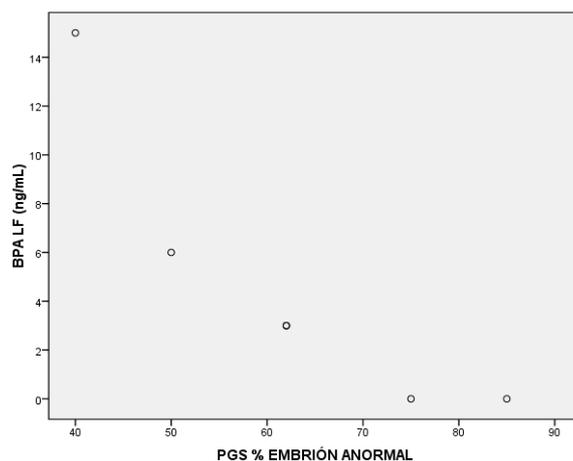


Figura 26: Relación entre la concentración de BPA en líquido folicular y el porcentaje de embrión anormal.

Asimismo, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa, se observó una tendencia al aumento del porcentaje de **embriones anormales** conforme aumentaba la concentración media en orina de **CAFEÍNA** (ng/ng creatinina)

### 3.2.3. Comparación entre disruptores endocrinos, cafeína y cotinina de las pacientes y controles femeninos

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración de **BPA** media en la orina en pacientes femeninas con respecto a las donantes femeninas ( $p=0,0155$ ).

Con respecto al tabaquismo, se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración de **COTININA** en líquido folicular en donantes femeninas comparado con las pacientes ( $p=0,0294$ ), posiblemente asociado al mayor consumo de tabaco en las donantes incluidas en este estudio.

### 3.2.4. Comparación de estimulación y respuesta ovárica entre donantes y pacientes femeninas

No encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos parámetros de respuesta ovárica a la estimulación entre el grupo de donantes de ovocitos y el de pacientes femeninas.

## 4. RESULTADOS DE LOS PACIENTES MASCULINOS

### 4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

#### 4.1.1. Variables demográficas: características poblacionales

Nuestro estudio incluyó diez pacientes masculinos que acudían a TRA en IVI-Valencia. El intervalo de edad de los pacientes masculinos era de 31-39 años con una edad media de  $36,1 \pm 2,6$  años. El intervalo de IMC de los pacientes masculinos fue de 19,5 a 31,7  $\text{kg/m}^2$ , con un IMC medio de  $24,7 \pm 3,6$   $\text{kg/m}^2$  (Tabla 24). Todos los pacientes masculinos habían nacido en España, eran de raza caucásica y 7 tenían su residencia en la ciudad de Valencia o alrededores y las restantes en otras provincias españolas. En cuanto al nivel educativo de los pacientes masculinos, cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) habían cursado estudios universitarios, dos (20%) formación profesional, dos (20%) educación secundaria y uno de los pacientes masculinos (10%) había cursado educación primaria. Debido a la profesión desarrollada por los pacientes masculinos, uno (10%) de ellos estaba expuesto ocupacionalmente a compuestos químicos.

#### 4.1.2. Variables de exposición

##### 4.1.2.1. Estilo de vida

Tras el análisis de los cuestionarios cumplimentados por el grupo de los pacientes masculinos, en el Anexo V se detalla la distribución de la población en cuanto a la actividad física realizada, consumo de alimentos varios y bebidas, rutina en la higiene personal, tabaquismo, contacto con plásticos y consumo de fármacos.

##### 4.1.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina

###### 4.1.2.2.1. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina

De los 10 pacientes masculinos incluidos en el estudio, seis aportaron dos muestras de orina (orinas 1 y 2). En todas las primeras y segundas orinas fueron detectados todos los disruptores endocrinos analizados así como la cafeína y la cotinina. En la Tabla 22, se muestran los valores mínimos y máximos que encontramos en orina de los pacientes masculinos de nuestro estudio. Para la descripción de los resultados consideraremos, siempre que dispongamos de él, el valor medio de las orinas 1 y 2 (Tabla 23).

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ng creatinina)	0,194	0,005	0,869	0,685	0,066	0,018	0,035	0,012
Valor máx. (ng/ng creatinina)	10,460	34,608	21,853	16,216	3,598	0,106	5,748	0,819
Media±DS	5,125±3,177	4,862±10,733	8,705±7,017	4,394±4,755	1,037±1,189	0,067±0,031	0,868±1,671	0,162±0,244

Tabla 22: Valores mínimos y máximos medios y,  $media \pm DS$  de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos detectados en la orina de los pacientes masculinos.

La *cafeína* fue detectada en todas las muestras de orina. Los valores mínimo y máximo detectados fueron 0,194 ng/ng creatinina y 10,460 ng/ng creatinina. Los mayores consumidores de cafeína (café y refrescos con cafeína) tuvieron mayores concentraciones medias de cafeína.

La *cotinina* fue detectada en todas las muestras de orina. Los valores mínimo y máximo encontrados fueron 0,005 ng/ng creatinina y 34,608 ng/ng creatinina. Dos de los pacientes masculinos eran exfumadores y presentaron las concentraciones medias más altas en orina.

La *daidzeína*, se detectó en todas las muestras de orina. Los pacientes masculinos, declararon escaso o nulo consumo de soja en diversas formas pero el valor medio mínimo de daidzeína encontrado en orina fue 0,869 ng/ng creatinina y el máximo 21,853 ng/ng creatinina. Las concentraciones de daidzeína parecían independientes del consumo de soja en diferentes formas.

La *genisteína* se detectó en todas las muestras de orina. Los pacientes masculinos, declararon escaso o nulo consumo de soja en diversas formas pero los valores medios mínimo y máximo detectados fueron 0,685 ng/ng creatinina y 16,216 ng/ng creatinina. Las concentraciones de genisteína parecían independientes del consumo de soja en diferentes formas.

El *BPA* fue detectado en todas las muestras de orina. Los valores mínimo y máximo detectados fueron 0,066 ng/ng creatinina y 3,598 ng/ng creatinina. Las mayores concentraciones medias en orina que se encontraron en pacientes no se asociaban ni al consumo de alimentos envasados, ni enlatados, ni al contacto con plásticos.

El *MEHP* se detectó en todas las muestras de orina. Los valores mínimo y máximo detectados fueron 0,018 ng/ng creatinina y 0,106 ng/ng creatinina. La concentración fue independiente

del consumo de bebidas embotelladas, enlatados, envasados y el uso de productos de higiene personal.

El *m-Parabeno* se detectó en todas las muestras de orina con un valor mínimo de 0,035 ng/ng creatinina y un máximo de 5,748 ng/ng creatinina. No se encontró ninguna relación entre los niveles de m-Parabeno y el uso de productos de higiene personal por los que se preguntó.

Finalmente, el *p-Parabeno* se detectó en todas las orinas. El valor mínimo encontrado fue 0,012 ng/ng creatinina y el máximo 0,819 ng/ng creatinina. No se encontró ninguna relación entre los niveles de p-Parabeno y el uso de productos de higiene personal por los que se preguntó a los pacientes masculinos.

CONCENTRACIONES MEDIAS NORMALIZADAS DE CAFEÍNA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN ORINA (ng/ng creatinina)								
REF INT	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Ph-001	4,856	0,042	16,985	5,212	1,536	0,060	0,199	0,034
Ph-002	2,554	0,010	16,841	16,216	0,212	0,095	0,171	0,031
Ph-003	3,868	34,608	1,020	0,685	2,695	0,101	0,144	0,018
Ph-004	5,732	0,005	0,869	1,069	0,077	0,106	0,048	0,012
Ph-005	10,460	13,807	8,312	9,588	0,676	0,054	1,183	0,819
Ph-006	1,383	0,031	3,839	1,459	0,066	0,018	0,096	0,021
Ph-008	5,214	0,045	21,853	4,249	0,078	0,095	0,944	0,338
Ph-009	9,684	0,034	5,813	3,703	3,598	0,072	5,748	0,244
Ph-012	0,194	0,008	8,476	1,049	1,340	0,046	0,035	0,015
Ph-015	7,305	0,027	3,043	0,707	0,093	0,021	0,106	0,088

Tabla 23: Concentraciones medias normalizadas de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en la orina de los pacientes masculinos.

#### 4.1.2.2.2. Disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en plasma seminal

En la siguiente tabla (Tabla 24) se muestran los valores mínimos y máximos que se encontraron en plasma seminal de los pacientes incluidos en este estudio.

	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Valor mín. (ng/ml)	3,283	0,028	0,000	0,104	0,119	0,336	0,227	0,603
Valor máx. (ng/ml)	786,580	58,342	0,000	4,484	1,938	139,473	1,776	0,804
Media±DS	282,479±307,711	25,232±29,805	---	1,654±1,350	1,049±0,619	14,415±43,941	0,663±0,464	0,703±0,142
# <LdD (%)	0 (0%)	6 (60%)	10 (100%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (80%)

Tabla 24: Valores mínimos y máximos, media±DS y, número de muestras en las que no se detectaron en plasma seminal de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos. (<LdD).

La muestra de semen fue recogida el mismo día que la orina 1, por lo que usaremos como referencia esta orina para establecer correlaciones. Las concentraciones en plasma seminal se recogen en la Tabla 25.

La concentración de *cotinina* fue inferior al LdD en el 60% de las muestras de plasma seminal, *daidzeína* en el 100%, *genisteína* en el 10%, *BPA* en el 10%, y *p-Parabeno* en el 80% de las muestras de plasma seminal.

La *cafeína* fue detectada en todos los pacientes masculinos con concentraciones que iban de los 3,283 ng/ml a 786,580 ng/ml. Las concentraciones más altas coincidieron con las concentraciones más altas en la orina 1. Los pacientes con mayores concentraciones fueron los que consumían con frecuencia café y refrescos con cafeína.

La *cotinina*, fue detectada en 4 de los pacientes, el resto tuvieron concentraciones inferiores al LdD. Los valores mínimo y máximo encontrados fueron 0,028 ng/ml y 58,342 ng/ml. Las concentraciones más elevadas se encontraron en los dos pacientes fumadores. Los seis pacientes con concentración inferior al límite de detección fueron pacientes que no habían fumado nunca y un exfumador. Las dos concentraciones más bajas fueron de no fumador y fumador pasivo.

La *daidzeína* no pudo ser medida en ninguna de las muestras de plasma seminal. La *genisteína* se detectó en nueve de las muestras. La concentración mínima detectada fue 0,104 ng/ml y la máxima 4,484 ng/ml. Los pacientes con mayor concentración en el plasma seminal tuvieron

mayores concentraciones de genisteína en la orina 1, aunque nunca consumían productos de soja y derivados.

Se detectó *BPA* en nueve de los plasmas seminales. La concentración mínima observada fue 0,119 ng/ml y la máxima 1,938 ng/ml. Las mayores concentraciones aparecieron en los pacientes con mayores concentraciones en orina. No se encontró relación con el consumo de enlatados, envasados o contacto con plásticos.

El *MEHP* se detectó en todas las muestras de plasma seminal. La concentración mínima detectada fue 0,336 ng/ml y la máxima 139,473 ng/ml. Encontramos una concentración anormalmente alta (139,473ng/ml) en el paciente con referencia interna P-006. Este paciente consumía más de seis veces al día agua del grifo y consumía varias veces a la semana alimentos enlatados y reutilizaba las botellas de plástico.

El *m-Parabeno* fue detectado en todas las muestras. La concentración mínima encontrada fue 0,227 ng/ml y la máxima 1,776 ng/ml. Las mayores concentraciones en la orina 1 no se relacionaban con altas concentraciones en plasma seminal. No encontramos relación con el uso de ningún producto de higiene personal.

Por último, el *p-Parabeno* fue detectado sólo en dos de las muestras. En estos dos casos los pacientes masculinos declararon no usar nunca ninguno de los productos de higiene personal por los que fueron preguntados en el cuestionario.

CONCENTRACIONES DE CAFEÍNA, COTININA Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN PLASMA SEMINAL (ng/ml)								
REF INT	CAFEÍNA	COTININA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	BPA	MEHP	m-PARABENO	p-PARABENO
Ph-001	731,458	0,040	N/A	4,484	0,334	0,606	1,200	0,804
Ph-002	36,985	<LdD	N/A	0,570	1,280	0,724	0,483	<LdD
Ph-003	193,113	58,342	N/A	1,512	0,440	0,420	0,540	<LdD
Ph-004	160,540	<LdD	N/A	2,244	1,938	0,831	1,776	0,603
Ph-005	616,969	42,519	N/A	2,790	0,119	0,486	0,501	<LdD
Ph-006	3,283	<LdD	N/A	1,011	1,119	139,473	0,418	<LdD
Ph-008	12,754	<LdD	N/A	0,104	<LdD	0,336	0,513	<LdD
Ph-009	786,580	<LdD	N/A	<LdD	1,652	0,446	0,227	<LdD
Ph-012	67,239	<LdD	N/A	1,459	1,286	0,360	0,470	<LdD
Ph-015	215,873	0,028	N/A	0,711	1,273	0,468	0,505	<LdD

Tabla 25: Concentraciones de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos en el plasma seminal de los pacientes.  
<LdD: inferior al límite de detección. N/A: no disponible.

### 4.1.3. Variables clínicas

#### 4.1.3.1. Parámetros seminales

Los parámetros seminales considerados (volumen, concentración, número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles) en cada uno de los pacientes se recogen en la Tabla 26.

El volumen del eyaculado osciló entre 1-5 ml. El volumen medio fue  $2,7 \pm 1,3$  ml. La concentración/ml varió entre 0,02-80 millones/ml y la concentración media fue  $15,6 \pm 25,2$  millones/ml. La concentración total varió entre 0,02-400 millones siendo la concentración media de  $63,8 \pm 126,4$  millones/ml. Los espermatozoides móviles progresivos variaron entre 6-60%. La media de espermatozoides móviles progresivos fue  $35,5 \pm 18,0\%$ . Los espermatozoides móviles no progresivos variaron entre 2-12%. La media de espermatozoides móviles no progresivos fue  $5,5 \pm 3,3\%$ . Los espermatozoides inmóviles variaron entre 38-88%. La media de espermatozoides móviles no progresivos fue  $59,0 \pm 17,3\%$ .

REF INT	EDAD	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Volumen (mL)	Concentración (millones/mL)	Concentración Total (millones)	Progresivos (%)	No progresivos (%)	Inmóviles (%)
Ph-001	39	27,7	3	15	45	51	2	47
Ph-002	35	31,7	1,5	7	10,5	38	4	58
Ph-003	35	25,5	4	0,04	0,16	6	6	88
Ph-004	35	25,5	2	7	14	33	7	60
Ph-005	37	23,7	4	37	148	29	10	61
Ph-006	39	19,5	5	80	400	60	2	38
Ph-008	39	22,4	1	0,02	0,02	58	4	38
Ph-009	31	20,2	2,5	1	2,5	37	12	51
Ph-012	37	23,8	2	6	12	10	4	86
Ph-015	34	26,5	2	3	6	33	4	63
Media±DS	36,1± 2,9	24,7±3,6	2,7±1,3	15,6±25,5	63,8±126,4	35,5±18,0	5,5±3,3	59,0±17,3

Tabla 26: Edad, IMC, parámetros seminales y medias ±DS de los pacientes.

## 4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

### 4.2.1. Relación entre estilo de vida y variables clínicas

No encontramos relación estadísticamente significativa entre ninguno de los parámetros relacionados con el estilo de vida (cuestionario) y las variables clínicas (parámetros seminales y tasa de embrión anormal y tasa de gestación en el ciclo de PGS)

### 4.2.2. Relación entre concentraciones de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina y plasma seminal y, variables clínicas

No encontramos ninguna relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de cafeína, cotinina y disruptores endocrinos medidos en orina y plasma seminal y las variables clínicas (parámetros seminales y PGS).

Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, se observó que las mayores concentraciones de **BPA** media en orina (ng/ng creatinina) correspondían a los mayores porcentajes de **embriones anormales**.

### 4.2.3. Comparación entre disruptores endocrinos, cafeína y cotinina de pacientes y controles masculinos

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de **BPA** media en orina en donantes masculinos y pacientes masculinos ( $p=0,0005$ ), con valores más elevados en los pacientes.

También observaron valores más elevados con diferencias estadísticamente significativas en la concentración de **p-PARABENO** en plasma seminal en donantes masculinos y pacientes masculinos ( $p=0,0105$ ).

Por último, se observaron concentraciones medias de **CAFEÍNA** en orina más elevadas y estadísticamente significativas en las pacientes femeninas que en sus parejas masculinas ( $p=0,02$ ), asociado también a un mayor consumo de café en las mujeres.

### 4.2.4. Comparación de parámetro seminales entre pacientes y donantes masculinos

Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos los valores medios $\pm$ DS de volumen ( $p=0,0160$ ), concentración ( $p=0,0001$ ), concentración total ( $p=0,0005$ ), porcentaje de espermatozoides móviles progresivos ( $p=0,0249$ ), no progresivos ( $p=0,0003$ ) e inmóviles ( $p=0,0003$ ).

# DISCUSIÓN



## 1. SOBRE EL DISEÑO DEL ESTUDIO

En este estudio se incluyó un grupo control femenino de 31 donantes de ovocitos y un grupo control masculino de 25 donantes de semen con el objeto de tener valores de referencia de los niveles de disruptores endocrinos de una población de fertilidad probada y con las características étnicas y geográficas de nuestra población de estudio. Para el grupo de pacientes, se seleccionaron parejas en las que estaba comprometida la viabilidad embrionaria por aneuploidías y se incluyó, exclusivamente, a mujeres con 38 años para descartar el incremento de aneuploidías asociado a la edad materna avanzada (Rodrigo *et al.*, 2014) y tratar de identificar otros factores (estilo de vida y disruptores endocrinos) que pudieran incrementar el riesgo de aneuploidía embrionaria en mujeres jóvenes. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se valoran en un mismo individuo un panel de compuestos sospechosos o con capacidad para la disrupción endocrina confirmada y en el que se utiliza el PGS como instrumento para determinar su posible impacto sobre la génesis de aneuploidías embrionarias. Por ello, se seleccionaron parejas cuya indicación de PGS se había relacionado con incremento de aneuploidías como son el AR, el FI y el FM (Rodrigo *et al.*, 2014). Para descartar otras causas de abortos y fallos de implantación, se incluyeron sólo aquellas parejas en las que se habían descartado otras causas conocidas de infertilidad, como la patología endocrina, inmune, la endometriosis o el sobrepeso, así como las alteraciones en el cariotipo. Estos estrictos criterios de inclusión dificultaron y ralentizaron el reclutamiento de parejas del grupo de estudio. Además, se excluyó a parejas que cumpliendo criterios no nos proporcionaron muestras y/o cuestionarios. A las parejas se les solicitaba la entrega de muestras y/o cuestionarios el día de la punción folicular y el día de la transferencia embrionaria, si la había, por lo que no debemos olvidar el nivel de estrés que los pacientes viven en esas circunstancias y el desgaste emocional propio de los tratamientos de fertilidad. Además, como ya se ha comentado con anterioridad, algunas parejas llegado el momento del tratamiento decidieron no realizar PGS.

## 2. SOBRE LA METODOLOGÍA

### a. Selección de los disruptores endocrinos incluidos en este estudio.

El estudio *DEMOCOPHES* tiene por objetivo evaluar la exposición de niños en edad escolar y de sus madres, a sustancias potencialmente tóxicas que están presentes en el medio ambiente. En este estudio ha seleccionado como biomarcadores de la contaminación la cotinina, el cadmio, el mercurio, el BPA y los ftalatos. Tomando como referencia este estudio europeo y otros similares como INMA, CREAL y HELIX y, por su capacidad para actuar como agonistas-antagonistas androgénicos o estrogénicos alterando el equilibrio hormonal e

induciendo fenómenos patológicos en la función reproductiva según bibliografía reciente, seleccionamos el *BPA*, el *MEHP*, *m-parabeno*, *p-parabeno*, la *daidzeína* y la *genisteína*. También incluimos la *cafeína* y la *cotínina* por su capacidad conocida para alterar la función reproductiva y/o usar mismas vías de exposición que algunos de los disruptores analizados.

**b. Interpretación de los resultados obtenidos en los CFA.**

Es importante recordar que, en estudios en los que se utilizan cuestionarios de dieta y estilo de vida, los errores de medición y errores en la clasificación de la exposición son una importante fuente de sesgo (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015). En la actualidad, los CFA son el método de evaluación de la dieta de elección en la mayoría de los estudios epidemiológicos, principalmente, debido a su bajo coste y facilidad de administración y han sido validados en muchas poblaciones (Henríquez-Sánchez *et al.*, 2009). El CFA que en este estudio se entregó a pacientes y donantes es una modificación del cuestionario de Vioque *et al.*, (Vioque *et al.*, 2013). El uso de CFA representa un menor gasto respecto a la biomonitorización, definida como la estimación de la exposición a sustancias químicas presentes en el medio ambiente mediante la medida directa de dichas sustancias o sus metabolitos en diferentes matrices biológicas (sangre, orina, pelo, etc.) para saber la cantidad de sustancias químicas a las que diariamente estamos expuestos y que han sido absorbidas por el organismo. Incluso, hay estudios, como los realizados por Mínguez-Alarcón *et al.*, Chavarro *et al.*, Vanegas *et al.*, que estiman la concentración del compuesto elegido únicamente a partir de lo contestado en el CFA, sin cuantificar el analito en ninguna muestra biológica (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Chavarro *et al.*, 2015; Vanegas *et al.*, 2015). La bibliografía consultada, en su mayoría, a la hora de estimar y cuantificar la exposición a compuestos tales como los incluidos en este estudio como BPA (Callan *et al.*, 2013; Braun *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2013; Mok-Lin *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Caserta *et al.*, 2013; Ehrlich *et al.*, 2012; Lassen *et al.*, 2014), ftalatos (Buck Louis *et al.*, 2014; James-Todd *et al.*, 2012), parabenos (Smith *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2013; Dodge *et al.*, 2015) e isoflavonas (Minguez-Alarcon *et al.*, 2015; Chavarro *et al.*, 2015; Vanegas *et al.*, 2015), incluyen un cuestionario de estimación de estilo de vida que los participantes en el correspondiente estudio completaban en casa. En líneas generales, estos cuestionarios contienen cuestiones acerca de características antropométricas y personales, frecuencia de consumo de alimentos y bebidas, uso de productos de higiene personal y tabaquismo.

**c. Técnica utilizada para la detección de disruptores endocrinos, cafeína y cotínina**

Valoramos los disruptores endocrinos, cafeína y cotínina mediante UPLC/ESI-MS. Existe una gran variedad de opciones en cuanto a la técnica seleccionada para estas determinaciones lo que nos lleva a considerar este punto como una de las causas para la heterogeneidad de los

resultados obtenidos en los estudios que implican a estos compuestos. En general, podemos decir que la metodología de elección es el HPLC/UPLC-MS/MS, utilizada para la estimación de niveles de distintos disruptores en poblaciones tales como, mujeres gestantes (Callan *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2013) población general, (Buck Louis *et al.*, 2014; Bernert *et al.*, 1997) población infértil, (Mok-Lin *et al.*, 2010, Bloom *et al.*, 2011; Caserta *et al.*, 2013; Ehrlich *et al.*, 2012) o población expuesta ocupacionalmente, (Li *et al.*, 2011). En otros trabajos, se han utilizado otras técnicas para llevar a cabo estas determinaciones, aunque de sensibilidad menor, como son ELISA (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2005) y RIA (Harthe *et al.*, 2012).

Es importante destacar que para la recogida, procesamiento y almacenamiento de las muestras se utilizó siempre material libre de BPA con el fin de evitar una posible fuente de contaminación y de confusión en la estimación de este compuesto.

#### **d. Determinación de los analitos en orina**

En nuestro estudio analizamos la concentración de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina en orina. En el caso del BPA, la determinación en orina se considera el biomarcador más adecuado de la exposición debido a que el BPA se metaboliza y excreta de forma rápida (Koch y Calafat, 2009). La medición de las concentraciones urinarias de metabolitos de ftalatos se ha utilizado como enfoque de la vigilancia biológica para investigar la exposición humana a los ftalatos (Jeng, 2014). Calafat *et al.*, establecieron que los niveles urinarios de parabenos podían ser usados como buenos marcadores de exposición (Calafat *et al.*, 2010). Sin embargo, en la estimación de compuestos como BPA y ftalatos, algunos estudios utilizan niveles séricos como marcadores de esta exposición considerándose este punto como otra fuente de heterogeneidad de resultados entre los distintos estudios (Caserta *et al.*, 2013; Lathi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). Se ha demostrado que las determinaciones de algunos disruptores endocrinos como el BPA en orina, son más exactas que las determinaciones en sangre para medir la exposición real de un individuo, con una probabilidad menor de errores o de contaminación de las muestras (Geens *et al.*, 2012).

De acuerdo con la bibliografía consultada recogimos dos muestras de orina por sujeto incluido en el estudio para hacer una estimación real de la exposición de los compuestos analizados (Callan *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2013; Ehrlich *et al.*, 2012). Nosotros, elegimos el día de la punción de los ovocitos, tanto en el caso de pacientes como de donantes femeninas para la recogida de la primera orina puesto ese iba a ser el escenario metabólico en el que se iban a valorar la estimulación y respuesta ovárica, los ovocitos recuperados y los parámetros seminales. Para la recogida de la segunda orina se eligió el día del transfer (5 días

tras la punción) en el caso de pacientes por cuestiones logísticas, ya que ese día en el caso de tener embrión euploide y apto para transferencia, los pacientes acudirían a nuestra clínica. Para homogeneizar condiciones, a los donantes de semen y a las donantes de ovocitos se les solicitó la segunda muestra de orina cinco días después de dejar la primera. Nuestro estudio mostró sólo una correlación muy débil entre las mediciones de disruptores endocrinos, cafeína y cotinina entre las dos muestras de orina recogidas. Esta alta variabilidad entre las muestras de orina de la misma persona, no es sorprendente debido a la naturaleza de la exposición a los disruptores endocrinos, cafeína y cotinina (consumo episódico de alimentos, de tabaco y el uso de productos de higiene), y la corta vida media biológica de algunos de estos compuestos. En nuestro estudio, a donantes y a pacientes se les solicitaron dos muestras de orina. Sin embargo, no fueron descartados los pacientes o donantes que solo entregaron la primera orina basándonos en lo reportado por Mahalingaiah *et al.*, que para el BPA sostuvo que, a pesar de la variabilidad dentro de la persona en las concentraciones de BPA en orina, una sola muestra era moderadamente predictiva de la exposición a largo plazo (durante semanas o meses) y ofrecía una buena sensibilidad para clasificar a los individuos en los estudios epidemiológicos (Mahalingaiah *et al.*, 2008).

Como control para la dilución de la orina en este estudio utilizamos creatinina. La creatinina es un producto final endógeno del metabolismo humano. Puesto que la excreción de creatinina permanece relativamente constante para cada sujeto, mientras que el volumen de excreción urinario puede variar apreciablemente, se utiliza el nivel de creatinina en la orina como índice al que referir los valores de sustancias y/o sus metabolitos que se eliminan de igual forma a través de la filtración y no se reabsorben. Las normalizaciones con creatinina deben tener en cuenta que las concentraciones de creatinina pueden ser en algunas ocasiones confundidas por la masa muscular, la actividad física, el flujo de orina, la hora del día, la dieta y la enfermedad (Boeniger, Lowry, Rosenberg 1993). La bibliografía consultada normaliza los resultados obtenidos de los diferentes disruptores endocrinos analizados mediante creatinina (Braun *et al.*, 2011; Callan *et al.*, 2012; Casas *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011) o mediante concentración gravimétrica (Braun *et al.*, 2012; Mahalingaiah *et al.*, 2008; Meeker *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012).

#### **e. Sobre los análisis cromosómicos en espermatozoides y embriones**

La evaluación de la FISH de espermatozoides se realizó de manera no automatizada y con dos observadores para confirmar/descartar la presencia de una alteración. Sin embargo, este análisis se limita a 5 cromosomas (13, 18, 21, X e Y) debido a la dificultad de analizar mayor número de cromosomas sobre una única célula y la vez poder analizar un número elevado de espermatozoides para obtener resultados representativos de la muestra.

La capacidad de los arrays de CGH para el cribado de aneuploidías depende en buena medida de la eficiencia de amplificación que está determinada por las características de la célula biopsiada y por la destreza en el procesado de la célula para colocarla intacta en el interior del tubo de PCR. Se consideran buenos valores de eficiencia de amplificación superiores al 95%. Debemos señalar que la plataforma de arrays utilizada no permite detectar ni blastómeras poliploides, ni alteraciones estructurales equilibradas. Esta técnica no permite identificar la presencia de contaminación.

### 3. SOBRE LOS RESULTADOS

#### a. Variabilidad internensayo

Del análisis de nuestros resultados, inferimos la importancia del análisis simultáneo de las orinas, líquidos foliculares y plasmas seminales para la determinación de los compuestos que nos ocupan con el fin de evitar la variabilidad interensayo que es fuente de errores de valoración. Este punto resulta de vital importancia si pretendemos, por la dificultad que entraña la inclusión de pacientes, ampliar nuestro tamaño muestral implicando a otros centros en el reclutamiento. Asimismo, dada la sensibilidad de la técnica utilizada y las bajas concentraciones detectadas, todas las analíticas deben ser realizadas en el mismo laboratorio de referencia.

#### b. Resultados similares de disruptores endocrinos en ambos miembros de una pareja

En la investigación de la influencia de los contaminantes del medio ambiente se debe mencionar que ambos miembros de la pareja estarán expuestos a dichas sustancias. De hecho, se ha demostrado que las concentraciones de BPA urinario son más similares entre los individuos que son pareja que entre aquellos que no lo son (Mahalingaiah *et al.*, 2008). En nuestro estudio, destacan las bajas correlaciones en las concentraciones químicas entre ambos miembros de la pareja, disminuyendo la preocupación sobre un posible efecto combinado de ambos miembros sobre el resultado reproductivo. La razón de la falta de correlaciones para las concentraciones de las parejas es desconocida, pero puede reflejar la variación comportamientos o estilos de vida, exposición ocupacional, o dinámica metabólica. Es por eso, que es importante la cuantificación de las exposiciones de ambos miembros de la pareja en la evaluación de los resultados reproductivos puesto que hay hallazgos que serían esencialmente nulos o en sentido contrario si sólo se hubiera considerado la pareja femenina (Buck Louis *et al.*, 2014).

### c. Posibles efectos aditivos

A la hora de evaluar riesgo de exposición a disruptores endocrinos se deben tener cuenta los efectos aditivos y sinérgicos de las mezclas de estos compuestos, ya que por este mecanismo se puede potenciar el efecto de la exposición. Teniendo de fondo esta posibilidad, comentaremos nuestros resultados de manera individual.

### d. Cafeína

La *cafeína* fue detectada en todas las orinas, líquidos foliculares y plasmas seminales analizados. Los estudios en animales sugieren posibles efectos adversos reproductivos, pero en los seres humanos, los estudios han llegado a conclusiones mixtas. Algunos expertos creen que los resultados ambiguos pueden deberse a las diferencias individuales en el metabolismo de la cafeína (Grosso *et al.*, 2006).

En nuestro **grupo control femenino** observamos que, tanto el **número total de ovocitos** recuperados el día de la punción folicular como, el **número de ovocitos MII**, aumentaba significativamente al aumentar la concentración media de cafeína en orina y en líquido folicular. Klonoff-Cohen, Bleha y Lam-Kruglick y, Choi *et al.*, demostraron que el consumo de cafeína por parte de las mujeres antes o durante el TRA no estaba relacionado con la recuperación de ovocitos, la fecundación, la transferencia de embriones, o el embarazo (Klonoff-Cohen, Bleha y Lam-Kruglick 2002; Choi *et al.*, 2011). En nuestro caso, la población en la que observamos diferencias es fértil en contraste con de la de estos investigadores.

En el caso de las **pacientes femeninas**, se observó una tendencia al aumento del porcentaje de **embriones anormales** conforme aumentaba la concentración media de cafeína en orina (diferencia no significativa). La relación de la cafeína y las aneuploidías fue demostrada por Katsuki *et al.*, en líneas HeLa y fibroblastos primarios observando que las altas concentraciones de cafeína inducían aneuploidías porque afectaban a la estabilidad genómica de las células en división y producían una división celular asimétrica. La mayoría de las células mitóticas tratadas con cafeína mostraron una falta de alineación de los cromosomas en las placas metafásicas, y se detuvieron en prometáfase (Katsuki *et al.*, 2008).

Las concentraciones urinarias de cafeína eran más elevadas y estadísticamente significativas en las **pacientes femeninas** que en sus **parejas masculinas** lo que asociamos a un mayor consumo de café en las mujeres, de acuerdo a lo recogido en el cuestionario.

La cafeína se considera un factor de riesgo para el retraso en la concepción (Wilcox *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1990; Hatch y Bracken, 1993; Stanton y Gray, 1995; Bolumar *et al.*,

1997; Jensen *et al.*, 1998). El alto consumo de cafeína también se ha considerado como un factor de riesgo para abortos espontáneos (Srisuphan y Bracken, 1986; Fenster *et al.*, 1991; Armstrong *et al.*, 1992; Infante-Rivard *et al.*, 1993) aunque algunos estudios no han encontrado esta relación (Wilcox *et al.*, 1990; Mills *et al.*, 1993).

#### e. Cotinina

Aproximadamente el 75% de la nicotina se convierte en *cotinina* en los seres humanos. La cotinina es un biomarcador hidrosoluble ampliamente aceptado debido a su vida media relativamente larga y especificidad en los fluidos corporales (~16 horas) en comparación a la nicotina (~2 horas) (Benowitz *et al.*, 2009). La cotinina fue detectada en todas las orinas de **donantes de ovocitos** (64,5% de fumadoras), de **donantes de semen** (32% de fumadores), de **pacientes masculinos** (20% de fumadores) y en tres de las muestras de orinas de las **pacientes femeninas** (10% fumadoras). En líquido folicular se encontró en cerca del 70% de las muestras y en plasma seminal en el 40% de las muestras de pacientes y en el 60% de las muestras de donantes de semen. La cotinina se detectó por primera vez en líquido folicular en fumadoras (Weiss y Eckert, 1989), e incluso se ha detectado en líquido folicular de fumadoras pasivas (Zenzes *et al.*, 1996). Poco después, Zenzes y Reed demostraron la importancia de medir cotinina en determinados fluidos biológicos, tales como el líquido folicular, ya que las diferentes concentraciones encontradas nos permitían discriminar entre fumadoras activas, pasivas y no fumadoras (Zenzes y Reed, 1998). La presencia de cotinina también ha sido previamente descrita en el plasma seminal (Vine *et al.*, 1993). El hecho de que la cotinina sea detectable en el plasma seminal de fumadores y no fumadores sugiere que otros componentes nocivos del tabaco humo podrían pasar a través de la barrera hematotesticular (Vine *et al.*, 1993). En nuestro caso, la presencia de cotinina en líquido folicular y plasma seminal en población que se declaró no fumadora nos lleva a pensar en posibles errores en las respuestas en los cuestionarios, a que debe tenerse en cuenta la población de fumadores pasivos como población de riesgo en cuanto a la exposición a cotinina o a que un porcentaje de los no fumadores son fumadores sociales/espórádicos.

En nuestro estudio, se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración de cotinina en líquido folicular en **donantes femeninas** comparado con las **pacientes**, lo que se justifica porque sólo el 10% de las pacientes femeninas eran fumadoras mientras que el 64,5% de las donantes lo era. En el caso de las mujeres, se ha reportado que fumar cigarrillos altera la foliculogénesis y la reserva ovárica acelerando la atresia folicular (Freour *et al.*, 2008). La intensidad con la que se fuma se ha correlacionado negativamente con el recuento de folículos antrales y positivamente con los niveles de FSH, lo que sugiere un efecto perjudicial proporcional de los componentes del tabaco en la reserva ovárica (Freour *et*

*al.*, 2008; Neal *et al.*, 2007). En mujeres, (Rosevear *et al.*, 1992; Zenzes *et al.*, 1995) se ha demostrado que la nicotina disminuye el número de ovocitos recuperados y que la proporción de ovocitos diploides (Rosevear *et al.*, 1992; Zenzes *et al.*, 1995) y espermatozoides disómicos (Rubes *et al.*, 1998) es más frecuente en fumadores. De nuestras poblaciones de estudio, en las **pacientes femeninas** no pudimos sacar ninguna conclusión debido a su escaso hábito tabáquico. Las **donantes de ovocitos** fueron el grupo con mayor porcentaje de fumadores. Aunque no hemos observado relación entre la concentración de cotinina y parámetros de respuesta ovárica a la estimulación, debería ser un factor a tener en cuenta a la hora de seleccionar donantes puesto que el tabaquismo se ha asociado con la menopausia temprana, los trastornos menstruales, el retraso de la concepción, el aumento del riesgo de aborto involuntario y el parto prematuro, la restricción del crecimiento fetal, y un mayor riesgo de fracaso en el tratamiento de infertilidad (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008; Kaleta, Usidame y Polanska, 2011; Waylen *et al.*, 2009). Sin embargo, en parejas que se someten a FIV, Cinar *et al.*, informaron de que el consumo de cigarrillos no tenía efectos perjudiciales sobre los resultados reproductivos (Cinar *et al.*, 2014).

En los **donantes de semen** el 32% eran fumadores y el 20% de los **pacientes masculinos**. Pese a que se ha descrito que factores tales como el número de cigarrillos fumados por día, años de tabaquismo y niveles de subproductos de nicotina presentes en fluidos corporales están correlacionados negativamente con la cantidad y la calidad del semen (Chia *et al.*, 1994), nosotros no hemos encontrado esta asociación. Según nuestros resultados de la FISH de espermatozoides realizada en el semen del grupo control masculino, no encontramos relación entre la tasa de aneuploidía en espermatozoides y la concentración de cotinina en orina o plasma seminal. Varios estudios han examinado la asociación entre la aneuploidía espermática y el consumo de cigarrillos usando FISH. Robbins *et al.*, no observaron diferencias significativas en la frecuencia de cualquier tipo de disomía cuando se comparaban fumadores y no fumadores (Robbins *et al.*, 1997). Harkonen *et al.*, detectaron una frecuencia significativamente mayor de disomía para el cromosoma 1 en los fumadores respecto los no fumadores (Harkonen *et al.*, 1999). Shi *et al.*, observaron que la frecuencia de disomías para el cromosoma 13 estaba significativamente elevada en fumadores respecto a no fumadores (Shi *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que el aumento de riesgo de aneuploidía por el tabaco solo afectaría a algunos cromosomas.

#### f. Isoflavonas

La daidzeína y genisteína fueron detectadas en todas las muestras de orinas de donantes y pacientes. La daidzeína no se detectó en ningún líquido folicular, ni plasma seminal de pacientes pero sí en el 82,8% de los líquidos foliculares de donantes de ovocitos y el 92% de

plasmas seminales de donantes de semen. La genisteína se detectó en todas las muestras de líquido folicular de las donantes de ovovitos y de plasma seminal de los donantes semen, en el 33,3% de los líquidos foliculares de pacientes femeninas y en el 90% de los plasmas seminales de los pacientes.

En nuestro caso, tanto los grupos de **donantes** como de **pacientes**, declararon no consumir nunca soja en bruto o en distintas formas (fuente de isoflavonas), pero pese a ello encontramos concentraciones medias en orina superiores a  $8,705 \pm 7,017$  ng daidzeína/ng creatinina y  $4,394 \pm 4,755$  ng genisteína/ng creatinina (concentraciones medias detectadas en pacientes masculinos) en todas nuestras poblaciones. Los estudios consultados que relacionan isoflavonas con fertilidad (Chavarro *et al.*, 2008; Chavarro *et al.*, 2015; Vanegas *et al.*, 2015) no cuantifican los niveles de isoflavonas en ningún fluido corporal, sino que estiman concentraciones a partir del CFA que entregan a los sujetos incluidos en sus estudios. Esta estimación la realizan basándose en tablas de equivalencia como *USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods* ([/www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/isoflav/isoflav1-4.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/isoflav/isoflav1-4.pdf)). Desde nuestro punto de vista, esta estrategia llevaría a errores de interpretación puesto que de acuerdo con lo recogido en nuestros cuestionarios, asumiríamos muy baja concentración de daidzeína y genisteína porque el consumo declarado por nuestras poblaciones de estudio era prácticamente nulo, sin embargo tuvimos niveles elevados en orina.

La soja y los alimentos basados en soja son la fuente más importante de fitoestrógenos en humanos. Las personas que consumen más productos derivados de la soja están expuestas a niveles más altos de isoflavonas. Sin embargo, la cantidad de isoflavonas ingeridas también depende de factores agronómicos tales como variedades de soja, condiciones de cultivo y métodos de procesamiento de soja (Cederroth, Zimmermann y Nef, 2012). En cualquier caso, asumiremos que los productos de soja por los que nuestras poblaciones fueron preguntadas en el CFA son fuente de daidzeína y genisteína.

En **donantes femeninas**, se observó incremento estadísticamente significativo del **número de folículos antrales** (respuesta a la estimulación) asociado al consumo de harina de soja, consumo de yogur de soja, consumo de leche de soja, y consumo de tofu.

En nuestras **parejas infértiles** no observamos relación estadísticamente significativa entre el consumo de productos de soja y las concentraciones de genisteína y daidzeína y la respuesta ovárica, los parámetros seminales y el resultado del ciclo de PGS. Un estudio evaluó si los fitoestrógenos afectaban a la fecundidad de una pareja más que a la calidad del semen y no

encontraron asociación entre los niveles urinarios de fitoestrógenos de la pareja masculina y la fecundidad en parejas sin antecedentes de infertilidad (Mumford *et al.*, 2014). Mínguez-Alarcón en una cohorte de hombres de parejas subfértiles que acudían a una clínica de fertilidad, observaron que la ingesta de alimentos de soja y las isoflavonas de soja pretratamiento de reproducción asistida no tenía relación con los resultados del tratamiento de FIV. No estaba relacionado con la tasa de fertilización, la calidad del embrión, la tasa de implantación, embarazo clínico, o los recién nacidos vivos (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015).

Las isoflavonas parecen tener efectos beneficiosos reproductivos en las mujeres. Dos ensayos clínicos en mujeres sometidas a tratamiento de la infertilidad encontraron que la suplementación con isoflavonas durante los ciclos de tratamiento daban como resultado tasas significativamente mayores de embarazo y de nacidos vivos (Shahin *et al.*, 2008) pero el contenido de isoflavonas de los suplementos utilizados en estos ensayos era 100 veces más alta que la ingesta típica en la población occidental (Chun, Chung y Song 2009) y 10 veces superiores a la de los asiáticos (Messina, Nagata y Wu, 2006). No está claro si los beneficios observados en los ensayos de suplementación con dosis altas también podrían esperarse en las mujeres expuestas a las isoflavonas en su dieta normal. Se ha reportado que el consumo por parte de las mujeres de alimentos de soja se relacionaba positivamente con la probabilidad de tener un recién nacido vivo durante la FIV (Vanegas *et al.*, 2015). Mumford *et al.*, no encontraron ninguna relación entre las isoflavonas urinarias y la fecundidad entre las parejas que intentan conseguir un embarazo (Mumford *et al.*, 2014).

En **donantes de semen**, se observó un aumento, estadísticamente significativo, del porcentaje de **disomías de autosomas** con el consumo de miso, de soja germinada, y de tofu y con el incremento de la concentración de daidzeína en orina y plasma seminal. También se observó un aumento, estadísticamente significativo, del porcentaje de **disomías de los cromosomas sexuales** y el consumo de yogur de soja, de soja germinada, así como con el aumento de la concentración de genisteína en plasma seminal. El porcentaje de **diploides totales** aumentaba con el aumento de la concentración de daidzeína en plasma seminal (diferencia estadísticamente significativa) en **donantes de semen**. Hasta el momento desconocemos la existencia de estudios previos que relacionen los niveles de estas isoflavonas con las aneuploidías espermáticas.

En los hombres, la suplementación de soja conduce a pequeños cambios en el entorno hormonal (Habito *et al.*, 2000; Nagata *et al.*, 2001). Se ha reportado que la ingesta de isoflavonas (Chavarro *et al.*, 2008; Vanegas *et al.*, 2015) y los niveles urinarios de isoflavonas se relacionaba con una disminución en la concentración de espermatozoides. Sin embargo,

esta relación inversa no se ha observado en otros estudios (*Mitchell et al., 2001*). La ingesta de alimentos de soja no estaba relacionada con movilidad de los espermatozoides, morfología, o volumen de la eyaculación, (*Chavarro et al., 2008*). En nuestro grupo de **donantes de semen** sí observamos un aumento estadísticamente significativa del **volumen** del eyaculado con el consumo de miso, el consumo de tofu y el aumento de la concentración de genisteína en plasma seminal. Por último, se encontró una disminución en el porcentaje de **espermatozoides progresivos** y un aumento en el porcentaje de **espermatozoides inmóviles** con el consumo de leche de soja.

#### g. BPA

El BPA fue detectado en todas las muestras de orina. Fue detectado en el 3,4% las muestras de líquidos foliculares de las donantes de ovocitos, en el 77,8% de los líquidos foliculares de las pacientes femeninas, en el 12% de las muestras de plasma seminal de los donantes de semen, y en el 90% de las muestras de pacientes masculinos. Previamente, se había descrito la presencia de BPA en líquido folicular (*Ikezuki et al., 2002*) y en plasma seminal (*Inoue et al., 2002*; *Kaddar et al., 2009*).

En nuestro grupo de **pacientes femeninas** encontramos asociación estadísticamente significativa entre la concentración de BPA en líquido folicular y el porcentaje de **embrión anormal** por ciclo. A mayores concentraciones de BPA disminuía el porcentaje de embrión anormal. El pequeño tamaño muestral de nuestro grupo de pacientes, las diferentes indicaciones para PGS de las parejas incluidas, e incluso las diferentes edades de las pacientes (aunque todas fueran  $\leq 38$  años) podrían considerarse factores de confusión que podrían explicar nuestras diferencias con lo anteriormente publicado. *Sugiura-Ogasawara et al.*, observaron que las mujeres que experimentaban abortos involuntarios recurrentes tenían una concentración de BPA sérica significativamente mayor que los controles sanos. Además, analizaron los cariotipos de algunos de los fetos abortados, y había una tendencia a una mayor concentración de BPA en las mujeres con embriones anormales (*Sugiura-Ogasawara et al., 2005*). Si bien este estudio analizaba BPA en sangre, el tamaño muestral era pequeño y además hay otras posibles causas de aborto involuntario (*García-Enguidanos et al., 2002*), los autores sugerían que el aumento de la incidencia de aborto involuntario tras la exposición a BPA podía ser debido a un aumento de anomalías cromosómicas de los ovocitos debido a alteraciones meióticas, tal y como se ha demostrado en ratones (*Sugiura-Ogasawara et al., 2005*; *Eichenlaub-Ritter et al., 2008*; *Hunt et al., 2003*). Por el contrario, *Lathi et al.*, sugirieron una correlación significativa entre el nivel en suero materno de BPA y el aborto involuntario en el primer trimestre, tanto aneuploide y euploide, planteando que el BPA podía

estar actuando tanto a nivel preimplantatorio, como después de la implantación (Lathi *et al.*, 2014), y no estando relacionado con mayor riesgo de aneuploidías.

Finalmente, encontramos un incremento estadísticamente significativo en la concentración de BPA media en orina de **pacientes femeninas** comparado con las **donantes femeninas fértiles**. Aunque cuando revisamos estimulación y respuesta ovárica y el resultado del ciclo de PGS no observamos diferencias significativas, debemos considerar al BPA como un marcador a tener en cuenta tras lo descrito por Brieño-Enriquez *et al.*, que evaluaron por primera vez los posibles efecto del BPA en ovocitos fetales humanos en profase meiótica en ovarios cultivados y observaron que el BPA disminuía la supervivencia ovocitaria, interrumpía la progresión meiótica e incrementaba el número de focos MLH1 (marcador de recombinación), lo que podía relacionarse con riesgo aumentado de aneuploidías (Brieño-Enriquez *et al.*, 2011). Anteriormente, Hunt *et al.*, presentó evidencias de que la exposición de ratones hembras a dosis bajas de BPA durante las últimas etapas de crecimiento de los ovocitos aumentaba la probabilidad de producir gametos aneuploides (Hunt *et al.*, 2003). Susiarjo *et al.*, que reveló un efecto del BPA en la segregación de los cromosomas meióticos al alterar la sinapsis y la recombinación entre homólogos en el ovario fetal lo que se correlacionaba con el aumento de aneuploidías en varias especies eucariotas (Susiarjo *et al.*, 2007).

En nuestro grupo de **pacientes masculinos** se observa que, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, las mayores concentraciones de BPA media en orina correspondían a mayores porcentajes de **embriones anormales**. En un pequeño estudio en parejas que se sometieron a FIV se encontró una asociación inversa entre la concentración sérica de BPA paterno medido el día de la punción y el número de células embrionarias y un mayor grado de fragmentación embrionaria, lo que disminuía la calidad embrionaria (Bloom *et al.*, 2011). Un estudio previo observó una tendencia a un aumento de BPA urinario paterno asociado con una disminución de la formación de blastocisto en el día 5 de la fecundación (Erlich *et al.*, 2012).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de BPA media en orina en **donantes masculinos y pacientes masculinos**, con valores más elevados en los pacientes. Los estudios del efecto de BPA en el sistema reproductor masculino humano han sido limitados. Li *et al.*, publicaron la primera evidencia epidemiológica de que la exposición a BPA tenía un efecto adverso sobre los cuatro parámetros que miden la calidad del semen (concentración espermática, recuento total de espermatozoides, vitalidad, y motilidad) en una población humana adulta expuesta ocupacionalmente (Li *et al.*, 2011). Se ha sugerido que la exposición a BPA puede ejercer un efecto negativo sobre los parámetros de la calidad del

esperma y puede producir daños en el ADN del espermatozoide en los hombres que acuden a clínicas de infertilidad (tendencia no significativa) y en varones de parejas subfértiles (Knez *et al.*, 2014), pero no en una población de hombres fértiles (Mendiola *et al.*, 2010). Por otro lado, Chen *et al.*, no encontraron asociación entre la concentración de BPA urinario y la infertilidad masculina idiopática cuando se comparaba con controles de hombres fértiles (Chen *et al.*, 2013).

#### **h. Ftalatos (MEHP)**

El MEHP fue detectado en todas las muestras de orina de donantes y pacientes y en todos los líquidos foliculares y plasmas seminales de pacientes, pero solo en el 6,9% de los líquidos foliculares de donantes de ovocitos y en el 28% de los plasmas seminales de donantes de semen. Anteriormente se había descrito la presencia de ftalatos en líquido folicular (Heudorf, Mersch-Sundermann, y Angerer, 2007; Marsee *et al.*, 2006). En la mayoría de referencias bibliográficas consultadas cuando valoran ftalatos, analizan varios de sus metabolitos o la suma molar de algunos de ellos (Buck Louis *et al.*, 2014; Braun *et al.*, 2011; Braun *et al.*, 2012). Nosotros determinamos en este estudio los niveles de un ftalato, MEHP. Seleccionamos MEHP por ser el metabolito primario de DEHP (el ftalato más comúnmente usado y ampliamente distribuido) tras la digestión y ser el preferentemente absorbido, y por su alta frecuencia de detección.

Los ftalatos son considerados como uno de los principales grupos de sustancias antiandrogénicas y, por lo tanto, son tóxicos para la reproducción y desarrollo (Grady y Sathyanarayana, 2012). En nuestra población de **donantes de semen**, sorprendentemente encontramos una diferencia estadísticamente significativa, con mayor concentración media en orina de MEHP en los casos con mayor **concentración/ml** de espermatozoides. Un estudio en 168 hombres de parejas con subfertilidad asoció los niveles de ftalatos con una menor concentración de espermatozoides y menor movilidad (Duty *et al.*, 2003). Otros estudios han confirmado asociaciones débiles entre la exposición a los metabolitos de ftalatos y menor concentración de espermatozoides, movilidad y morfología de los adultos (Duty *et al.*, 2004; Hauser *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Wirth *et al.*, 2008) si bien, otros no han demostrado esta conexión (Herr *et al.*, 2009; Jonsson *et al.*, 2005).

#### **i. Parabenos**

En general, m-Parabeno y p-Parabeno fueron detectados en todas las muestras de orina. El m-Parabeno fue detectado en todas las muestras de líquido folicular y plasma seminal de pacientes, en el 66,5% de los líquidos foliculares de las donantes de ovocitos y en el 28% de los

plasmas seminales de los donantes de semen. El p-Parabeno fue detectado en aproximadamente el 55% los líquidos foliculares de donantes de ovocitos y pacientes femeninas y en alrededor del 20% de plasmas seminales de donantes de semen y pacientes masculinos. El porcentaje de detección se incrementa al incrementarse la concentración media en estos fluidos.

En las **pacientes femeninas**, no encontramos relación con la estimulación y respuesta ovárica o con el resultado del ciclo de PGS y las concentraciones de m-parabeno y p-Parabeno (Smith *et al.*, 2013) encontraron evidencias, en mujeres que acudían a una clínica de fertilidad, de una relación negativa entre el p-Parabeno urinario y recuento de folículos antrales, considerado uno de los mejores marcadores de reserva ovárica (Rosen *et al.*, 2012), sugiriendo que la exposición a **p-Parabeno** podía afectar negativamente a la reserva ovárica, y así contribuir al envejecimiento ovárico (Smith *et al.*, 2013). Niveles más altos de p-Parabeno urinario se asociaron con una mayor concentración de FSH en día 3, lo que concuerda con la asociación negativa del p-Parabeno con el recuento de folículos antrales. No encontraron evidencia clara de asociaciones entre las concentraciones urinarias de m-Parabeno con cualquiera de los marcadores de reserva ovárica.

Se observaron valores más elevados con diferencias estadísticamente significativas en la concentración de p-Parabeno en plasma seminal en **donantes masculinos y pacientes masculinos** (más elevados en pacientes). Atribuimos esta diferencia posiblemente a la rutina de higiene personal de los grupos comparados.

En los **donantes de semen** había una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de m-Parabeno en plasma seminal y el porcentaje de **espermatozoides no progresivos**. A mayor concentración de m-Parabeno aumentaba el porcentaje de espermatozoides no progresivos. Glander, Rytter y Schonborn, encontraron que m-Parabeno no sólo reducía la contaminación microbiológica del medio crioprotector utilizado para la congelación de semen, sino que también producía una disminución de la motilidad espermática (Glander, Rytter y Schonborn, 1984) y demostraron que estos parabenos eran espermicidas eficaces. Meeker *at al.*, no encontraron pruebas de una relación entre los parabenos urinarios y los parámetros de calidad del semen (Meeker *et al.*, 2011). En nuestro estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre concentración media de p-Parabeno en orina de los donantes de semen y el porcentaje de **disomías de cromosomas sexuales** aumentanto estas disomías con el aumento de la concentración. No nos consta que lo publicado hasta el momento relacione los niveles de parabenos en fluidos corporales con aneuploidías en espermatozoides.

#### 4. LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO

Establecer asociaciones entre los niveles de los disruptores endocrinos elegidos en este estudio y parámetros reproductivos y comparar nuestros resultados con los obtenidos en las publicaciones comentadas no está exento de cierto nivel de dificultad, fundamentalmente por las características particulares de cada protocolo de estudio. Las discrepancias observadas entre los estudios sobre fertilidad y disruptores endocrinos y que podrían influir en los resultados obtenidos podrían tener su origen en el tamaño poblacional, al fluido biológico donde se realiza el análisis, la hora de recogida de las muestras de orina, el método de detección utilizado, los límites de detección de la técnica analítica, los métodos de normalización empleados, y a la composición de la población de estudio, sobre todo en lo que respecta a la selección de acuerdo con el estado de fertilidad. No descartamos que las asociaciones vistas en un solo estudio puedan ser hallazgos casuales en lugar de verdaderas asociaciones biológicas.

Por lo estudiado en la presente tesis doctoral, sospechamos que posiblemente estos disruptores endocrinos no tengan ningún efecto sobre población altamente fértil, pero no descartamos que puedan ser nocivos en circunstancias de fertilidad comprometida (calidad del semen disminuida, baja reserva ovárica, etc.), pudiéndose observar algunas asociaciones que están ausentes en una población fértil. Aunque esta hipótesis es consistente con buena parte de la literatura existente, se debe evaluar exhaustivamente en estudios controlados, aumentando el tamaño muestral.



# CONCLUSIONES



1. En este trabajo pudimos determinar la concentración de los disruptores endocrinos seleccionados, no sólo en orina, sino también en líquido folicular y plasma seminal.
2. Se observaron mayores niveles de disruptores endocrinos en las donantes de ovocitos en comparación con los donantes de semen, en algunos casos relacionado con el estilo de vida.
3. Se detectaron mayores niveles de disruptores endocrinos en nuestro grupo de pacientes con alto riesgo de aneuploidías, en comparación con los grupos control de donantes de fertilidad probada, destacando mayores niveles de BPA, m-Parabeno y cafeína en pacientes.
4. En las donantes femeninas, se observó disminución de la respuesta ovárica tras exposición a químicos en el lugar de trabajo, y mayor respuesta en donantes con mayor consumo de soja y cafeína.
5. En los donantes masculinos, el mayor consumo de soja se asoció tanto a disminución de la movilidad espermática como a aumento de aneuploidías en espermatozoides. El m-Parabeno también se asoció con una disminución de la movilidad espermática y el p-Parabeno con un aumento de disomías de cromosomas sexuales en espermatozoides.
6. Dentro de las parejas infértiles, en las mujeres se observó una tendencia a mayor porcentaje de aneuploidías embrionarias a mayor consumo de cafeína y menor concentración de BPA. Sin embargo, en los varones se observó una tendencia a mayor porcentaje de aneuploidías embrionarias cuando la concentración de BPA era mayor.
7. En la evaluación de la pareja infértil y en la selección de donantes, destacamos la necesidad de considerar la influencia de la exposición ambiental y su relación con los niveles de disruptores endocrinos, como un factor determinante para el resultado del tratamiento de reproducción asistida.



## ABREVIATURAS

aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
ACN	Aceto nitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcONH <sub>4</sub>	Acetato de amonio
APCR	Resistencia a la proteína C activada
AR	Aborto recurrente
BPA	Bisfenol A
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CEP	<i>Chromosome-specific Centromeric Enumeration Probes</i>
CFA	Cuestionario de frecuencia alimentaria
Cy3	<i>Cyanine 3</i>
Cy5	<i>Cyanine 5</i>
D3	Día 3 de desarrollo embrionario
DBP	Ftalato de dibutilo
DE	Disruptor endocrino
DEP	Dietil ftalato
DES	Dietilestilbestrol
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional
DS	Desviación estándar
E2	17β-estradiol o estradiol
EFSA	<i>European Food Safety Agency</i>
EMA	Edad materna avanzada
FeBAD	<i>Fetal Basis of Adult Disease</i>
FI	Fallo repetido de implantación
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FM	Factor Masculino
hCG	Hormona gonadotropina coriónica
hMG	Gonadotropina menopáusica humana
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
IMC	Índice de masa corporal
LdD	Límite de detección
LF	Líquido folicular
L-L	Líquido-Líquido
LSI	<i>Locus Specific Identifier</i>
MEHP	Mono (2-etilhexil) ftalato
MeOH	Metanol
MII	Metafase II
m-Parabeno	Metilparabeno
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
N/A	Dato no disponible
NMDRs	<i>Non-Monotonic-Dose-Response</i>
NOEL	<i>No-Observed-Effect Level</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGS	<i>Preimplantational Genetic Screening</i>
p-Parabeno	Propilparabeno
PS	Plasma seminal
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RA	Receptor de andrógenos
RE	Receptor de estrógenos
RRE γ	Receptor γ relacionado con el receptor de estrógenos
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
TRA	Tratamiento de reproducción asistida
UI	Unidad internacional
UPLC-ESI-MS.	<i>Ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WGA	<i>Whole Genome amplification</i>



# BIBLIOGRAFÍA



- Adgent, M.A., Daniels, J.L., Edwards, L.J., Siega-Riz, A.M. & Rogan, W.J. 2011, "Early-life soy exposure and gender-role play behavior in children", *Environmental health perspectives*, vol. 119, no. 12, pp. 1811-1816.
- Adibi, J.J., Perera, F.P., Jedrychowski, W., Camann, D.E., Barr, D., Jacek, R. & Whyatt, R.M. 2003, "Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland", *Environmental health perspectives*, vol. 111, no. 14, pp. 1719-1722.
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R. & Hardy, M.P. 2004, "Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells", *Endocrinology*, vol. 145, no. 2, pp. 592-603.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. & Fukami, Y. 1987, "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases", *The Journal of biological chemistry*, vol. 262, no. 12, pp. 5592-5595.
- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P. & Sharpe, R.M. 2000, "Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels", *Endocrinology*, vol. 141, no. 10, pp. 3898-3907.
- Bae, B., Jeong, J.H. & Lee, S.J. 2002, "The quantification and characterization of endocrine disruptor bisphenol-A leaching from epoxy resin", *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 46, no. 11-12, pp. 381-387.
- Bakker, R., Steegers, E.A., Obradov, A., Raat, H., Hofman, A. & Jaddoe, V.W. 2010, "Maternal caffeine intake from coffee and tea, fetal growth, and the risks of adverse birth outcomes: the Generation R Study", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 91, no. 6, pp. 1691-1698.
- Balabanic, D., Rupnik, M. & Klemencic, A.K. 2011, "Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health", *Reproduction, fertility, and development*, vol. 23, no. 3, pp. 403-416.
- Barclay, D.L. 1979, "Congenital diethylstilbestrol-associated vaginal/cervical adenosis (DES babies)", *The Journal of the Arkansas Medical Society*, vol. 75, no. 12, pp. 451-452.
- Baron, J.A., La Vecchia, C. & Levi, F. 1990, "The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 162, no. 2, pp. 502-514.
- BENNETTS, H.W. 1946, "Metaplasia in the sex organs of castrated male sheep maintained on early subterranean clover pastures", *Australian Veterinary Journal*, vol. 22, no. 3, pp. 70-78.
- BENNETTS, H.W., UNDERWOOD, E.J. & SHIER, F.L. 1946, "A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia", *Australian Veterinary Journal*, vol. 22, pp. 2-12.
- Benowitz, N.L., Dains, K.M., Dempsey, D., Herrera, B., Yu, L. & Jacob, P., 3rd 2009, "Urine nicotine metabolite concentrations in relation to plasma cotinine during low-level nicotine exposure", *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, vol. 11, no. 8, pp. 954-960.
- Bergman, A., Heindel, J.J., Kasten, T., Kidd, K.A., Jobling, S., Neira, M., Zoeller, R.T., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., Kortenkamp, A., Muir, D., Drisse, M.N., Ochieng, R., Skakkebaek, N.E., Bylehn, A.S., Iguchi, T., Toppari, J. & Woodruff, T.J. 2013, "The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science", *Environmental health perspectives*, vol. 121, no. 4, pp. A104-6.
- Bernert, J.T., Jr, Turner, W.E., Pirkle, J.L., Sosnoff, C.S., Akins, J.R., Waldrep, M.K., Ann, Q., Covey, T.R., Whitfield, W.E., Gunter, E.W., Miller, B.B., Patterson, D.G., Jr, Needham, L.L., Hannon, W.H. & Sampson, E.J. 1997, "Development and validation of sensitive method for determination of serum cotinine in smokers and nonsmokers by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry", *Clinical chemistry*, vol. 43, no. 12, pp. 2281-2291.
- Bhatia, J., Greer, F. & American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition 2008, "Use of soy protein-based formulas in infant feeding", *Pediatrics*, vol. 121, no. 5, pp. 1062-1068.
- Biedermann, S., Tschudin, P. & Grob, K. 2010, "Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin", *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 398, no. 1, pp. 571-576.
- Bloom, M.S., Vom Saal, F.S., Kim, D., Taylor, J.A., Lamb, J.D. & Fujimoto, V.Y. 2011, "Serum unconjugated bisphenol A concentrations in men may influence embryo quality indicators during in vitro fertilization", *Environmental*

- toxicology and pharmacology*, vol. 32, no. 2, pp. 319-323.
- Boeniger, M.F., Lowry, L.K. & Rosenberg, J. 1993, "Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review", *American Industrial Hygiene Association Journal*, vol. 54, no. 10, pp. 615-627.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A. & Nygren, K.G. 2007, "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 6, pp. 1506-1512.
- Bonefeld-Jorgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V. & Vinggaard, A.M. 2007, "Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review", *Environmental health perspectives*, vol. 115 Suppl 1, pp. 69-76.
- Bornehag, C.G., Sundell, J., Weschler, C.J., Sigsgaard, T., Lundgren, B., Hasselgren, M. & Hagerhed-Engman, L. 2004, "The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study", *Environmental health perspectives*, vol. 112, no. 14, pp. 1393-1397.
- Bracken, M.B., Triche, E.W., Belanger, K., Hellenbrand, K. & Leaderer, B.P. 2003, "Association of maternal caffeine consumption with decrements in fetal growth", *American Journal of Epidemiology*, vol. 157, no. 5, pp. 456-466.
- Branham, W.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Hass, B.S., Blair, R.M., Fang, H., Shi, L., Tong, W., Perkins, R.G. & Sheehan, D.M. 2002, "Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor", *The Journal of nutrition*, vol. 132, no. 4, pp. 658-664.
- Braun, J.M., Just, A.C., Williams, P.L., Smith, K.W., Calafat, A.M. & Hauser, R. 2014, "Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic", *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, vol. 24, no. 5, pp. 459-466.
- Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Bernert, J.T., Ye, X., Silva, M.J., Barr, D.B., Sathyanarayana, S. & Lanphear, B.P. 2011, "Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy", *Environmental health perspectives*, vol. 119, no. 1, pp. 131-137.
- Braun, J.M., Smith, K.W., Williams, P.L., Calafat, A.M., Berry, K., Ehrlich, S. & Hauser, R. 2012, "Variability of urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations before and during pregnancy", *Environmental health perspectives*, vol. 120, no. 5, pp. 739-745.
- Brede, C., Fjeldal, P., Skjevrak, I. & Herikstad, H. 2003, "Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing", *Food additives and contaminants*, vol. 20, no. 7, pp. 684-689.
- Bretveld, R., Brouwers, M., Ebisch, I. & Roeleveld, N. 2007, "Influence of pesticides on male fertility", *Scandinavian journal of work, environment & health*, vol. 33, no. 1, pp. 13-28.
- Brieno-Enriquez, M.A., Robles, P., Camats-Tarruella, N., Garcia-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., Martinez, F. & Caldes, M.G. 2011, "Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 10, pp. 2807-2818.
- Buck Louis, G.M., Sundaram, R., Sweeney, A.M., Schisterman, E.F., Maisog, J. & Kannan, K. 2014, "Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study", *Fertility and sterility*, vol. 101, no. 5, pp. 1359-1366.
- Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G., Pope, G.S., Sauer, M.J. & Darbre, P.D. 2002, "Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 80, no. 1, pp. 49-60.
- Byrne, C., Divekar, S.D., Storch, G.B., Parodi, D.A. & Martin, M.B. 2009, "Cadmium--a metalloestrogen?", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 238, no. 3, pp. 266-271.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A. 2001, "The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature", *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 62, no. 2, pp. 330-338.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Bishop, A.M. & Needham, L.L. 2010, "Urinary concentrations

- of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006", *Environmental health perspectives*, vol. 118, no. 5, pp. 679-685.
- Callan, A.C., Hinwood, A.L., Heffernan, A., Eaglesham, G., Mueller, J. & Odland, J.O. 2013, "Urinary bisphenol A concentrations in pregnant women", *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 216, no. 6, pp. 641-644.
- Campos-Galindo, I., Garcia-Herrero, S., Martinez-Conejero, J.A., Ferro, J., Simon, C. & Rubio, C. 2015, "Molecular analysis of products of conception obtained by hysteroembryoscopy from infertile couples", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 32, no. 5, pp. 839-848.
- CARE Study Group 2008, "Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 337, pp. a2332.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N.E. 1992, "Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 305, no. 6854, pp. 609-613.
- Carwile, J.L., Luu, H.T., Bassett, L.S., Driscoll, D.A., Yuan, C., Chang, J.Y., Ye, X., Calafat, A.M. & Michels, K.B. 2009, "Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations", *Environmental health perspectives*, vol. 117, no. 9, pp. 1368-1372.
- Carwile, J.L. & Michels, K.B. 2011, "Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006", *Environmental research*, vol. 111, no. 6, pp. 825-830.
- Casas, M., Valvi, D., Luque, N., Ballesteros-Gomez, A., Carsin, A.E., Fernandez, M.F., Koch, H.M., Mendez, M.A., Sunyer, J., Rubio, S. & Vrijheid, M. 2013, "Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children", *Environment international*, vol. 56, pp. 10-18.
- Caserta, D., Bordi, G., Ciardo, F., Marci, R., La Rocca, C., Tait, S., Bergamasco, B., Stecca, L., Mantovani, A., Guerranti, C., Fanello, E.L., Perra, G., Borghini, F., Focardi, S.E. & Moscarini, M. 2013, "The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women", *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, vol. 29, no. 5, pp. 444-447.
- Caserta, D., Bordi, G., Di Segni, N., D'Ambrosio, A., Mallozzi, M. & Moscarini, M. 2013, "The influence of cigarette smoking on a population of infertile men and women", *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 287, no. 4, pp. 813-818.
- Cederroth, C.R., Zimmermann, C. & Nef, S. 2012, "Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 355, no. 2, pp. 192-200.
- Chavarro, J.E., Toth, T.L., Sadio, S.M. & Hauser, R. 2008, "Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 11, pp. 2584-2590.
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Gee, S.J., Hammock, B.D. & Lasley, B.L. 2007, "Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 221, no. 3, pp. 278-284.
- Chen, M., Tang, R., Fu, G., Xu, B., Zhu, P., Qiao, S., Chen, X., Xu, B., Qin, Y., Lu, C., Hang, B., Xia, Y. & Wang, X. 2013, "Association of exposure to phenols and idiopathic male infertility", *Journal of hazardous materials*, vol. 250-251, pp. 115-121.
- Chia, S.E., Xu, B., Ong, C.N., Tsakok, F.M. & Lee, S.T. 1994, "Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality", *International journal of fertility and menopausal studies*, vol. 39, no. 5, pp. 292-298.
- Choi, J.H., Ryan, L.M., Cramer, D.W., Hornstein, M.D. & Missmer, S.A. 2011, "Effects of Caffeine Consumption by Women and Men on the Outcome of Fertilization", *Journal of caffeine research*, vol. 1, no. 1, pp. 29-34.
- Christensen, B.C. & Marsit, C.J. 2011, "Epigenomics in environmental health", *Frontiers in genetics*, vol. 2, pp. 84.
- Christiansen, S., Kortenkamp, A., Axelstad, M., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P.R., Faust, M., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., Burdorf, A. & Hass, U. 2012, "Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats", *International journal of andrology*, vol. 35, no. 3, pp. 303-316.
- Cinar, O., Dilbaz, S., Terzioglu, F., Karahalil, B., Yucel, C., Turk, R., Taskin, L. & Kose, S.K. 2014, "Does cigarette smoking really have detrimental effects on outcomes of IVF?", *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 174, pp. 106-110.

- Clausson, B., Granath, F., Ekblom, A., Lundgren, S., Nordmark, A., Signorello, L.B. & Cnattingius, S. 2002, "Effect of caffeine exposure during pregnancy on birth weight and gestational age", *American Journal of Epidemiology*, vol. 155, no. 5, pp. 429-436.
- Colborn, T. & Clement, C. 1992, "Chemically-induced alterations in sexual and functional development-- the wildlife/human connection.", *Princeton, N.J: Princeton Scientific Pub. Co., .*
- Conolly, R.B. & Lutz, W.K. 2004, "Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment", *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 77, no. 1, pp. 151-157.
- Costa, E.M., Spritzer, P.M., Hohl, A. & Bachega, T.A. 2014, "Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract", *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 58, no. 2, pp. 153-161.
- Dang, Z.C. 2009, "Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action", *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 10, no. 3, pp. 342-349.
- Dang, Z.C., Audinot, V., Papapoulos, S.E., Boutin, J.A. & Lowik, C.W. 2003, "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 2, pp. 962-967.
- Darbre, P.D. & Harvey, P.W. 2008, "Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks", *Journal of applied toxicology : JAT*, vol. 28, no. 5, pp. 561-578.
- Desdoits-Lethimonier, C., Albert, O., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Courant, F., Lesne, L., Guille, F., Dejuq-Rainsford, N. & Jegou, B. 2012, "Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 5, pp. 1451-1459.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. & Gore, A.C. 2009, "Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement", *Endocrine reviews*, vol. 30, no. 4, pp. 293-342.
- Diamanti-Kandarakis, E., Palioura, E., Kandarakis, S.A. & Koutsilieris, M. 2010, "The impact of endocrine disruptors on endocrine targets", *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, vol. 42, no. 8, pp. 543-552.
- Dinsdale, E.C. & Ward, W.E. 2010, "Early exposure to soy isoflavones and effects on reproductive health: a review of human and animal studies", *Nutrients*, vol. 2, no. 11, pp. 1156-1187.
- Dodge, L.E., Williams, P.L., Williams, M.A., Missmer, S.A., Toth, T.L., Calafat, A.M. & Hauser, R. 2015, "Paternal Urinary Concentrations of Parabens and Other Phenols in Relation to Reproductive Outcomes among Couples from a Fertility Clinic", *Environmental health perspectives*, vol. 123, no. 7, pp. 665-671.
- Duty, S.M., Calafat, A.M., Silva, M.J., Brock, J.W., Ryan, L., Chen, Z., Overstreet, J. & Hauser, R. 2004, "The relationship between environmental exposure to phthalates and computer-aided sperm analysis motion parameters", *Journal of andrology*, vol. 25, no. 2, pp. 293-302.
- Duty, S.M., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Chen, Z., Herrick, R.F., Christiani, D.C. & Hauser, R. 2003, "Phthalate exposure and human semen parameters", *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, vol. 14, no. 3, pp. 269-277.
- Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Ye, X., Calafat, A.M., Petrozza, J.C., Wright, D. & Hauser, R. 2012, "Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 12, pp. 3583-3592.
- Engel, S.M., Miodovnik, A., Canfield, R.L., Zhu, C., Silva, M.J., Calafat, A.M. & Wolff, M.S. 2010, "Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning", *Environmental health perspectives*, vol. 118, no. 4, pp. 565-571.
- Eskenazi, B. 1993, "Caffeine during pregnancy: grounds for concern?", *Jama*, vol. 270, no. 24, pp. 2973-2974.
- Fernandez, S.V. & Russo, J. 2010, "Estrogen and xenoestrogens in breast cancer", *Toxicologic pathology*, vol. 38, no. 1, pp. 110-122.
- Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C. & Pointis, G. 2004, "Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 18, no. 3, pp. 413-421.
- Fraser, L.R., Beyret, E., Milligan, S.R. & Adecoya-Osiguwa, S.A. 2006, "Effects of estrogenic

- xenobiotics on human and mouse spermatozoa", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 5, pp. 1184-1193.
- Freour, T., Masson, D., Mirallie, S., Jean, M., Bach, K., Dejoie, T. & Barriere, P. 2008, "Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve", *Reproductive biomedicine online*, vol. 16, no. 1, pp. 96-102.
- Fromme, H., Gruber, L., Schuster, R., Schlummer, M., Kiranoglu, M., Bolte, G. & Volkel, W. 2013, "Phthalate and di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) intake by German infants based on the results of a duplicate diet study and biomonitoring data (INES 2)", *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 53, pp. 272-280.
- Garcia-Enguidanos, A., Calle, M.E., Valero, J., Luna, S. & Dominguez-Rojas, V. 2002, "Risk factors in miscarriage: a review", *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 102, no. 2, pp. 111-119.
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.M., Pussemier, L., Scippo, M.L., Van Loco, J. & Covaci, A. 2012, "A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A", *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 50, no. 10, pp. 3725-3740.
- Goldberg, J.M. & Falcone, T. 1999, "Effect of diethylstilbestrol on reproductive function", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 1, pp. 1-7.
- Goldman, L. 2002, "Preventing pollution? US toxic chemicals and pesticides policies and sustainable development.", vol. 32, no. Environ Law Report News Analysis., pp. 11018-41.
- Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M.J., Nicolas, J.C., Balaguer, P. & Casellas, C. 2005, "Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks", *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, vol. 68, no. 4, pp. 239-251.
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P. & Gaido, K.W. 1998, "Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 142, no. 1-2, pp. 203-214.
- Grady, R. & Sathyanarayana, S. 2012, "An update on phthalates and male reproductive development and function", *Current urology reports*, vol. 13, no. 4, pp. 307-310.
- Grosso, L.M., Triche, E.W., Belanger, K., Benowitz, N.L., Holford, T.R. & Bracken, M.B. 2006, "Caffeine metabolites in umbilical cord blood, cytochrome P-450 1A2 activity, and intrauterine growth restriction", *American Journal of Epidemiology*, vol. 163, no. 11, pp. 1035-1041.
- Guo, Y. & Kannan, K. 2013, "A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure", *Environmental science & technology*, vol. 47, no. 24, pp. 14442-14449.
- Habito, R.C., Montalto, J., Leslie, E. & Ball, M.J. 2000, "Effects of replacing meat with soyabean in the diet on sex hormone concentrations in healthy adult males", *The British journal of nutrition*, vol. 84, no. 4, pp. 557-563.
- Hammond, D., Fong, G.T., Cummings, K.M., O'Connor, R.J., Giovino, G.A. & McNeill, A. 2006, "Cigarette yields and human exposure: a comparison of alternative testing regimens", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 15, no. 8, pp. 1495-1501.
- Hampl, R., Kubatova, J. & Starka, L. 2014, "Steroids and endocrine disruptors-History, recent state of art and open questions", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, .
- Handyside, A.H. 2013, "24-Chromosome Copy Number Analysis: a Comparison of Available Technologies", *Fertility and sterility*, vol. 100, no. 3, pp. 595-602.
- Hannon, P.R. & Flaws, J.A. 2015, "The effects of phthalates on the ovary", *Frontiers in endocrinology*, vol. 6, pp. 8.
- Hardy, K., Martin, K.L., Leese, H.J., Winston, R.M. & Handyside, A.H. 1990, "Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 5, no. 6, pp. 708-714.
- Harkonen, K., Viitanen, T., Larsen, S.B., Bonde, J.P. & Lahdette, J. 1999, "Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors. ASCLEPIOS. A European Concerted Action on Occupational Hazards to Male Reproductive Capability", *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 34, no. 1, pp. 39-46.
- Harper, J.C., Coonen, E., Handyside, A.H., Winston, R.M., Hopman, A.H. & Delhanty,

- J.D. 1995, "Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos", *Prenatal diagnosis*, vol. 15, no. 1, pp. 41-49.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G. & Sumpter, J.P. 1997, "The estrogenic activity of phthalate esters in vitro", *Environmental health perspectives*, vol. 105, no. 8, pp. 802-811.
- Harris, H.A., Bapat, A.R., Gonder, D.S. & Frail, D.E. 2002, "The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent", *Steroids*, vol. 67, no. 5, pp. 379-384.
- Harthe, C., Rinaldi, S., Achaintre, D., de Ravel, M.R., Mappus, E., Pugeat, M. & Dechaud, H. 2012, "Bisphenol A-glucuronide measurement in urine samples", *Talanta*, vol. 100, pp. 410-413.
- Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., Matsuyama, A., Wilson, C., Yamane, J.A. & Jacobs, P.A. 1980, "A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions.", *Annals of Human Genetics.*, vol. 44(Pt 2), pp. 151-178.
- Hauser, R. 2008, "Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility", *International journal of andrology*, vol. 31, no. 2, pp. 112-117.
- Henriquez-Sanchez, P., Sanchez-Villegas, A., Doreste-Alonso, J., Ortiz-Andrellucchi, A., Pfrimer, K. & Serra-Majem, L. 2009, "Dietary assessment methods for micronutrient intake: a systematic review on vitamins", *The British journal of nutrition*, vol. 102 Suppl 1, pp. S10-37.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H. & Poskanzer, D.C. 1971, "Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women", *The New England journal of medicine*, vol. 284, no. 15, pp. 878-881.
- Herr, C., zur Nieden, A., Koch, H.M., Schuppe, H.C., Fieber, C., Angerer, J., Eikmann, T. & Stilianakis, N.I. 2009, "Urinary di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)--metabolites and male human markers of reproductive function", *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 212, no. 6, pp. 648-653.
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. & Angerer, J. 2007, "Phthalates: toxicology and exposure", *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 210, no. 5, pp. 623-634.
- Hooper, L., Ryder, J.J., Kurzer, M.S., Lampe, J.W., Messina, M.J., Phipps, W.R. & Cassidy, A. 2009, "Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis", *Human reproduction update*, vol. 15, no. 4, pp. 423-440.
- Horard, B. & Vanacker, J.M. 2003, "Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand", *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 31, no. 3, pp. 349-357.
- Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K. & Gray, L.E., Jr 2008, "A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner", *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 105, no. 1, pp. 153-165.
- Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., Thomas, S., Thomas, B.F. & Hassold, T.J. 2003, "Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse", *Current biology : CB*, vol. 13, no. 7, pp. 546-553.
- Hwang, C.S., Kwak, H.S., Lim, H.J., Lee, S.H., Kang, Y.S., Choe, T.B., Hur, H.G. & Han, K.O. 2006, "Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 101, no. 4-5, pp. 246-253.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. & Taketani, Y. 2002, "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 11, pp. 2839-2841.
- Inoue, K., Wada, M., Higuchi, T., Oshio, S., Umeda, T., Yoshimura, Y. & Nakazawa, H. 2002, "Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen", *Journal of chromatography.B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, vol. 773, no. 2, pp. 97-102.
- Jaakkola, J.J., Verkasalo, P.K. & Jaakkola, N. 2000, "Plastic wall materials in the home and respiratory health in young children", *American Journal of Public Health*, vol. 90, no. 5, pp. 797-799.
- James-Todd, T., Stahlhut, R., Meeker, J.D., Powell, S.G., Hauser, R., Huang, T. & Rich-Edwards,

- J. 2012, "Urinary phthalate metabolite concentrations and diabetes among women in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008", *Environmental health perspectives*, vol. 120, no. 9, pp. 1307-1313.
- Janjua, N.R., Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C. & Andersson, A.M. 2008, "Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans", *International journal of andrology*, vol. 31, no. 2, pp. 118-130.
- Jeng, H.A. 2014, "Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health", *Frontiers in public health*, vol. 2, pp. 55.
- Jonsson, B.A., Richthoff, J., Rylander, L., Giwercman, A. & Hagmar, L. 2005, "Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men", *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, vol. 16, no. 4, pp. 487-493.
- Joskow, R., Barr, D.B., Barr, J.R., Calafat, A.M., Needham, L.L. & Rubin, C. 2006, "Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants", *Journal of the American Dental Association (1939)*, vol. 137, no. 3, pp. 353-362.
- Kaddar, N., Bendridi, N., Harthe, C., de Ravel, M.R., Bienvenu, A.L., Cuilleron, C.Y., Mappus, E., Pugeat, M. & Dechaud, H. 2009, "Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples", *Analytica Chimica Acta*, vol. 645, no. 1-2, pp. 1-4.
- Kaleta, D., Usidame, B. & Polanska, K. 2011, "Tobacco advertisements targeted on women: creating an awareness among women", *Central European journal of public health*, vol. 19, no. 2, pp. 73-78.
- Kang, J.H., Kondo, F. & Katayama, Y. 2006, "Human exposure to bisphenol A", *Toxicology*, vol. 226, no. 2-3, pp. 79-89.
- Katsuki, Y., Nakada, S., Yokoyama, T., Imoto, I., Inazawa, J., Nagasawa, M. & Mizutani, S. 2008, "Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes", *Cancer science*, vol. 99, no. 8, pp. 1539-1545.
- Kavanagh, K., Jones, K.L., Zhang, L., Flynn, D.M., Shadoan, M.K. & Wagner, J.D. 2008, "High isoflavone soy diet increases insulin secretion without decreasing insulin sensitivity in premenopausal nonhuman primates", *Nutrition research (New York, N.Y.)*, vol. 28, no. 6, pp. 368-376.
- Kester, M.H., Bulduk, S., van Toor, H., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W., Schuur, A.G., Brouwer, A. & Visser, T.J. 2002, "Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 87, no. 3, pp. 1142-1150.
- Kim, J.W., Lee, W.S., Yoon, T.K., Seok, H.H., Cho, J.H., Kim, Y.S., Lyu, S.W. & Shim, S.H. 2010, "Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment", *BMC medical genetics*, vol. 11, pp. 153-2350-11-153.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H. & Ohta, S. 2005, "Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds", *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 84, no. 2, pp. 249-259.
- Klonoff-Cohen, H., Bleha, J. & Lam-Kruglick, P. 2002, "A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 7, pp. 1746-1754.
- Knez, J. 2013, "Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health", *Reproductive biomedicine online*, vol. 26, no. 5, pp. 440-448.
- Knez, J., Kranvogel, R., Breznik, B.P., Voncina, E. & Vlaisavljevic, V. 2014, "Are urinary bisphenol A levels in men related to semen quality and embryo development after medically assisted reproduction?", *Fertility and sterility*, vol. 101, no. 1, pp. 215-221.e5.
- Koch, H.M. & Calafat, A.M. 2009, "Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 364, no. 1526, pp. 2063-2078.
- Koo, H.J. & Lee, B.M. 2004, "Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment", *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, vol. 67, no. 23-24, pp. 1901-1914.
- Kortenkamp, A. 2007, "Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals", *Environmental health perspectives*, vol. 115 Suppl 1, pp. 98-105.

- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. 1997, "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta", *Endocrinology*, vol. 138, no. 3, pp. 863-870.
- Kuiper, G.G. & Gustafsson, J.A. 1997, "The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens", *FEBS letters*, vol. 410, no. 1, pp. 87-90.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. & Gustafsson, J.A. 1998, "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta", *Endocrinology*, vol. 139, no. 10, pp. 4252-4263.
- Kuruto-Niwa, R., Tateoka, Y., Usuki, Y. & Nozawa, R. 2007, "Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum", *Chemosphere*, vol. 66, no. 6, pp. 1160-1164.
- Kyselova, V., Peknicova, J., Buckiova, D. & Boubelik, M. 2003, "Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice", *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, vol. 1, pp. 30.
- Lamb, N.E., Freeman, S.B., Savage-Austin, A., Pettay, D., Taft, L., Hersey, J., Gu, Y., Shen, J., Saker, D., May, K.M., Avramopoulos, D., Petersen, M.B., Hallberg, A., Mikkelsen, M., Hassold, T.J. & Sherman, S.L. 1996, "Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II", *Nature genetics*, vol. 14, no. 4, pp. 400-405.
- Lassen, T.H., Frederiksen, H., Jensen, T.K., Petersen, J.H., Joensen, U.N., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Jorgensen, N. & Andersson, A.M. 2014, "Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality", *Environmental health perspectives*, vol. 122, no. 5, pp. 478-484.
- Lathi, R.B., Liebert, C.A., Brookfield, K.F., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., Fujimoto, V.Y. & Baker, V.L. 2014, "Conjugated bisphenol A in maternal serum in relation to miscarriage risk", *Fertility and sterility*, vol. 102, no. 1, pp. 123-128.
- Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F. & Mazzeo, P. 2003, "In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy", *Environmental health perspectives*, vol. 111, no. 14, pp. 1783-1785.
- Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.Y., Ahn, R.S. & Lee, K. 2003, "Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor", *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 75, no. 1, pp. 40-46.
- Li, D.K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E. & Yuan, W. 2011, "Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 2, pp. 625-30.e1-4.
- Li, D.K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E. & Yuan, W. 2011, "Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 2, pp. 625-30.e1-4.
- Li, M.W., Mruk, D.D., Lee, W.M. & Cheng, C.Y. 2009, "Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 41, no. 11, pp. 2302-2314.
- Li, Z., Zhang, H., Gibson, M. & Li, J. 2012, "An evaluation on combination effects of phenolic endocrine disruptors by estrogen receptor binding assay", *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, vol. 26, no. 6, pp. 769-774.
- Liu, L., Bao, H., Liu, F., Zhang, J. & Shen, H. 2012, "Phthalates exposure of Chinese reproductive age couples and its effect on male semen quality, a primary study", *Environment international*, vol. 42, pp. 78-83.
- Luconi, M., Muratori, M., Forti, G. & Baldi, E. 1999, "Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 84, no. 5, pp. 1670-1678.
- Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. 2006, "Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 254-255, pp. 179-186.
- Mahalingaiah, S., Meeker, J.D., Pearson, K.R., Calafat, A.M., Ye, X., Petrozza, J. & Hauser, R. 2008, "Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women", *Environmental health perspectives*, vol. 116, no. 2, pp. 173-178.
- Main, K.M., Mortensen, G.K., Kaleva, M.M., Boisen, K.A., Damgaard, I.N., Chellakooty, M., Schmidt, I.M., Suomi, A.M., Virtanen, H.E., Petersen, D.V., Andersson, A.M., Toppari, J. & Skakkebaek, N.E. 2006,

- "Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age", *Environmental health perspectives*, vol. 114, no. 2, pp. 270-276.
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H. & Giesy, J.P. 2013, "Biological impact of phthalates", *Toxicology letters*, vol. 217, no. 1, pp. 50-58.
- Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M. & Eldar-Geva, T. 2006, "Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 12, pp. 3036-3043.
- Marsee, K., Woodruff, T.J., Axelrad, D.A., Calafat, A.M. & Swan, S.H. 2006, "Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance", *Environmental health perspectives*, vol. 114, no. 6, pp. 805-809.
- Martina, C.A., Weiss, B. & Swan, S.H. 2012, "Lifestyle behaviors associated with exposures to endocrine disruptors", *Neurotoxicology*, vol. 33, no. 6, pp. 1427-1433.
- Maslova, E., Bhattacharya, S., Lin, S.W. & Michels, K.B. 2010, "Caffeine consumption during pregnancy and risk of preterm birth: a meta-analysis", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 92, no. 5, pp. 1120-1132.
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R. & Zacharewski, T. 2000, "Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 74, no. 4, pp. 223-234.
- Meeker, J.D., Yang, T., Ye, X., Calafat, A.M. & Hauser, R. 2011, "Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage", *Environmental health perspectives*, vol. 119, no. 2, pp. 252-257.
- Mendiola, J., Jorgensen, N., Andersson, A.M., Calafat, A.M., Ye, X., Redmon, J.B., Drobnis, E.Z., Wang, C., Sparks, A., Thurston, S.W., Liu, F. & Swan, S.H. 2010, "Are environmental levels of bisphenol A associated with reproductive function in fertile men?", *Environmental health perspectives*, vol. 118, no. 9, pp. 1286-1291.
- Meyer, E.P. 1970, "Lactation in rams grazing subterranean clover", *Australian Veterinary Journal*, vol. 46, no. 7, pp. 305-307.
- Miao, M., Yuan, W., Zhu, G., He, X. & Li, D.K. 2011, "In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 32, no. 1, pp. 64-68.
- Miksicek, R.J. 1994, "Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 49, no. 2-3, pp. 153-160.
- Minguez-Alarcon, L., Afeiche, M.C., Chiu, Y.H., Vanegas, J.C., Williams, P.L., Tanrikut, C., Toth, T.L., Hauser, R. & Chavarro, J.E. 2015, "Male soy food intake was not associated with in vitro fertilization outcomes among couples attending a fertility center", *Andrology*, vol. 3, no. 4, pp. 702-708.
- Miodovnik, A., Engel, S.M., Zhu, C., Ye, X., Soorya, L.V., Silva, M.J., Calafat, A.M. & Wolff, M.S. 2011, "Endocrine disruptors and childhood social impairment", *Neurotoxicology*, vol. 32, no. 2, pp. 261-267.
- Mitchell, J.H., Cawood, E., Kinniburgh, D., Provan, A., Collins, A.R. & Irvine, D.S. 2001, "Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 100, no. 6, pp. 613-618.
- Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P.L., Petrozza, J., Wright, D.L., Calafat, A.M., Ye, X. & Hauser, R. 2010, "Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF", *International journal of andrology*, vol. 33, no. 2, pp. 385-393.
- Mortimer, D., Barratt, C.L., Bjorndahl, L., de Jager, C., Jequier, A.M. & Muller, C.H. 2013, "What should it take to describe a substance or product as 'sperm-safe'", *Human reproduction update*, vol. 19 Suppl 1, pp. i1-45.
- Mumford, S.L., Sundaram, R., Schisterman, E.F., Sweeney, A.M., Barr, D.B., Rybak, M.E., Maisog, J.M., Parker, D.L., Pfeiffer, C.M. & Louis, G.M. 2014, "Higher urinary lignan concentrations in women but not men are positively associated with shorter time to pregnancy", *The Journal of nutrition*, vol. 144, no. 3, pp. 352-358.
- Munne, S. & Cohen, J. 1998, "Chromosome abnormalities in human embryos", *Human reproduction update*, vol. 4, no. 6, pp. 842-855.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Shimizu, H., Hayashi, H., Akamatsu, T. & Murase, K. 2001, "Effect of soymilk consumption on serum estrogen and androgen concentrations in Japanese men", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 10, no. 3, pp. 179-184.

- Nahar, M.S., Liao, C., Kannan, K. & Dolinoy, D.C. 2013, "Fetal liver bisphenol A concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 27, no. 2, pp. 116-123.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. & Tyler, C.R. 2004, "Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish", *Environmental health perspectives*, vol. 112, no. 17, pp. 1725-1733.
- Neal, M.S., Zhu, J., Holloway, A.C. & Foster, W.G. 2007, "Follicle growth is inhibited by benzo[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 4, pp. 961-967.
- Newbold, R.R. 2008, "Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES)", *Fertility and sterility*, vol. 89, no. 2 Suppl, pp. e55-6.
- Newbold, R.R. 2004, "Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 199, no. 2, pp. 142-150.
- Newbold, R.R., Hanson, R.B., Jefferson, W.N., Bullock, B.C., Haseman, J. & McLachlan, J.A. 2000, "Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol", *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 7, pp. 1355-1363.
- Novikova, S.I., He, F., Bai, J., Cutrufello, N.J., Lidow, M.S. & Undiech, A.S. 2008, "Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring", *PLoS one*, vol. 3, no. 4, pp. e1919.
- Okada, H., Tokunaga, T., Liu, X., Takayanagi, S., Matsushima, A. & Shimohigashi, Y. 2008, "Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma", *Environmental health perspectives*, vol. 116, no. 1, pp. 32-38.
- Paris, F., Balaguer, P., Terouanne, B., Servant, N., Lacoste, C., Cravedi, J.P., Nicolas, J.C. & Sultan, C. 2002, "Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 193, no. 1-2, pp. 43-49.
- Peeters, P.H., Keinan-Boker, L., van der Schouw, Y.T. & Grobbee, D.E. 2003, "Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence", *Breast cancer research and treatment*, vol. 77, no. 2, pp. 171-183.
- Perera, F., Tang, W.Y., Herbstman, J., Tang, D., Levin, L., Miller, R. & Ho, S.M. 2009, "Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma", *PLoS one*, vol. 4, no. 2, pp. e4488.
- Porta, M., Ballester, F., Ribas-Fito, N., Puigdomenech, E., Selva, J. & Llop, S. 2006, "Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish general population. Criteria for a diagnosis of the present situation", *Gaceta sanitaria / S.E.S.P.A.S.*, vol. 20, no. 3, pp. 233-238.
- Porta, M., Kogevinas, M., Zumeta, E., Sunyer, J., Ribas-Fito, N., Ruiz, L., Jarrod, M., Vioque, J., Alguacil, J., Martin, P., Malats, N., Ayude, D. & Grupo de Trabajo sobre Compuestos Tóxicos Persistentes y Salud del IMIM 2002, "Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish population: a puzzle without pieces and the protection of public health", *Gaceta sanitaria / S.E.S.P.A.S.*, vol. 16, no. 3, pp. 257-266.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine 2008, "Smoking and infertility", *Fertility and sterility*, vol. 90, no. 5 Suppl, pp. S254-9.
- Prusakiewicz, J.J., Harville, H.M., Zhang, Y., Ackermann, C. & Voorman, R.L. 2007, "Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects", *Toxicology*, vol. 232, no. 3, pp. 248-256.
- Rappaport, S.M. & Smith, M.T. 2010, "Epidemiology. Environment and disease risks", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 330, no. 6003, pp. 460-461.
- Rathee, M., Malik, P. & Singh, J. 2012, "Bisphenol A in dental sealants and its estrogen like effect", *Indian journal of endocrinology and metabolism*, vol. 16, no. 3, pp. 339-342.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabolini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenbergh, J.G., Walser-Kuntz, D.R. & vom Saal, F.S. 2007, "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 24, no. 2, pp. 199-224.
- Robbins, W.A., Vine, M.F., Truong, K.Y. & Everson, R.B. 1997, "Use of fluorescence in situ

- hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men", *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 175-183.
- Robeson, L.M. 1985, "Phase behavior of polyarylate blends", *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 30, no. 10, pp. 4081-4098.
- Rochester, J.R. 2013, "Bisphenol A and human health: a review of the literature", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 42, pp. 132-155.
- Rodrigo, L., Mateu, E., Mercader, A., Cobo, A.C., Peinado, V., Milan, M., Al-Asmar, N., Campos-Galindo, I., Garcia-Herrero, S., Mir, P., Simon, C. & Rubio, C. 2014, "New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization", *BioMed research international*, vol. 2014, pp. 517125.
- Rodrigo, L., Peinado, V., Mateu, E., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Gil-Salom, M. & Rubio, C. 2010, "Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos", *Fertility and sterility*, vol. 94, no. 4, pp. 1380-1386.
- Rodrigo, L., Rubio, C., Peinado, V., Villamon, R., Al-Asmar, N., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. & Gil-Salom, M. 2011, "Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 3, pp. 1005-1012.
- Rosen, M.P., Johnstone, E., McCulloch, C.E., Schuh-Huerta, S.M., Sternfeld, B., Reijo-Pera, R.A. & Cedars, M.I. 2012, "A characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age", *Fertility and sterility*, vol. 97, no. 1, pp. 238-243.
- Rosevear, S.K., Holt, D.W., Lee, T.D., Ford, W.C., Wardle, P.G. & Hull, M.G. 1992, "Smoking and decreased fertilisation rates in vitro", *Lancet (London, England)*, vol. 340, no. 8829, pp. 1195-1196.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J. & Sumpter, J.P. 1998, "Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 153, no. 1, pp. 12-19.
- Roy, P., Salminen, H., Koskimies, P., Simola, J., Smeds, A., Saukko, P. & Huhtaniemi, I.T. 2004, "Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 88, no. 2, pp. 157-166.
- Rozati, R., Reddy, P.P., Reddanna, P. & Mujtaba, R. 2002, "Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility", *Fertility and sterility*, vol. 78, no. 6, pp. 1187-1194.
- Rubes, J., Lowe, X., Moore, D., 2nd, Perreault, S., Slott, V., Evenson, D., Selevan, S.G. & Wyrobek, A.J. 1998, "Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men", *Fertility and sterility*, vol. 70, no. 4, pp. 715-723.
- Rubin, B.S. 2011, "Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 127, no. 1-2, pp. 27-34.
- Rubio, C., Gil-Salom, M., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Minguéz, Y., Remohi, J. & Pellicer, A. 2001, "Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 10, pp. 2084-2092.
- Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R. & Brody, J.G. 2003, "Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust", *Environmental science & technology*, vol. 37, no. 20, pp. 4543-4553.
- Rudel, R.A. & Perovich, L.J. 2009, "Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air", *Atmospheric environment (Oxford, England : 1994)*, vol. 43, no. 1, pp. 170-181.
- Salian, S., Doshi, T. & Vanage, G. 2009, "Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis", *Toxicology*, vol. 265, no. 1-2, pp. 56-67.
- Santell, R.C., Chang, Y.C., Nair, M.G. & Helferich, W.G. 1997, "Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats", *The Journal of nutrition*, vol. 127, no. 2, pp. 263-269.
- Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K., Tachino, H., Tsuchida, K. & Kubono, K. 2005, "Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin", *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 16, no. 4, pp. 297-300.
- Schiffer, C., Muller, A., Egeberg, D.L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., Frederiksen, H.,

- Waschle, B., Kaupp, U.B., Balbach, M., Wachten, D., Skakkebaek, N.E., Almstrup, K. & Strunker, T. 2014, "Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm", *EMBO reports*, vol. 15, no. 7, pp. 758-765.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M. & Chahoud, I. 2002, "Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit", *Environmental health perspectives*, vol. 110, no. 11, pp. A703-7.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B. & Heindel, J.J. 2011, "Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 127, no. 3-5, pp. 204-215.
- Seppen, J. 2012, "A diet containing the soy phytoestrogen genistein causes infertility in female rats partially deficient in UDP glucuronyltransferase", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 264, no. 3, pp. 335-342.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. & Heubi, J.E. 1998, "Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 68, no. 6 Suppl, pp. 1453S-1461S.
- Shea, K.M. & American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health 2003, "Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers", *Pediatrics*, vol. 111, no. 6 Pt 1, pp. 1467-1474.
- Shi, Q., Ko, E., Barclay, L., Hoang, T., Rademaker, A. & Martin, R. 2001, "Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm", *Molecular reproduction and development*, vol. 59, no. 4, pp. 417-421.
- Silva, M.J., Reidy, J.A., Samandar, E., Herbert, A.R., Needham, L.L. & Calafat, A.M. 2005, "Detection of phthalate metabolites in human saliva", *Archives of Toxicology*, vol. 79, no. 11, pp. 647-652.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E. & Main, K.M. 2001, "Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 5, pp. 972-978.
- Skinner, M.K. 2011, "Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance", *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, vol. 93, no. 1, pp. 51-55.
- Smith, K.W., Braun, J.M., Williams, P.L., Ehrlich, S., Correia, K.F., Calafat, A.M., Ye, X., Ford, J., Keller, M., Meeker, J.D. & Hauser, R. 2012, "Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy", *Environmental health perspectives*, vol. 120, no. 11, pp. 1538-1543.
- Smith, K.W., Braun, J.M., Williams, P.L., Ehrlich, S., Correia, K.F., Calafat, A.M., Ye, X., Ford, J., Keller, M., Meeker, J.D. & Hauser, R. 2012, "Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy", *Environmental health perspectives*, vol. 120, no. 11, pp. 1538-1543.
- Smith, K.W., Braun, J.M., Williams, P.L., Ehrlich, S., Correia, K.F., Calafat, A.M., Ye, X., Ford, J., Keller, M., Meeker, J.D. & Hauser, R. 2012, "Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy", *Environmental health perspectives*, vol. 120, no. 11, pp. 1538-1543.
- Smith, K.W., Souter, I., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P.L., Calafat, A.M. & Hauser, R. 2013, "Urinary paraben concentrations and ovarian aging among women from a fertility center", *Environmental health perspectives*, vol. 121, no. 11-12, pp. 1299-1305.
- Snijder, C.A., Roeleveld, N., Te Velde, E., Steegers, E.A., Raat, H., Hofman, A., Jaddoe, V.W. & Burdorf, A. 2012, "Occupational exposure to chemicals and fetal growth: the Generation R Study", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 3, pp. 910-920.
- Song, T.T., Hendrich, S. & Murphy, P.A. 1999, "Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 1607-1610.
- Stahlhut, R.W., Welshons, W.V. & Swan, S.H. 2009, "Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both", *Environmental health perspectives*, vol. 117, no. 5, pp. 784-789.
- Stark, A. & Madar, Z. 2002, "Phytoestrogens: a review of recent findings", *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, vol. 15, no. 5, pp. 561-572.
- Strauss, L., Makela, S., Joshi, S., Huhtaniemi, I. & Santti, R. 1998, "Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 144, no. 1-2, pp. 83-93.
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Katano, K., Suzumori, N., Kitaori, T. & Mizutani, E. 2012, "Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage",

- Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 8, pp. 2297-2303.
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T. & Suzumori, K. 2005, "Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 20, no. 8, pp. 2325-2329.
- Sun, L., Zha, J. & Wang, Z. 2009, "Interactions between estrogenic chemicals in binary mixtures investigated using vitellogenin induction and factorial analysis", *Chemosphere*, vol. 75, no. 3, pp. 410-415.
- Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N. & Nakashima, K. 2004, "Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection", *Biomedical chromatography : BMC*, vol. 18, no. 8, pp. 501-507.
- Susiarjo, M., Hassold, T.J., Freeman, E. & Hunt, P.A. 2007, "Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse", *PLoS genetics*, vol. 3, no. 1, pp. e5.
- Thomas, P. & Dong, J. 2006, "Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 102, no. 1-5, pp. 175-179.
- Tranfo, G., Papaleo, B., Caporossi, L., Capanna, S., De Rosa, M., Pignini, D., Corsetti, F. & Paci, E. 2013, "Urinary metabolite concentrations of phthalate metabolites in Central Italy healthy volunteers determined by a validated HPLC/MS/MS analytical method", *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 216, no. 4, pp. 481-485.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Jr, Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T. & Myers, J.P. 2012, "Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses", *Endocrine reviews*, vol. 33, no. 3, pp. 378-455.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N. & Welshons, W.V. 2007, "Human exposure to bisphenol A (BPA)", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 24, no. 2, pp. 139-177.
- Vandenberg, L.N., Hunt, P.A., Myers, J.P. & Vom Saal, F.S. 2013, "Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions", *Reviews on environmental health*, vol. 28, no. 1, pp. 37-58.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. & Soto, A.M. 2009, "Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption", *Endocrine reviews*, vol. 30, no. 1, pp. 75-95.
- Vanegas, J.C., Afeiche, M.C., Gaskins, A.J., Minguéz-Alarcon, L., Williams, P.L., Wright, D.L., Toth, T.L., Hauser, R. & Chavarro, J.E. 2015, "Soy food intake and treatment outcomes of women undergoing assisted reproductive technology", *Fertility and sterility*, vol. 103, no. 3, pp. 749-55.e2.
- Vine, M.F., Hulka, B.S., Margolin, B.H., Truong, Y.K., Hu, P.C., Schramm, M.M., Griffith, J.D., McCann, M. & Everson, R.B. 1993, "Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers", *American Journal of Public Health*, vol. 83, no. 9, pp. 1335-1338.
- Vo, T.T., Yoo, Y.M., Choi, K.C. & Jeung, E.B. 2010, "Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 29, no. 3, pp. 306-316.
- Volkel, W., Bittner, N. & Dekant, W. 2005, "Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 33, no. 11, pp. 1748-1757.
- Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G.A., Filser, J.G. & Dekant, W. 2002, "Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration", *Chemical research in toxicology*, vol. 15, no. 10, pp. 1281-1287.
- vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S., Crain, D.A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L.J., Jr, Hauser, R., Heindel, J.J., Ho, S.M., Hunt, P.A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R.A., Knudsen, K.E., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Marcus, M., McLachlan, J.A., Myers, J.P., Nadal, A., Newbold, R.R., Olea, N., Prins, G.S., Richter, C.A., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Vandenberg, L.N., Walser-Kuntz, D.R., Watson, C.S., Welshons, W.V., Wetherill, Y. & Zoeller, R.T. 2007, "Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 24, no. 2, pp. 131-138.
- vom Saal, F.S. & Myers, J.P. 2008, "Bisphenol A and risk of metabolic disorders", *Jama*, vol. 300, no. 11, pp. 1353-1355.

- Wagner, J.D., Zhang, L., Shadoan, M.K., Kavanagh, K., Chen, H., Tresnasari, K., Kaplan, J.R. & Adams, M.R. 2008, "Effects of soy protein and isoflavones on insulin resistance and adiponectin in male monkeys", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 57, no. 7 Suppl 1, pp. S24-31.
- Waylen, A.L., Metwally, M., Jones, G.L., Wilkinson, A.J. & Ledger, W.L. 2009, "Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis", *Human reproduction update*, vol. 15, no. 1, pp. 31-44.
- Weinhold, B. 2003, "Body of evidence", *Environmental health perspectives*, vol. 111, no. 7, pp. A394-9.
- Weiss, T. & Eckert, A. 1989, "Cotinine levels in follicular fluid and serum of IVF patients: effect on granulosa-luteal cell function in vitro", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 4, no. 5, pp. 482-485.
- Welshons, W.V., Nagel, S.C. & vom Saal, F.S. 2006, "Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure", *Endocrinology*, vol. 147, no. 6 Suppl, pp. S56-69.
- Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M. & vom Saal, F.S. 2003, "Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity", *Environmental health perspectives*, vol. 111, no. 8, pp. 994-1006.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T. & Belcher, S.M. 2007, "In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 24, no. 2, pp. 178-198.
- Whyatt, R.M., Adibi, J.J., Calafat, A.M., Camann, D.E., Rauh, V., Bhat, H.K., Perera, F.P., Andrews, H., Just, A.C., Hoepner, L., Tang, D. & Hauser, R. 2009, "Prenatal di(2-ethylhexyl)phthalate exposure and length of gestation among an inner-city cohort", *Pediatrics*, vol. 124, no. 6, pp. e1213-20.
- Wild, C.P. 2012, "The exposome: from concept to utility", *International journal of epidemiology*, vol. 41, no. 1, pp. 24-32.
- Wild, C.P. 2009, "Environmental exposure measurement in cancer epidemiology", *Mutagenesis*, vol. 24, no. 2, pp. 117-125.
- Wild, C.P. 2005, "Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 14, no. 8, pp. 1847-1850.
- Windham, G.C., Mitchell, P., Anderson, M. & Lasley, B.L. 2005, "Cigarette smoking and effects on hormone function in premenopausal women", *Environmental health perspectives*, vol. 113, no. 10, pp. 1285-1290.
- Wirth, J.J., Rossano, M.G., Potter, R., Puscheck, E., Daly, D.C., Paneth, N., Krawetz, S.A., Protas, B.M. & Diamond, M.P. 2008, "A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality", *Systems biology in reproductive medicine*, vol. 54, no. 3, pp. 143-154.
- Wolff, M.S., Teitelbaum, S.L., Pinney, S.M., Windham, G., Liao, L., Biro, F., Kushi, L.H., Erdmann, C., Hiatt, R.A., Rybak, M.E., Calafat, A.M. & Breast Cancer and Environment Research Centers 2010, "Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls", *Environmental health perspectives*, vol. 118, no. 7, pp. 1039-1046.
- Woodruff, T.J. 2011, "Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 127, no. 1-2, pp. 108-117.
- Woodruff, T.J., Carlson, A., Schwartz, J.M. & Giudice, L.C. 2008, "Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary", *Fertility and sterility*, vol. 89, no. 2, pp. 281-300.
- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N. & Watson, C.S. 2005, "Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca<sup>2+</sup> fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells", *Environmental health perspectives*, vol. 113, no. 4, pp. 431-439.
- Yaoi, T., Itoh, K., Nakamura, K., Ogi, H., Fujiwara, Y. & Fushiki, S. 2008, "Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 376, no. 3, pp. 563-567.
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Bishop, A.M., Needham, L.L. & Calafat, A.M. 2006, "Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope

- dilution tandem mass spectrometry", *Journal of chromatography.B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, vol. 844, no. 1, pp. 53-59.
- Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L.L. & Calafat, A.M. 2005, "Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine", *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 16, pp. 5407-5413.
- Zenzes, M.T. & Reed, T.E. 1998, "Interovarian differences in levels of cotinine, a major metabolite of nicotine, in women undergoing IVF who are exposed to cigarette smoke", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 15, no. 2, pp. 99-103.
- Zenzes, M.T., Reed, T.E., Wang, P. & Klein, J. 1996, "Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in in vitro fertilization therapy", *Fertility and sterility*, vol. 66, no. 4, pp. 614-619.
- Zenzes, M.T., Wang, P. & Casper, R.F. 1995, "Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 10, no. 12, pp. 3213-3217.
- Zhou, Q., Miao, M., Ran, M., Ding, L., Bai, L., Wu, T., Yuan, W., Gao, E., Wang, J., Li, G. & Li, D.K. 2013, "Serum bisphenol-A concentration and sex hormone levels in men", *Fertility and sterility*, vol. 100, no. 2, pp. 478-482.
- Zoeller, R.T. 2006, "Endocrine disruptors: do family lines carry an epigenetic record of previous generations' exposures?", *Endocrinology*, vol. 147, no. 12, pp. 5513-5514.



# ANEXOS



# Anexo I



**CERTIFICADO DEL CEIC IVI VALENCIA SOBRE EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE EL RIESGO REPRODUCTIVO POR EXPOSICIÓN A ALTERADORES ENDOCRINOS: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PREDICTIVOS DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN EMBRIONES Y EN ESPERMATÓZOIDES”**

D. Miguel Moreno Albiñana, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica de IVI Valencia,

**CERTIFICA**

**I.- Que este Comité ha evaluado la propuesta del Promotor del Estudio denominado:**

- Título: *“Estudio preliminar sobre el riesgo reproductivo por exposición a alteradores endocrinos: identificación de marcadores predictivos de anomalías cromosómicas en embriones y en espermatozoides.”*
- Código del Protocolo del Promotor / Promotor: 1307-C-122-CR / IVIOMICS
- Investigador Principal: Dra. Inmaculada Campos-Galindo
- Versión / Fecha del Protocolo: Versión 1 / 12 de noviembre de 2013.
- Versión / Hoja de Información al Sujeto Consentimiento Informado: Versión 1 / 12 de noviembre de 2013.

**II.- Que tomando en consideración:**

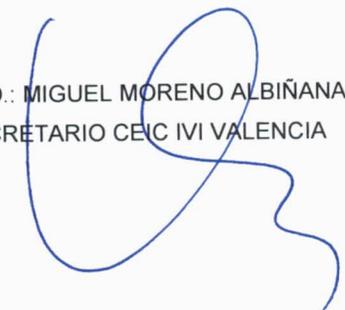
- La pertinencia del Estudio, idoneidad de investigadores y colaboradores, idoneidad de instalaciones, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, de la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Asistida, el Real Decreto 1.301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos; y las normas que las desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.

En su virtud, este Comité emite **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho Estudio.

Lo que firmo en Valencia a de 12 de noviembre de 2013



FDO.: VICENTE SERRA SERRA  
Vº Bº DEL PRESIDENTE



FDO.: MIGUEL MORENO ALBIÑANA  
SECRETARIO CEIC IVI VALENCIA



# Anexo II



# ESTUDIO EXPOSOMA

Estimados pacientes,

Su historia clínica reproductiva les convierte en candidatos idóneos para ser incluidos en nuestro estudio. Dada la relevancia de su participación en el mismo, les agradeceríamos que lo tomaran en consideración.

Sabemos que el periodo preconcepcional, periconcepcional y el embarazo son etapas altamente sensibles a los agentes externos. Recientemente, se ha sugerido que ciertos compuestos químicos incluidos en la composición de productos de uso cotidiano, podrían influir en la salud reproductiva de hombres y mujeres. Nuestro objetivo es investigar una posible asociación entre los niveles corporales de estos compuestos y el resultado del tratamiento de reproducción asistida realizado.

## ¿En qué va a consistir su participación?

### Día de la consulta

<b>En la consulta</b>		<b>PRESENTACIÓN ESTUDIO</b>		♀ ♂
		<b>CUESTIONARIO</b> (Cumplimentar en casa)		
		<b>INFORMACIÓN y CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>		

### Día de la punción

<b>En casa</b>	→	<b>ORINA</b> (1ª orina de la mañana)		♀ ♂
		Entregar CUESTIONARIO		
<b>En el Quirófano</b>		<b>SANGRE</b>		
<b>En el Lab. de FIV</b>		<b>LÍQUIDO FOLICULAR</b>	Este material <b>SIEMPRE</b> se desecha	♀
		<b>SEMEN</b>	<b>UNICAMENTE</b> utilizaremos el sobrante	♂

### Día del transfer

<b>En casa</b>	→	<b>ORINA</b> (1ª orina de la mañana)	♀ ♂
----------------	---	---	-----



# ESTUDIO EXPOSOMA

Estimada donante de ovocitos,

Sus características clínicas le convierten en un candidato idóneo para ser incluido en nuestro estudio. Dada la relevancia de su participación en el mismo le agradeceríamos que lo tomara en consideración.

Sabemos que el periodo preconcepcional, periconcepcional y el embarazo son etapas altamente sensibles a los agentes externos. Recientemente, se ha sugerido que ciertos compuestos químicos incluidos en la composición de productos de uso cotidiano, podrían influir en la salud reproductiva de hombres y mujeres. Nuestro objetivo es investigar una posible asociación entre los niveles corporales de estos compuestos y el resultado del tratamiento de reproducción asistida realizado.

## ¿En qué va a consistir su participación?

### Día de la visita a IVI

En la Consulta		PRESENTACIÓN ESTUDIO
		CUESTIONARIO (cumplimentar en casa)
		INFORMACIÓN y CONSENTIMIENTO INFORMADO

### Día de la Punción

En casa		Entregar CUESTIONARIO
		ORINA (1ª orina de la mañana)
En el Lab. Gnal		SANGRE
En el Qx		LÍQUIDO FOLICULAR

### 5 días tras la Punción

En casa		ORINA (1ª orina de la mañana)
---------	--	----------------------------------



# ESTUDIO EXPOSOMA

Estimado donante de semen,

Sus características clínicas le convierten en un candidato idóneo para ser incluido en nuestro estudio. Dada la relevancia de su participación en el mismo le agradeceríamos que lo tomara en consideración.

Sabemos que el periodo preconcepcional, periconcepcional y el embarazo son etapas altamente sensibles a los agentes externos. Recientemente, se ha sugerido que ciertos compuestos químicos incluidos en la composición de productos de uso cotidiano, podrían influir en la salud reproductiva de hombres y mujeres. Nuestro objetivo es investigar una posible asociación entre los niveles corporales de estos compuestos y el resultado del tratamiento de reproducción asistida realizado.

## ¿En qué va a consistir su participación?

### Día de la visita a IVI

En la Consulta		PRESENTACIÓN ESTUDIO
		CUESTIONARIO (cumplimentar en casa)
		INFORMACIÓN y CONSENTIMIENTO INFORMADO

### Día de la donación

En casa		Entregar CUESTIONARIO
		ORINA (1ª orina de la mañana)
En el Lab. Gnal		SANGRE
En el lab. de FIV		SEMEN UNICAMENTE utilizaremos el sobrante

### 5 días tras la donación

En casa		ORINA (1ª orina de la mañana)
---------	--	----------------------------------



# Anexo III





## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

NHC

NOMBRE Y APELLIDOS

CLÍNICA IVI

FECHA

Código: 1307-C-122-CR

### ESTUDIO:

**RIESGO REPRODUCTIVO POR EXPOSICIÓN A ALTERADORES ENDOCRINOS: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PREDICTIVOS DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN EMBRIONES Y EN ESPERMATOZOIDES**

**Investigadores Principales: Dra. Carmen Rubio (IVIOMICS). Dr. Francisco Domínguez (Fundación IVI)**

Le invitamos a participar en este estudio de investigación. Antes de confirmar su participación en el estudio es importante que entienda en qué consiste, por lo que rogamos **lea detenidamente este documento** y haga todas las preguntas que le puedan surgir al respecto. Debe saber que este estudio ha sido aprobado previamente por el *Comité Ético de Investigación Clínica del IVI* correspondiente de acuerdo a la legislación vigente, *Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica*.

### PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es totalmente **voluntaria**. Este consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio y además, su médico comentará esta información con Ud. Cuando haya comprendido el estudio se le solicitará que firme este consentimiento informado si desea participar en él. Se le dará una copia de este documento para que pueda guardarlo. Con el fin de que pueda decidir si desea participar en este estudio, Ud. debe comprender las **ventajas e inconvenientes** del mismo para que sea capaz de tomar una decisión informada al respecto. Este proceso es lo que se conoce como consentimiento informado.

Ud. recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda u aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación. También se le proporcionará información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar a su voluntad para continuar participando.

### DERECHO A PREGUNTAR SOBRE EL ESTUDIO Y A ABANDONARLO

Si Ud. tiene alguna pregunta con respecto al estudio o a sus derechos como paciente puede contactar con el investigador que realiza el estudio.

Si Ud. decidiera participar, **podrá retirarse del estudio en cualquier momento** sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello afecte a su atención médica posterior.

### DESCRIPCIÓN Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Sabemos que las **anomalías cromosómicas** están presentes en el 40-70% de los abortos espontáneos esporádicos y que son responsables de problemas reproductivos, como son el **fallo repetido de implantación** y el **aborto de repetición**. Los motivos por los que ciertas parejas presentan mayor porcentaje de embriones anormales se desconocen en la mayoría de los casos. La intención de este estudio es determinar si algunos factores genéticos y/o algunos estilos de vida pueden contribuir a la generación de embriones con anomalías cromosómicas.

### CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

La selección de las personas invitadas a participar depende de unos criterios que están descritos en el protocolo de la investigación.

**PARA PACIENTE MUJER:** Ud. es invitada a participar porque cumple con esos criterios: mujer menor de 38 años con historia de **aborto de repetición** (al menos dos abortos previos tras gestación espontánea o tras técnicas de reproducción asistida, en las que la etiología del aborto se considere como desconocida), **fallo de implantación** (2 ó más fallos de implantación en ciclos previos) o **infertilidad por factor masculino** (varones con concentración seminal menor de 2 millones/mL) sin otros antecedentes

que los justifiquen y que se vaya a someter a un ciclo de Diagnóstico Genético Preimplantacional con ovocitos y semen propios.

- **PARA PACIENTE HOMBRE:** Ud. es invitado a participar porque cumple con esos criterios: pareja de mujer menor de 38 años con historia de aborto de repetición, fallo de implantación o infertilidad por factor masculino, sin otros antecedentes que los justifiquen y que se vaya a someter a un ciclo de Diagnóstico Genético Preimplantacional con ovocitos y semen propios.
- **GRUPO CONTROL FEMENINO:** Ud. es invitada a participar porque cumple con esos criterios: mujer incluida en el programa de donación de ovocitos y con cariotipo normal.
- **GRUPO CONTROL MASCULINO:** Ud. es invitado a participar porque cumple con esos criterios: varón incluido en el programa de donación de semen y con cariotipo normal.

#### PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO, MUESTRAS A RECOGER Y RIESGOS ASOCIADOS AL ESTUDIO

- Complimentar un **cuestionario** que le entregará su ginecólogo (le llevará unos 15 minutos). Del análisis de las respuestas obtendremos unos datos que serán analizados estadísticamente comparándolos con un grupo control. La realización del cuestionario no comporta ningún riesgo para Ud.
- Recogida de la primera orina del día **orina** el día de la punción y el día del transfer. La recogida de la muestra de orina de forma espontánea no supone ningún riesgo para Ud.
- Extracción de **sangre periférica** el día de la punción. La extracción de sangre no conlleva más molestias que un simple pinchazo en el brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirán en pocos días.

Las muestras biológicas que se describen a continuación se descartan habitualmente en el laboratorio de FIV después de realizar el protocolo asociado a su tratamiento, no comprometiéndose nunca el resultado del mismo.

- **Semen y plasma seminal** descartados tras realizar el ICSI.
- **Células de la granulosa** descartadas de los ovocitos tras su decumulación rutinaria para realizar el ICSI.
- **Líquido folicular** descartado tras la aspiración folicular y el aislamiento e identificación de los óvulos recuperados para posterior ICSI.

Las muestras sobrantes no serán almacenadas tras su análisis.

#### BENEFICIOS ASOCIADOS AL ESTUDIO

**No existe ningún beneficio personal para Ud.** por el hecho de participar en el estudio; sin embargo, la información que se obtenga podría derivar en un mayor conocimiento de las causas del aborto de repetición o el fallo de implantación y beneficiar al mejor tratamiento de los pacientes con aborto de repetición o el fallo de implantación. No existen compensaciones o pagos por su participación.

Ud. podrá recibir los resultados de las pruebas que se le practiquen si así lo solicita. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

#### RESPONSABILIDADES DEL PARTICIPANTE

El participante se compromete a ser veraz en los datos que facilite y en seguir en todo momento las instrucciones que le dará el investigador/ginecólogo responsable.

#### PERMISO PARA LA REVISION DE SUS DATOS / CONFIDENCIALIDAD

Su identidad y todos los datos referentes a su información personal serán **confidenciales**, salvo que se solicite lo contrario por la ley. El equipo que lleva a cabo el estudio recogerá información acerca de Ud. y utilizará tan sólo sus iniciales. No se publicará ninguna información que lo identifique. Se respetará lo establecido en los apartados 23 y 26 de la *Declaración de Helsinki*. En ningún caso se podrá inferir ningún tipo de información genética de usted en el estudio. Se permitirá el acceso para la revisión de sus registros médicos al Comité Ético, y a las Autoridades Sanitarias. Firmando este documento Ud. está de acuerdo con lo expuesto. Sus datos se encontrarán protegidos por la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal*.

#### INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL ESTUDIO

La Dra. Carmen Rubio (Carmen.Rubio@iviomics.com) será la persona a la que usted deba llamar para consultar cualquier duda o pregunta en relación con el estudio.



**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO**

TÍTULO DEL ESTUDIO/código:

EFFECTO DE LOS ALTERADORES ENDOCRINOS EN LA INFERTILIDAD Y EN LA INCIDENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. Código: 1307-C-122-CR

Yo,

.....  
(nombre y apellidos)

con NIF ..... y NHC .....

he leído la hoja de información que se me ha entregado,  
he podido hacer preguntas sobre el estudio,  
he recibido suficiente información sobre el estudio y  
he hablado con .....  
(nombre del médico/investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1. Cuando quiera
- 2. Sin tener que dar explicaciones
- 3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que la muestras de sangre y/o orina obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con el protocolo actual, quedando excluidos los análisis genéticos siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio: SÍ  NO

Firma del paciente:

Firma del médico/investigador:

.....  
(nombre y apellidos)

.....  
(nombre y apellidos)

Fecha: .....

Fecha: .....



# **Anexo IV**





NHC

NOMBRE Y APELLIDOS

CLÍNICA IVI

GINECÓLOGO

FECHA

El **periodo preconcepcional**, **periconcepcional** y el **embarazo** son etapas altamente sensibles a los **agentes externos**. Recientemente, se ha sugerido que ciertos **compuestos químicos** incluidos en la composición de **productos de uso cotidiano**, podrían influir en la salud reproductiva de hombres y mujeres. El siguiente cuestionario pretende recopilar información sobre la exposición a diferentes compuestos químicos para investigar su posible asociación con el resultado del tratamiento de reproducción asistida realizado. Sus respuestas serán de gran utilidad, por lo que le rogamos preste su **máxima atención**. Cuando una respuesta no se adapte plenamente a su rutina, trate de aproximarla a las situaciones indicadas.

Si tiene alguna **duda sobre este cuestionario**, puede enviar un email a la siguiente dirección:  
Inmaculada.Campos@iviomics.com

(Cuestionario basado en CFA de 101 INMA EMBARAZADAS de Vioque. Nutr J. 2013)

## FACTORES SOCIODEMOGRÁFICOS

- Edad: \_\_\_\_\_ años.
- Edad de su madre: \_\_\_\_\_ años. Profesión de la madre: \_\_\_\_\_ . Edad en el momento del nacimiento del paciente: \_\_\_\_\_ .
- Edad de su padre: \_\_\_\_\_ años. Profesión del padre: \_\_\_\_\_ . Edad en el momento del nacimiento del paciente: \_\_\_\_\_ .
- Altura: \_\_\_\_\_ m.
- Peso: \_\_\_\_\_ kg.
- País de origen \_\_\_\_\_ .
- Raza:
  - Caucasiana
  - Afroamericana
  - Asiática
  - Hispana
  - Gitana
  - Africana
  - Árabe
  - Otra
- Nivel educativo:
  - Educación primaria
  - Educación secundaria
  - Formación profesional
  - Universitario
- Profesión: \_\_\_\_\_ .
- En su trabajo, ¿está expuesto a productos químicos?
  - No
  - Sí. ¿Cuál/es? \_\_\_\_\_
- Lugar de residencia: Localidad/pueblo/ciudad: \_\_\_\_\_

## ESTILO DE VIDA

- ¿Cuántas horas al día suele **dormir**, incluida la siesta? \_\_\_\_\_ horas.
- En su actividad en **el trabajo u ocupación principal** está...
  - Casi siempre sentado
  - Sentado la mitad del tiempo
  - Casi siempre de pie, quieto
  - Casi siempre caminando, levantando y llevando pocas cosas
  - Casi siempre caminando, levantando y llevando muchas cosas
  - Trabajo manual pesado

- ¿Cuánto tiempo **camina** al día?
  - Casi nunca
  - Menos de 20 minutos al día
  - 20-40 minutos al día
  - 40-60 minutos al día
  - Entre 1 y 1 hora y media al día
  - 6 ó más de 1 hora y media al día
- ¿Cuánto tiempo hace **bicicleta** a la semana?
  - Casi nunca
  - Menos de 20 minutos a la semana
  - 20-40 minutos a la semana
  - 40-60 minutos a la semana
  - Entre 1 y 1 hora y media a la semana
  - 6 ó más de 1 hora y media a la semana
- ¿Cuánto tiempo dedica a **actividades o tareas en casa**?
  - Menos de 1 hora al día
  - 1-2 horas / día
  - 3-4 horas / día
  - 5-6 horas / día
  - 7-8 horas / día
  - Más de 8 horas / día
- En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a hacer **ejercicio o deporte**?
  - Menos de 1 hora a la semana
  - 1 hora / semana
  - 2 horas / semana
  - 3 horas / semana
  - 4-5 horas / semana
  - Más de 5 horas / semana
- Considerando **toda su actividad física** (trabajo u ocupación principal, hogar y tiempo libre), ¿cómo se considera Ud.?
  - Sedentario (sentado casi siempre, sin actividad física, sin deporte, bajo cuidados).
  - Poco activo (profesiones o actividades sentadas, amas de casa con electrodomésticos, escaso deporte).
  - Moderadamente activo (trabajos manuales, amas de casa sin electrodomésticos, deporte ligero, etc.)
  - Bastante activo (trabajos o actividades de pie-andando, deporte intenso, etc.).
  - Muy activo (Trabajo muy vigoroso, deporte fuerte diario)
  - No sabe / no contesta
- **Tabaquismo:**
  - Nunca
  - Exfumador. ¿Desde cuándo? \_\_\_\_\_ años.
  - Actualmente fumador: \_\_\_\_\_ nº cigarrillos/día
  - Fumador pasivo
- ¿Con qué frecuencia consume... (número de veces)

	Nunca o menos de 1 al mes	1-3 al mes	1 a la semana	2-4 a la semana	5-6 a la semana	1 al día	2-3 al día	4-5 al día	6 ó más al día
Agua embotellada en plástico?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agua del grifo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Refrescos enlatados? (naranja, limón...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Refrescos con cafeína? (cola, té...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cerveza enlatada con/sin alcohol?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alcohol? (vino, cerveza...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Destilados? (ron, vodka, ginebra...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zumo de frutas envasado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Café (no descafeinado)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infusiones de té?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yogur?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Embutidos envasados?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carne de ternera, cerdo, cordero, pollo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vísceras?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado BLANCO: merluza, lenguado, dorada...?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado AZUL: atún, emperador, bonito, caballa, sardinas, boquerón/anchovas, salmón...?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atún o bonito enlatado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sardinas o caballa enlatada?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Almejas, mejillones, ostras, crustáceos...?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verdura fresca?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verdura enlatada?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patatas fritas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Salsa de tomate/kétchup, mayonesa, otras salsas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceitunas enlatadas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruta fresca?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruta enlatada?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fruta envasada?	<input type="checkbox"/>								
Zumo natural?	<input type="checkbox"/>								
Chocolate negro o con leche?	<input type="checkbox"/>								

- ¿Es usted **vegetariano**?
  - No
  - Parcial
  - Vegano
  - Estricto
- ¿Consume **soja** en alguna de estas formas?

	1 vez/día	4-6 veces/semana	1-3 veces/semana	1-3 veces/mes	< 1 vez/mes	Nunca
Harina de soja	<input type="checkbox"/>					
Yogur de soja	<input type="checkbox"/>					
Leche de soja	<input type="checkbox"/>					
Soja en bruto	<input type="checkbox"/>					
Soja germinada	<input type="checkbox"/>					
Natto	<input type="checkbox"/>					
Tempeh	<input type="checkbox"/>					
Miso	<input type="checkbox"/>					
Tofu	<input type="checkbox"/>					
Salsa de soja	<input type="checkbox"/>					

- ¿Utiliza envases de plástico para **almacenar** la comida?
  - Sí
  - No
- ¿Utiliza envases de plástico para **calentar** la comida?
  - Sí
  - No
- ¿Reutiliza la misma **botella** de agua de plástico?
  - No
  - Sí:
    - 4 ó más veces a la semana
    - 1-3 veces por semana
- ¿Consume con cierta frecuencia **fármacos** tales como: analgésicos, antigripales, anticatarrales, tratamiento de la migraña, medicamentos para el mareo, antialopécicos, antiasmáticos, ...?
  - No
  - Sí. ¿Cuáles? \_\_\_\_\_
  - Frecuencia/tiempo de consumo: \_\_\_\_\_
- ¿Sigue algún **tratamiento farmacológico crónico** para alguna enfermedad?
  - No
  - Sí. ¿Qué fármaco? \_\_\_\_\_
- ¿Utiliza algún tipo de **terapia alternativa**?
  - No
  - Sí. ¿Cuál? \_\_\_\_\_
- ¿Lleva usted **empastes dentales**?
  - No
  - Sí.
- ¿Utiliza **lentillas** a diario?
  - No
  - Sí.
- En su **cuidado personal**, ¿usa con frecuencia algunos de los siguientes productos?

	1 vez/día	4-6 veces/semana	1-3 veces/semana	1-3 veces/mes	< 1 vez/mes	Nunca
Crema hidratante/antiarrugas	<input type="checkbox"/>					
Leche corporal	<input type="checkbox"/>					
Protector solar	<input type="checkbox"/>					
Autobronceador	<input type="checkbox"/>					
Maquillaje (base, sombra de ojos, máscara de pestañas...)	<input type="checkbox"/>					
Productos desmaquillantes	<input type="checkbox"/>					
Esmalte de uñas	<input type="checkbox"/>					

Gracias por su colaboración.



# Anexo V



## DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS CUESTIONARIOS DE LAS DONANTES DE OVOCITOS

**Actividad física:** Las donantes de ovocitos dormían una media  $8,4 \pm 1,0$  horas al día. Respecto a la actividad física, 9 de las 31 donantes (29,0%) caminaban de 40 a 60 minutos al día, 22 (71%) no hacían bicicleta casi nunca, 14 (45,2%) practicaban deporte menos de 1 hora a la semana, 11 (35,5%) dedicaban de 1 a 2 horas al día a las tareas del hogar, 11 (35,5%) dedicaban de 3 a 4 horas al día a las tareas del hogar, el 70,9% de las donantes realizaban trabajos que implicaban caminar llevando cosas. El 70,9% de las donantes de ovocitos se consideraban a sí mismas moderadamente o bastante activas.

**Consumo de agua:** Diez de las 31 donantes (32,3%) consumían agua en botella de plástico una vez al día. Veintiuna de las 31 donantes (67,7%) no consumía agua del grifo nunca o una vez al mes.

**Bebidas con cafeína e infusiones:** Cinco de las 31 donantes (16,1%) consumían refrescos con cafeína de 2 a 4 veces a la semana. Nueve de las 31 donantes (29,0%) no consumían café nunca o una vez al mes. Catorce de las 31 donantes (45,2%) no consumían infusiones nunca o una vez al mes.

**Consumo de alcohol:** Dieciocho de las 31 donantes (58,1%) no consumía alcohol nunca o una vez al mes. Veinte de las 31 donantes (64,5%) no consumían destilados nunca o una vez al mes.

**Consumo de enlatados:** Cinco de las 31 donantes (12,9%) consumían refrescos enlatados de 5 a 6 veces a la semana. Dieciocho de las 31 (58,1%) donantes no consumían cerveza enlatada con/sin alcohol nunca o 1 vez al mes. Diez de las 31 donantes (32,3%) consumían atún enlatado una vez a la semana. Diecisiete de las 31 donantes (54,8%) consumían sardina enlatada nunca o una vez al mes. Dieciséis de las 31 donantes (51,6%) no consumían verdura enlatada nunca o una vez al mes. Doce de las 31 donantes (38,7%) no consumían aceitunas enlatadas nunca o una vez al mes. Quince de las 31 donantes (48,4%) no consumían fruta enlatada nunca o lo hacían una vez al mes.

**Consumo de envasados:** Nueve de las 31 donantes (29,0%) no consumían zumos de frutas envasados nunca o una vez al mes. Dieciséis de las 31 donantes (51,6%) no consumían fruta envasada nunca o una vez al mes. Nueve de las 31 donantes (29,0%) consumían embutidos envasados de 2 a 4 veces a la semana.

**Consumo de verdura y fruta fresca:** Nueve de las 31 donantes (29,0%) consumían fruta fresca de 2 a 4 veces a la semana. Siete de las 31 donantes (22,6%) consumían zumo natural de 5 a 6 veces a la semana. Ocho de las 31 donantes (25,8%) consumían verdura fresca una vez a la semana.

**Consumo de pescado y marisco:** Diez de las 31 donantes (32,3%) consumían pescado blanco de 2 a 4 veces a la semana. Once de las 31 donantes (35,5%) consumían pescado azul una vez a la semana. Nueve de las 31 donantes (29,0%) no consumían marisco nunca o una vez al mes.

**Consumo de carne y vísceras:** Nueve de las 31 donantes (29,0%) consumían carne de 2 a 4 veces a la semana y 9 (29,0%) consumían carne de 5 a 6 veces a la semana. Catorce de las 31 donantes (45,2%) no consumían vísceras nunca o una vez al mes.

**Consumo de leche y yogur:** Nueve de las 31 donantes (29,0%) consumían leche de 2 a 3 veces al día. Nueve de las 31 donantes (29,0%) consumían yogur una vez a la semana.

**Consumo de chocolate y patatas fritas:** Diez de las 31 donantes (32,3%) consumían patatas fritas de 2 a 4 veces a la semana. Ocho de las donantes (25,8%) no consumían chocolate nunca o una vez al mes.

**Consumo de soja:** La mayoría de donantes de ovocitos no consumían nunca soja en bruto, natto, miso o tempeh. Tres de ellas consumían soja germinada menos de una vez al mes, dos leche de soja menos de una vez al mes, cuatro, harina de soja menos de una vez al mes y dos, tofu menos de una vez al mes. El resto de las donantes no consumía soja germinada, leche de soja, harina de soja, o tofu nunca. Tres de las donantes consumían yogur de soja varias veces a la semana, tres donantes consumían varias veces al mes y el resto nunca. Cinco de las donantes consumían salsa de soja una o varias veces al mes. Dos de las 31 donantes (6,4%) eran vegetarianas parciales.

**Higiene personal:** Doce de las 31 donantes de ovocitos (38,7%) no usaban nunca crema hidratante, 9 (29,0%) usaban nunca leche corporal una vez al día, 11 (35,5%) no usaban nunca fotoprotector solar (FPS), 22 (71,0%) no usaban nunca autobronceador. Nueve de las donantes (29,0%) usaban maquillaje una vez al día. Ocho de las donantes (25,8%) no usaban desmaquillante nunca y 9 (29,0%) usaban esmalte de uñas menos de una vez al mes.

**Tabaquismo:** De las 31 donantes 6 (19,3%) no habían fumado nunca, ninguna era fumadora pasiva, 4 (12,9%) eran exfumadoras y 20 (64,5%) eran fumadoras.

**Contacto con plásticos:** Veintidós de las 31 donantes de ovocitos (71,0%) declararon almacenar alimentos en recipientes de plástico. Veintidós de las donantes (70,97 %) no calentaban alimentos en recipiente de plástico. Veintiuna de las donantes (67,7%) no reutilizaba nunca las botellas de plástico de agua y 10 (32,3%) las reutilizaban con frecuencia o con mucha frecuencia.

**Consumo de fármacos:** 23 de 31 donantes (74,2%) no consumían fármacos rutinariamente. Treinta de las donantes seguía un tratamiento crónico y una de ellas no aportó esta información. Una de las donantes seguía algún tipo de terapia alternativa. Trece de los 31 donantes (41,9%) tenían empastes y ninguna era usuaria de lentillas.

## DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS CUESTIONARIOS DE LOS DONANTES DE SEMEN

**Actividad física:** Los donantes de semen dormían una media de  $8\pm 0$  horas al día. Respecto a la actividad física, 9 de los 25 donantes (36%) caminaban de 20 a 40 minutos al día, 10 (40%) no hacían bicicleta casi nunca, 9 (36%) practicaban deporte más de 5 horas a la semana, 13 de los donantes (52%) dedicaban de 1 a 2 horas al día a las tareas del hogar, el 52% de los donantes realizaban trabajos en los que estaban la mayoría del tiempo sentados y el 44% realizaban trabajos que implicaban caminar llevando cosas. El 64% de los donantes de semen se consideraban a sí mismos moderadamente o bastante activos.

**Consumo de agua:** Seis de los 25 donantes (24%) consumían agua en botella de plástico más de 6 días a la semana. Quince de los 25 donantes (56%) no consumían agua del grifo nunca o una vez al mes.

**Bebidas con cafeína e infusiones:** Ocho de los 25 donantes (32%) consumían refrescos con cafeína 1 vez a la semana y 8 (32%) de 2 a 4 veces a la semana. Once de los 25 donantes (44%) no consumían café nunca o una vez al mes. Once de los 25 donantes (44%) no consumían infusiones nunca o una vez al mes.

**Consumo de alcohol:** Ocho de los 25 donantes (32%) consumían alcohol de 1 a 3 veces al mes y 7 (28%) consumían alcohol de 2 a 4 veces a la semana. Doce de los 25 donantes (48%) consumían destilados de 1 a 3 veces al mes y 9 (36%) no consumía destilados nunca o una vez al mes.

**Consumo de enlatados:** Se observó que 8 de los 25 donantes (32%) consumían refrescos enlatados 1 vez a la semana y 7 (28%) de 2 a 4 veces a la semana. En 7 de los 25 (28%) donantes consumían cerveza enlatada con/sin alcohol de 1 a 3 veces al mes y 7 (28%) de 2 a 4 veces a la semana. Nueve de los 25 donantes (36%) consumían atún enlatado de 2 a 4 veces a la semana. Doce de los 25 donantes (48%) consumían sardina enlatada nunca o una vez al mes. Trece de los 25 donantes (52%) no consumían verdura enlatada nunca o una vez al mes. Diez de los 25 donantes (40%) consumían aceitunas enlatadas de 1 a 3 veces al mes. Dieciocho de los 25 donantes (72%) no consumían fruta enlatada nunca o lo hacían una vez al mes.

**Consumo de envasados:** Cinco de los 25 donantes (20%) no consumían zumos de frutas envasados nunca o una vez al mes, 5 (20%) de 1 a 3 veces al mes y 6 de los 25 donantes (24%)

consumían zumos de frutas envasados de 2 a 4 veces a la semana. Catorce de los 25 donantes (56%) no consumían fruta envasada nunca o una vez al mes. Cinco de los 25 donantes (20%) consumían embutidos envasados de 1 a 3 veces al mes y 5 (20%) de 5 a 6 veces a la semana.

**Consumo de verdura y fruta fresca:** Seis de los 25 donantes (24%) consumían fruta fresca de 2 a 4 veces a la semana y 6 (24%) una vez al día. Seis de los 25 donantes (24%) consumían zumo natural de una a 3 veces al mes, 6 (24%) una vez a la semana y 6 de los 25 donantes (24%) consumían zumo natural de 2 a 4 veces a la semana. Seis de los 25 donantes (24%) consumían verdura fresca una vez al día, 5 (20%) de 2 a 4 veces a la semana y 5 de los 25 donantes (20%) consumían verdura fresca 5 a 6 veces a la semana.

**Consumo de pescado y marisco:** Diez de los 25 donantes (40%) consumían pescado blanco de 2 a 4 veces a la semana. Siete de los 25 donantes (28%) consumían pescado azul una vez a la semana y 7 (28%) de 2 a 4 veces a la semana. Once de los 25 donantes (44%) no consumían marisco nunca o una vez al mes.

**Consumo de carne y vísceras:** Doce de los 25 donantes (48%) consumían carne de 2 a 4 veces a la semana. Quince de los 25 donantes (60%) no consumían vísceras nunca o una vez al mes.

**Consumo de leche y yogur:** Nueve de los 25 donantes (36%) consumían leche de 2 a 3 veces al día y 7 (28%) una vez al día. Seis de los 25 donantes (24%) consumían yogur una vez al día, 5 (24%) una vez a la semana y 5 de los 25 donantes (24%) consumían yogur de 2 a 4 veces a la semana.

**Consumo de chocolate y patatas fritas:** Nueve de los 25 donantes (36%) consumían patatas fritas de 2 a 4 veces a la semana y 8 (32%) de 1 a 3 veces al mes. Diez de los 25 donantes (40%) consumían chocolate de 2 a 4 veces a la semana. Uno de los 25 donantes (4%) era vegetariano parcial.

**Consumo de soja:** Los donantes fueron preguntados por su frecuencia de consumo de soja en bruto, germinada, leche y yogur de soja, salsa y harina de soja, tempeh, natto, miso y tofu y, casi la totalidad de los donantes no consumían soja nunca o solo alguna vez al mes.

**Higiene personal:** Catorce de los 25 donantes de semen (56%) no usaban nunca crema hidratante, 19 (76%) no usaban nunca leche corporal, 10 (40%) no usaban nunca fotoprotector solar, 22 (88%) no usaban nunca autobronceador.

**Tabaquismo:** De los 25 donantes 13 (52%) no habían fumado nunca, 2 (8%) eran fumadores pasivos, 2 (8%) eran exfumadores y 8 (32%) eran fumadores.

**Contacto con plásticos:** Diecisiete de los 25 donantes de semen (68%) declararon almacenar alimentos en recipientes de plástico. Dieciséis de 25 (64%) no calentaban alimentos en recipiente de plástico. Trece de los donantes (52%) no reutilizaba nunca las botellas de plástico de agua y 12 (48%) las reutilizaban con frecuencia o con mucha frecuencia.

**Consumo de fármacos:** 22 de 25 donantes (88%) no consumían fármacos rutinariamente. Ninguno de los donantes seguía un tratamiento crónico. Dos (8%) de los donantes seguían algún tipo de terapia alternativa (meditación y relajación). Trece de los 25 donantes (52%) tenían empastes y solo uno de los 25 (4%) era usuario de lentillas.

## DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS CUESTIONARIOS DE LAS PACIENTES FEMENINAS

**Actividad física:** Las pacientes femeninas dormían una media  $8,0 \pm 0,5$  horas al día, 3 de las 10 pacientes femeninas (30%) caminaban de 20 a 40 minutos al día, 6 (60%) no hacían bicicleta casi nunca, 4 (40%) practicaban deporte de 4 a 5 horas a la semana, 5 de las pacientes femeninas (70%) dedicaban de 3 a 4 horas al día a las tareas del hogar, el 40% de las pacientes femeninas realizaban trabajos que implicaban caminar llevando cosas. El 80% de las pacientes femeninas se consideraban a sí mismas moderadamente o bastante activas.

**Consumo de agua:** Seis de las 10 pacientes femeninas (60%) consumían agua en botella de plástico 6 veces o más al día. Siete de las 10 pacientes femeninas (70%) no consumían agua del grifo nunca o una vez al mes.

**Bebidas con cafeína e infusiones:** Cinco de las 10 pacientes femeninas (50%) no consumían refrescos con cafeína nunca o lo hacía una vez al mes. Cuatro de las 10 pacientes femeninas (40%) consumían café una o varias veces al día. Seis de las 10 pacientes femeninas (60%) no consumían infusiones nunca o lo hacía una vez al mes.

**Consumo de alcohol:** Cinco de las 10 pacientes femeninas (50%) consumían alcohol una o varias veces al mes. Nueve de las 10 pacientes femeninas (90%) no consumía destilados nunca o lo hacía una vez al mes.

**Consumo de enlatados:** Se observó que 7 de las 10 pacientes femeninas (70%) no consumían refrescos enlatados nunca o lo hacía rara vez al mes. Siete de las 10 (70%) no consumían cerveza enlatada con/sin alcohol nunca o alguna vez al mes. Siete de las 10 pacientes femeninas (70%) consumían atún enlatado una o varias veces a la semana. Siete de las 10 pacientes femeninas (70%) no consumían sardina enlatada nunca o lo hacía una vez al mes. Seis de las 10 pacientes femeninas (60%) no consumían verdura enlatada nunca o lo hacía una vez al mes. 5 de las 10 pacientes femeninas (50%) no consumían aceitunas enlatadas nunca o lo hacía una vez al mes. Nueve de las 10 pacientes femeninas (90%) no consumían fruta enlatada nunca o lo hacían una vez al mes.

**Consumo de envasados:** Siete de las 10 pacientes femeninas (70%) no consumían zumos de frutas envasados nunca o lo hacía una vez al mes. Nueve de las 10 pacientes femeninas (90%)

no consumían fruta envasada nunca o lo hacía una vez al mes. Tres de las 10 pacientes femeninas (30%) consumían embutidos envasados de 5 a 6 veces a la semana.

**Consumo de verdura y fruta fresca:** Tres de las 10 pacientes femeninas (30%) consumían fruta fresca 2 ó 3 veces al día. Cuatro de las 10 pacientes femeninas (40%) no consumían zumo natural nunca o lo hacía una vez al mes, 3 de las 10 pacientes femeninas (30%) consumían verdura fresca de 2 a 4 veces a la semana.

**Consumo de pescado y marisco:** Seis de las 10 pacientes femeninas (60%) consumían pescado blanco una vez a la semana. Cuatro de las 10 pacientes femeninas (40%) consumían pescado azul una vez a la semana. Cinco de las 10 pacientes femeninas (50%) no consumían marisco nunca o lo hacía una vez al mes.

**Consumo de carne y vísceras:** Cinco de las 10 pacientes femeninas (50%) consumían carne de 2 a 4 veces a la semana. Ocho de las 10 pacientes femeninas (80%). Ninguna consumía vísceras nunca o lo hacía una vez al mes.

**Consumo de leche y yogur:** Seis de las 10 pacientes femeninas (60%) consumían leche una vez al día. Cuatro de las 10 pacientes femeninas (40%) consumían yogur una o varias veces a la semana.

**Consumo de chocolate y patatas fritas:** Cuatro de las 10 pacientes femeninas (40%) no consumían patatas fritas nunca o lo hacían una vez al mes. Cinco de las 10 pacientes femeninas (50%) consumían chocolate una o varias veces a la semana.

**Consumo de soja:** Ninguno de las pacientes consumía nunca harina de soja, yogur de soja, soja en bruto, natto, tempeh, miso o tofu. Nueve de las 10 pacientes (90 %) no consumía nunca leche de soja, soja germinada o salsa de soja. Dos de las pacientes eran vegetarianas parcial.

**Higiene personal:** Siete de las 10 pacientes femeninas (70%) usaban diariamente crema hidratante, 7 (70%) usaban diariamente leche corporal y 4 (60%) usaban diariamente fotoprotector solar. Tres de las 10 pacientes femeninas (30%) usaban diariamente maquillaje. Tres de las 10 pacientes femeninas (30%) usaban diariamente desmaquillante. Tres de las 10 pacientes femeninas (30%) usaban esmalte de uñas de 1 a 3 veces al mes.

**Tabaquismo:** De las 10 pacientes femeninas 6 (60%) no habían fumado nunca, 3 (30%) eran exfumadoras y una (10%) era fumadora.

**Contacto con plásticos:** Nueve de las 10 pacientes femeninas (90%) declararon almacenar alimentos en recipientes de plástico. Ocho de 10 (80%) no calentaban alimentos en recipiente de plástico. Seis de las pacientes femeninas (60%) no reutilizaba nunca las botellas de plástico de agua.

**Consumo de fármacos:** 8 de 10 pacientes femeninas (80%) no consumían fármacos rutinariamente. Ninguno de las pacientes femeninas seguía ningún tratamiento para una enfermedad crónica. Una de las pacientes seguía algún tipo de terapia alternativa. Ocho de las 10 pacientes femeninas (80 %) tenían empastes y solo una de las 10 (10%) era usuaria de lentillas.

## DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS CUESTIONARIOS DE LOS PACIENTES MASCULINOS

**Actividad física:** Los pacientes masculinos dormían una media  $7,4 \pm 1,0$  horas al día, 4 de los 10 pacientes masculinos (40%) caminaban de hora a hora y media o más al día, 5 (50%) no hacían bicicleta casi nunca, 4 (40%) practicaban deporte más de 5 horas a la semana, 7 de los pacientes masculinos (70%) dedicaban menos de una hora al día a las tareas del hogar, el 50% de los pacientes masculinos realizaban trabajos que implicaban caminar llevando cosas. El 60% se consideraban a sí mismos moderadamente o bastante activos.

**Consumo de agua:** Ocho de los 10 pacientes masculinos (80%) consumían agua en botella de plástico una vez al día o más. Ocho de los 10 pacientes masculinos (80%) no consumían agua del grifo nunca o una vez al mes.

**Bebidas con cafeína e infusiones:** Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) consumían refrescos con cafeína una o varias veces a la semana. Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) no consumían café nunca o una vez al mes. Ocho de los 10 pacientes masculinos (80%) no consumían infusiones nunca o una vez al mes.

**Consumo de alcohol:** Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) consumían alcohol una o varias veces al mes y 5 (50%) consumían alcohol una o varias veces a la semana. Seis de los 10 pacientes masculinos (60%) no consumía destilados nunca o una vez al mes.

**Consumo de enlatados:** Se observó que 5 de los 10 pacientes masculinos (50%) consumían refrescos enlatados rara vez al mes y 3 (30%) una vez a la semana. Siete de los 10 (70%) no consumían cerveza enlatada con/sin alcohol nunca o alguna vez al mes. Cuatro de los 10 pacientes masculinos (40%) consumían atún enlatado una vez a la semana. Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) no consumían sardina enlatada nunca o una vez al mes. Siete de los 10 pacientes masculinos (70%) no consumían verdura enlatada nunca o una vez al mes. Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) no consumían aceitunas enlatadas nunca o una vez al mes. Nueve de los 10 pacientes masculinos (90%) no consumían fruta enlatada nunca o lo hacían una vez al mes.

**Consumo de envasados:** Cuatro de los 10 pacientes masculinos (40%) no consumían zumos de frutas envasados nunca o una vez al mes. Nueve de los 10 pacientes masculinos (90%) no consumían fruta envasada nunca o una vez al mes. Cuatro de los 10 pacientes masculinos (40%) consumían embutidos envasados de 2-4 veces a la semana.

**Consumo de verdura y fruta fresca:** Seis de los 10 pacientes masculinos (60%) consumían fruta fresca una vez al día o más, 3 de los 10 pacientes masculinos (30%) no consumían zumo natural nunca o una vez al mes, y 3 (30%) de 1 a 3 veces al mes, 5 de los 10 pacientes masculinos (50%) consumían verdura fresca de 2-4 veces a la semana.

**Consumo de pescado y marisco:** Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) consumían pescado blanco una vez a la semana. Seis de los 10 pacientes masculinos (60%) consumían pescado azul una vez a la semana o más. Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) no consumían marisco nunca o una vez al mes.

**Consumo de carne y vísceras:** Seis de los 10 pacientes masculinos (60%) consumían carne de 2-4 veces a la semana. Ocho de los 10 pacientes masculinos (80%) no consumían vísceras nunca o una vez al mes.

**Consumo de leche y yogur:** Cuatro de los 10 pacientes masculinos (40%) consumían leche una vez al día o más al día y 4 (40%) no consumían leche nunca o una vez al mes. Tres de los 10 pacientes masculinos (30%) no consumían yogur nunca o una vez al mes, y 3 de los 10 pacientes masculinos (30%) consumían yogur una vez al día o más.

**Consumo de chocolate y patatas fritas:** Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) consumían patatas fritas de 2-4 veces a la semana. Cinco de los 10 pacientes masculinos (50%) no consumían chocolate nunca o varias veces al mes.

**Consumo de soja:** Ninguno de los pacientes consumía nunca yogur de soja, natto, tempeh, ni leche de soja. Nueve de los 10 pacientes (90%) no consumía nunca harina de soja, soja en bruto, soja germinada, miso, ni tofu. El 80% de los pacientes no consumía nunca salsa de soja. Ninguno de los pacientes era vegetariano.

**Higiene personal:** Seis de los 10 pacientes masculinos (60%) no usaban nunca crema hidratante, 7 (70%) no usaban nunca leche corporal y 6 (60%) no usaban nunca fotoprotector solar (FPS).

**Tabaquismo:** De los 10 pacientes masculinos 5 (50%) no habían fumado nunca, 2 (20%) eran exfumadores y 2 (20%) eran fumadores.

**Contacto con plásticos:** Nueve de los 10 pacientes masculinos (90%) declararon almacenar alimentos en recipientes de plástico, 8 de 10 (80%) no calentaban alimentos en recipiente de

plástico. Siete de los pacientes masculinos (70 %) no reutilizaba nunca las botellas de plástico de agua.

**Consumo de fármacos:** 7 de 10 pacientes masculinos (70%) no consumían fármacos rutinariamente, uno seguía tratamiento crónico para hipercolesterolemia. Ninguno seguía terapias alternativas. Seis (60%) tenían empastes y solo 2 de los 10 (20%) eran usuarios de lentillas.

This musical score is for a piano piece in G major, 3/4 time. The score is written for two staves, treble and bass clef. The key signature has one sharp (F#) and the time signature is 3/4. The piece begins with a complex texture of chords and arpeggios. The right hand features a series of chords, some with grace notes, and a melodic line. The left hand features a series of chords, some with grace notes, and a melodic line. The score includes dynamic markings such as *sf* (sforzando) and *ff* (fortissimo). The piece concludes with a final chord and a fermata.

♩

*sf* *ff* *ff*

♩

