



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Determinantes Asociados a la Variabilidad de la  
Calidad Seminal: Un Estudio de Seguimiento.**

**Dña. Consuelo Pérez Palazón**  
2018



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Determinantes Asociados a la Variabilidad de la  
Calidad Seminal: Un Estudio de Seguimiento.

Dña. Consuelo Pérez Palazón

### Directores

Dr. Jaime Mendiola Olivares  
Dr. Alberto Manuel Torres Cantero

A mi madre y a mi hermana Puri

## AGRADECIMIENTOS

Es gratificante para mí haber conseguido realizar esta tesis doctoral. Un recorrido de casi 7 años, de trabajo y aprendizaje que han concurrido hoy, en esta tesis y en una enorme satisfacción personal.

He tenido el gusto de realizarla con un equipo formidable del departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y hacia ellos quiero comenzar mis palabras de agradecimiento.

A mis directores de tesis, Alberto Torres, Jaime Mendiola y a todo su equipo:

A Alberto, le agradezco que me brindara la oportunidad de participar en esta investigación y su confianza en este trabajo y por supuesto, la amabilidad y cercanía con la que me ha tratado durante este tiempo.

A Jaime, le tengo que agradecer mucho, más bien casi todo. Comenzando por ser la primera persona que confiara en mí para iniciar mi andadura en la reproducción humana. Después por su ayuda, apoyo y comprensión durante mi formación como embrióloga. Y por último, por implicarse al máximo en el desarrollo de esta tesis. Una creía poder estar preparada para realizar un trabajo de investigación, pero la investigación difiere bastante del trabajo diario en la clínica, y no he podido tener mejor maestro. Jaime, me ha transmitido durante este tiempo, la importancia de la rigurosidad, su meticulosidad y su entusiasmo por obtener respuestas. Le agradezco todo, y sobre todo lo admiro, como persona desde que lo conocí y como profesional e investigador con quien me enorgullece haber realizado mi tesis.

A José Juan, por despertar mi interés en la estadística, por explicar tan bien y por implicarse más del 100% en esta investigación, por su optimismo y su buen humor en cada reunión.

A Ana Cutillas y a Ana Belén Maldonado y a todos los que han participado para que este trabajo saliera adelante. A todos, les agradezco su tiempo. ¡Gracias!

A mi querida clínica Mater Reproducción Asistida:

A Damián Román y a M<sup>a</sup> Ángeles Coca, mis jefes a los que puedo llamar jefazos, por brindarme la oportunidad de iniciar esta tesis en su clínica y por valorarme profesional y personalmente, y sobre todo por el trato y cariño que me dan todos los días.

A mi compañera Tere por su carácter servicial, por enseñarme como el buen profesional y el trabajo empiezan siempre desde las ganas y el entusiasmo, por hacerme grande cada día.

A mi compañera Marina por escucharme y animarme en los momentos de agobio, por su responsabilidad, por su humildad y por recordarme la valentía.

Y a Cristina, por su importante labor de trabajo, por mostrar interés en esta investigación y por llevar el nombre de nuestra clínica a donde aún no había llegado.

A mis siempre compañeras y amigas:

A Mariló, porque los regalos son de agradecer, y ella ha sido mi regalo en esta profesión.

A Manoli Roca, por su confianza en mí, y por darme cabida en el mundo de la fertilidad.

Tanto implica una tesis doctoral, el trabajo y la vida personal, que debo continuar agradeciendo haber llegado hasta aquí.

A mis amigas, a todas porque en algún momento me han animado durante estos años, y en especial a Ángela, porque durante nuestras caminatas en el embarazo nunca hablábamos de partos, carritos de bebé, etc., sino de esta tesis, y porque siempre ha estado, y porque siempre está a mi lado en todo lo que hago.

A mis madres, a la primera, por darme la vida y por ser una estrella, y a la segunda por darme una vida sin ausencias, por protegerme, y por hacer de madre y por haberlo hecho tan bien.

A mi padre, por darme su prudencia, su temple y por demostrar siempre que la familia es lo primero, por mostrarnos el valor material y por enseñarnos a guiarnos del valor sentimental, en definitiva por su saber vivir.

A mi hermano, por cuidar de mí, por hacerme el camino más fácil y por guiarme como buena estudiante y como buena persona y sobre todo, gracias por estar y seguir siempre ahí. A su alma gemela, mi cuñada Consue, la cual sin saberlo, me hizo ver que hay que tener siempre un objetivo, y trabajar, trabajar y trabajar para conseguirlo. A sus hijos, Paquito, Enrique y Antonio, tres deseos cumplidos.

A Amador, por su apoyo para realizar este trabajo, por su comprensión y por trabajar al unísono haciendo suyos todos mis intereses y deseos, y por alcanzar siempre las metas juntos.

Y a mis hijas Teresa y Alba, por haberme permitido dedicar tiempo a esta tesis, y por su amor.

## ÍNDICE

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN.....                                                         | 5  |
| 1.2. SUMMARY.....                                                       | 7  |
| 2. INTRODUCCIÓN GENERAL .....                                           | 9  |
| 2.1. Fisiología reproductiva del varón adulto .....                     | 10 |
| 2.1.1. Estructura del espermatozoide.....                               | 10 |
| 2.1.2. Espermatogénesis.....                                            | 11 |
| 2.1.3. Transporte espermático: del testículo a la uretra.....           | 12 |
| 2.1.4. Secreciones de los órganos sexuales accesorios.....              | 13 |
| 2.2. Parámetros de calidad seminal .....                                | 14 |
| 2.2.1. Volumen.....                                                     | 14 |
| 2.2.2. Recuento.....                                                    | 15 |
| 2.2.3. Movilidad.....                                                   | 15 |
| 2.2.4. Morfología.....                                                  | 16 |
| 2.2.5. Fragmentación del ADN espermático.....                           | 17 |
| 2.3. Variabilidad de la calidad seminal .....                           | 17 |
| 2.3.1. Variabilidad en el volumen de eyaculado .....                    | 18 |
| 2.3.2. Variabilidad en el recuento y la concentración espermática ..... | 18 |
| 2.3.3. Variabilidad en la movilidad espermática .....                   | 19 |
| 2.3.4. Variabilidad en la morfología espermática.....                   | 19 |
| 2.3.5. Variabilidad en la fragmentación del ADN espermático .....       | 19 |
| 2.4. Factores relacionados con la calidad seminal .....                 | 20 |

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.1. Estacionalidad.....                                                                                    | 20 |
| 2.4.2. Periodo de abstinencia sexual.....                                                                     | 21 |
| 2.4.3. Actividad física y el sedentarismo.....                                                                | 22 |
| 2.4.4. Dieta.....                                                                                             | 22 |
| 2.4.5. Antioxidantes.....                                                                                     | 23 |
| 2.4.6. Consumo de tabaco y alcohol.....                                                                       | 24 |
| 2.4.7. Consumo de otras drogas.....                                                                           | 25 |
| 2.4.8. Consumo de café.....                                                                                   | 25 |
| 2.4.9. Medicamentos.....                                                                                      | 26 |
| 2.4.10. Estrés psicológico.....                                                                               | 27 |
| 2.4.11. Exposición a tóxicos y contaminantes ambientales.....                                                 | 27 |
| 2.4.12 Distancia anogenital (AGD).....                                                                        | 29 |
| 2.5. Referencias bibliográficas .....                                                                         | 29 |
| 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....                                                                                | 45 |
| 3.1. Objetivos generales y específicos.....                                                                   | 45 |
| 3.2. Hipótesis.....                                                                                           | 45 |
| 4. CAPITULO 1. Factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal: un estudio de<br>seguimiento ..... | 47 |
| 4.1. Introducción.....                                                                                        | 47 |
| 4.2. Material y método.....                                                                                   | 48 |
| 4.2.1. Población de estudio y cuestionarios.....                                                              | 48 |
| 4.2.2. Análisis seminal y exploración.....                                                                    | 49 |
| 4.2.3. Análisis estadístico.....                                                                              | 50 |

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. Resultados.....                                                                                                                                                            | 51 |
| 4.4. Discusión.....                                                                                                                                                             | 58 |
| 4.5. Conclusión.....                                                                                                                                                            | 62 |
| 4.6. Bibliografía.....                                                                                                                                                          | 63 |
| 5. CAPITULO 2. Determinantes asociados a la variabilidad del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en varones sanos: un estudio de seguimiento..... | 67 |
| 5.1. Introducción.....                                                                                                                                                          | 67 |
| 5.2. Material y método.....                                                                                                                                                     | 68 |
| 5.2.1. Población de estudio.....                                                                                                                                                | 68 |
| 5.2.2. Análisis de fragmentación del ADN espermático y exploración física.....                                                                                                  | 69 |
| 5.2.3. Análisis estadístico.....                                                                                                                                                | 70 |
| 5.3. Resultados.....                                                                                                                                                            | 72 |
| 5.4. Discusión.....                                                                                                                                                             | 74 |
| 5.5. Conclusión.....                                                                                                                                                            | 76 |
| 5.6. Bibliografía.....                                                                                                                                                          | 76 |
| 6. CAPITULO 3. Relación entre la distancia anogenital y la variabilidad de la calidad seminal .....                                                                             | 82 |
| 6.1. Introducción.....                                                                                                                                                          | 82 |
| 6.2. Material y método.....                                                                                                                                                     | 83 |
| 6.2.1. Población de estudio.....                                                                                                                                                | 83 |
| 6.2.2. Análisis seminal.....                                                                                                                                                    | 83 |
| 6.2.3. Análisis de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN).....                                                                                                       | 84 |
| 6.2.4. Exploración física.....                                                                                                                                                  | 85 |
| 6.2.5. Análisis estadístico.....                                                                                                                                                | 86 |

|                                                |     |
|------------------------------------------------|-----|
| 6.3. Resultados y Discusión.....               | 88  |
| 6.4. Conclusión.....                           | 97  |
| 6.5. Bibliografía.....                         | 97  |
| 7. CONCLUSIONES.....                           | 102 |
| 8. ANEXOS.....                                 | 104 |
| 8.1. Información sobre las publicaciones ..... | 104 |
| 8.2 Copia de los trabajos publicados .....     | 107 |

## 1. RESUMEN

### 1.1. Resumen

**INTRODUCCIÓN:** Múltiples factores podrían ejercer un impacto potencial sobre la calidad seminal humana, y de hecho los determinantes de la variabilidad de la calidad seminal son aún ampliamente desconocidos. Los hábitos de vida (sexuales, dieta, ejercicio físico, estrés, tabaco, alcohol, cafeína, etc.) y un marcador de exposición prenatal a andrógenos [distancia anogenital, (AGD)] podrían ser factores importantes y que podrían estar involucrados en esta cuestión. Por tanto, el objetivo general de este trabajo fue describir y analizar los factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal humana.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Se llevó a cabo un estudio prospectivo y de seguimiento realizando medidas repetidas de análisis de calidad seminal en 19 varones voluntarios sanos durante un año. La obtención de las muestras seminales fue aproximadamente cada 4-6 semanas. Siguiendo las directrices de la OMS, se evaluaron el volumen, concentración, recuento total, movilidad y morfología espermática y la fragmentación del ADN espermático. Se tomaron dos tipos de mediciones de AGD, desde el ano hasta la base posterior del escroto ( $AGD_{AS}$ ) y hasta la inserción cefálica del pene ( $AGD_{AP}$ ) en cada individuo. Los sujetos cumplimentaron encuestas epidemiológicas sobre hábitos de vida y exposiciones ambientales en cada una de las entrevistas. Se calculó el porcentaje de coeficiente de variación (CV) intraindividual (%CVi) y el CV interindividual (%CVe) para los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático, y se examinaron sus diferencias estadísticas con respecto a sus respuestas a los factores estudiados. La asociación entre la AGD y los parámetros seminales se estudió utilizando tres herramientas estadísticas: a) coeficiente de variación general (CV) y coeficiente de variación intraindividual (CVi); b) modelos lineales generales para medidas repetidas; y c) modelos mixtos de efectos fijos.

**RESULTADOS:** La mayor variabilidad intraindividual se observó en el recuento total y la concentración espermática (CVi=74,5% y 65,6% respectivamente), seguidos

de la morfología (CVi=41,2%) y el volumen de eyaculado (CVi=30,1%) y por último en la movilidad (CVi=14,6%). Un patrón similar se observó para la variabilidad interindividual aunque los CVe fueron muy superiores a los CVi. Se obtuvieron resultados comparables al considerar los hábitos de vida. En general, los CVi y los CVe fueron más bajos en sujetos que practicaban habitualmente ejercicio ligero o moderado, o en consumidores no habituales de vino, cerveza o café.

El CVi y CVe para el porcentaje de fragmentación espermática fueron 47,2% y 262,9% respectivamente. Los CV fueron significativamente distintos para todas las variables estudiadas, a excepción de la exposición a tóxicos ambientales (similar CV) y el ejercicio físico ligero (similar CVi). Dicho índice también se relacionó positivamente con el número de horas empleadas en actividades sedentarias (p-valor = 0,05).

Las mediciones de AGD se asociaron con la variabilidad de los parámetros seminales. Los varones con una AGD<sub>AP</sub> acortada presentaron una mayor variabilidad intraindividual en la concentración, recuento total y la morfología espermática. Sin embargo, se observó una mayor variabilidad en la movilidad espermática total (progresiva y no progresiva) en varones con una AGD<sub>AS</sub> alargada. Además, una AGD<sub>AS</sub> acortada se asoció con una variabilidad intraindividual menor en la movilidad espermática total.

**CONCLUSIONES:** Nuestros resultados sugieren que un único análisis seminal podría considerarse más fiable o consistente si se practica habitualmente ejercicio ligero o moderado, o no está presente un consumo habitual de vino, cerveza o café. No obstante, la práctica de ejercicio intenso o moderado/intenso, la exposición a tóxicos o el estrés psicológico, son factores que podrían predecir una medida más constante de la fragmentación del ADN espermático. La AGD podría ser útil para determinar la variabilidad intraindividual en los parámetros seminales.

## 1.2. Summary

**INTRODUCTION:** Multiple factors could have a potential impact on human seminal quality, and in fact, the determinants of seminal quality variability are still unknown. It is necessary to explore characteristics and lifestyles that could interfere in the variability of the seminal parameters and shed more light on the matter. Lifestyles (sexual, diet, physical exercise, stress, tobacco, alcohol, caffeine, drugs and medicines) and a marker of prenatal androgen exposure, the anogenital distance (AGD), could be important factors related to such variability.

**MATERIAL AND METHOD:** A prospective and follow-up study was carried out, performing repeated measures of seminal quality in 19 healthy male volunteers over one year period. Seminal samples were collected every 4-6 weeks approximately. Following WHO guidelines, the semen volume, sperm concentration, total count, motility, morphology and sperm DNA fragmentation were evaluated. Two types of AGD measurements were taken from the anus to the posterior base of the scrotum ( $AGD_{AS}$ ) and to the cephalic insertion of the penis ( $AGD_{AP}$ ) in each individual. The subjects completed epidemiological surveys on lifestyle in each of the interviews. The percentage of intraindividual coefficient of variation (CV) (% CVi) and interindividual CV (% CVe) for seminal parameters and sperm DNA fragmentation were calculated, and their statistical differences with respect to their responses to the factors studied were examined. The association between the AGD and the seminal parameters was analyzed using three statistical tools: a) coefficient of general variation (CV) and intraindividual variation coefficient (CVi), b) general linear models for repeated measures, and c) mixed model fixed effects panel data.

**RESULTS:** The highest intraindividual variability was observed in the total sperm count and concentration (CVi = 74.5% and 65.6% respectively), followed by morphology (CVi = 41.2%), semen volume (CVi) = 30.1%) and motility (CVi = 14.6%). A similar pattern was observed for interindividual variability, although CVe were much higher than CVi. Comparable results were obtained when considering lifestyles. In general, CVi and CVe were lower in subjects who regularly practiced light or moderate exercise, or nonregular consumers of wine, beer or coffee.

The CVi and CVe for the percentage of sperm fragmentation were 47.2% and 262.9% respectively. CVs were significantly different for all the variables studied, but exposure to environmental toxins (similar CV) and light physical exercise (similar CVi). This index was also positively related to the number of hours spent in sedentary activities (p-value = 0.05).

AGD measurements were associated with the variability of the semen parameters. Men with shortened AGD<sub>AP</sub> showed greater intraindividual variability in sperm concentration, total count and morphology. However, a longer AGD<sub>AS</sub> was related to higher variability for total sperm motility (progressive and non-progressive). Moreover, shortened AGD<sub>AS</sub> was associated with a lower intraindividual variability of total sperm motility.

**CONCLUSIONS:** Our results suggest that a single seminal analysis could be considered more reliable or consistent if light or moderate exercise is usually performed, or regular consumption of wine, beer or coffee is not in place. However, the practice of intense or moderate/intense exercise, exposure to toxic compounds or psychological stress, are factors that may predict a more constant measure of sperm DNA fragmentation. AGD could be useful to determine the intraindividual variability in seminal parameters.

## 2. INTRODUCCIÓN GENERAL

Estudios recientes informan de un importante declive en la concentración espermática en la población humana durante las últimas décadas<sup>1</sup>. Se estima que más de un 15% de parejas en edad reproductiva encuentran dificultad para tener descendencia. Aproximadamente el 30% de estos casos se debe a un factor masculino, principalmente a una calidad seminal disminuida<sup>2</sup>. El diagnóstico de la calidad seminal se determina en el laboratorio de andrología tras el análisis de 1 ó 2 muestras de semen, sin embargo, los resultados pueden presentar una considerable variabilidad. La variabilidad observada en los parámetros seminales se atribuye al error analítico y a la variabilidad biológica<sup>3</sup>. En la actualidad, el “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen” en su quinta edición estandariza el procedimiento de análisis del semen humano<sup>4</sup>, con el fin de minimizar el error entre profesionales y/o entre distintos laboratorios.

Respecto a la variabilidad biológica, la cual nos ocupa en adelante, numerosos estudios han mostrado que los parámetros seminales presentan una significativa variabilidad, lo cual puede influir en el diagnóstico del potencial fértil del varón<sup>2</sup>. No obstante, son escasos los estudios sobre las causas de esta variabilidad biológica, y estos trabajos muestran que determinados factores, tales como los hábitos sexuales (abstinencia sexual y frecuencia de eyaculación), o la estación del año, podrían estar relacionados con dicha variabilidad. Hasta ahora, no se ha explorado la relación de otros factores externos como la práctica de actividad física, el consumo de drogas (alcohol, tabaco, y otras), el consumo de café, el hábito dietético, la ingesta de antioxidantes, el estrés psicológico o la exposición a tóxicos ambientales como determinantes de la variabilidad seminal.

La distancia anogenital (AGD), distancia entre el ano y los genitales, es un dimorfismo sexual en mamíferos placentarios y es alrededor del doble en machos que en hembras<sup>5</sup>. Esta distancia se ha asociado recientemente con alteraciones reproductivas e infertilidad masculina<sup>6</sup>. Diversos estudios han relacionado una AGD acortada con la presencia de patologías o anomalías reproductivas en humanos<sup>7-11</sup>, como criptorquidia<sup>7</sup>, hipospadias<sup>10-11</sup> bajo nivel de testosterona sérica<sup>8</sup>, disminución en el tamaño testicular<sup>8</sup>, disminución en la longitud del pene<sup>8,10</sup> o peor calidad

seminal<sup>6-9</sup>.

La producción de espermatozoides en el testículo es un proceso complejo que requiere una completa sucesión de fenómenos celulares y hormonales que se inician tempranamente en las primeras semanas del desarrollo fetal<sup>12</sup>. Diversos estudios en animales<sup>13</sup> y humanos<sup>7,8,14</sup> han mostrado que la AGD es un marcador fiable de la acción de andrógenos durante la formación del sistema reproductivo masculino. Por tanto, podría ser usada como un biomarcador útil del desarrollo y función gonadal normal, incluyendo calidad seminal, en el varón adulto<sup>6-15</sup>.

A continuación, realizamos un repaso acerca de la fisiología reproductiva del varón asociada a la calidad seminal, la variabilidad biológica de la calidad seminal y los determinantes relacionados, incluyendo la AGD.

## **2.1. Fisiología reproductiva del varón adulto**

### **2.1.1. Estructura del espermatozoide**

El espermatozoide maduro normal está constituido por una cabeza con forma de espátula y un flagelo con una pequeña pieza conectora entre ambos. La cabeza está subdividida en región acrosómica y región postacrosómica<sup>2</sup>. El flagelo le otorga al espermatozoide la característica de célula móvil. Su movilidad depende de las estructuras de axonema (dobletes de microtúbulos, brazos de dineína, y radios), del aporte energético para mover estas estructuras (mitocondrias y fibras densas externas), y de la inserción de la cola a través de un centriolo y una vaina fibrosa<sup>16</sup>. El espermatozoide es una célula genéticamente única, que actúa como célula mensajera. La información que porta es el ácido desoxirribonucleico (ADN), estructura cristalina estabilizada con zinc, y por tanto molecularmente densa, que le protege y compensa de una falta de sistema de reparación de dicho ADN.

Este empaquetamiento denso se debe a que durante la espermiogénesis, las histonas del ADN son reemplazadas temporalmente por proteínas, y después por protaminas. Simultáneamente, el zinc se incorpora al interior del núcleo<sup>16</sup>. De esta

manera, la cromatina espermática queda formada por dos hebras de ADN entremezcladas con una hebra de protaminas<sup>16</sup>.

### **2.1.2. Espermatogénesis**

La producción de espermatozoides comienza cuando el individuo alcanza la pubertad, mediante el proceso conocido como espermatogénesis<sup>16</sup>.

Durante el desarrollo embrionario, las células germinales inmaduras migran desde el epiblasto del saco de yolk hasta los cordones seminíferos, en ambos testículos, y comienzan a proliferar y formar espermatogonias hasta la semana 18 en el feto. El resto de células de los cordones seminíferos se multiplican también, y originan las células de Sertoli.

La espermatogénesis comprende varias etapas<sup>16</sup>.

En una primera etapa las espermatogonias conocidas como de tipo A oscuras renuevan la población de espermatogonias mediante continuas mitosis, y a partir de las espermatogonias conocidas como de tipo A claras, se generan espermatogonias de tipo B, de manera que cada espermatogonia tipo A clara tras sufrir 2 divisiones mitóticas, forman 4 espermatogonias tipo B.

En una segunda etapa, conocida como espermatocitogénesis, estas 4 espermatogonias tipo B se diferencian a 4 espermatocitos primarios. En este punto han transcurrido 27 días.

La tercera etapa sucede cuando cada espermatocito primario sufre dos divisiones meióticas, la primera meiosis genera 8 espermatocitos secundarios y la segunda da lugar a 16 espermátidas redondas, lo cual dura 24 días más, por lo que hasta este momento, han transcurrido 51 días del proceso. Estas 16 espermátidas redondas se diferencian a espermátidas alargadas, mediante el proceso llamado espermiogénesis o diferenciación.

Durante esta cuarta etapa cada espermátida inmadura posee un núcleo redondo. La vesícula del acrosoma está unida al núcleo y la cola aún no contacta con el núcleo. Posteriormente, la vesícula del acrosoma aumenta de tamaño y comienza

a envolver al núcleo y la cola establece contacto con el núcleo. Se va formando el acrosoma, y se produce la condensación del epitelio germinal.

Por último, a través de la quinta etapa, la espermiación, se liberan al lumen de los túbulos seminíferos 16 espermatozoides (dejando el cuerpo residual, restos de citoplasma y membrana desde la pieza media del espermatozoide). Las etapas cuarta y quinta duran 23 días, por tanto, desde la espermacitogénesis hasta la formación de espermatozoides transcurren 74 días en total<sup>16</sup>.

El proceso de la espermatogénesis requiere control hormonal. Los datos muestran que la hormona folículo-estimulante (FSH) regula predominantemente el desarrollo espermatogénico, mientras que la testosterona regula la última fase de la espermiogénesis, además, tanto la FSH como la testosterona parecen ser igualmente importantes en el apoyo al desarrollo del espermatozocito<sup>17</sup>.

Las hormonas también controlan la apoptosis de las células germinales masculinas con errores en su ADN durante la división celular. La apoptosis puede ser inducida por estímulos específicos, como privación de hormonas, exposición a radiación ionizante, diversos fármacos quimioterápicos, lesión y estrés celular. Durante las divisiones mitóticas y meióticas de la espermatogénesis se mantiene la estabilidad genética a través de mecanismos de duplicación, reparación y segregación del ADN regulados en el ciclo celular mediante un control genético<sup>17</sup>.

### **2.1.3. Transporte espermático: del testículo a la uretra**

Los espermatozoides son transportados desde los túbulos seminíferos a través de la red de testis y de los conductos eferentes hasta el epidídimo. El epidídimo está dividido anatómicamente en cabeza, cuerpo y cola, y fisiológicamente en segmento inicial, medio y terminal<sup>16</sup>. El tránsito de los espermatozoides por el epidídimo dura desde 2 días, en hombres con una producción de espermatozoides > 200 millones por día, hasta 6 días en hombres con una producción espermática de 70 millones por día aproximadamente<sup>16</sup>. La frecuencia de eyaculación hace que disminuya el número de espermatozoides almacenados, mientras que la abstinencia sexual lo incrementa.

El transporte espermático continúa a través del conducto deferente y las vesículas seminales. Los conductos deferentes se palpan como “cordones” de 3-5 mm de grosor en ambos lados del escroto. Antes de llegar a la próstata, los conductos deferentes tienen una dilatación, denominada ampolla, desde la que se desarrollan las vesículas seminales. Tanto la ampolla como las vesículas seminales desembocan en el conducto eyaculatorio, el cual desemboca a su vez en la uretra<sup>16</sup>. En la última fase se produce la emisión de la mezcla de los espermatozoides con las secreciones glandulares a través de la uretra al exterior.

#### **2.1.4. Secreciones de los órganos sexuales accesorios**

Durante la eyaculación los espermatozoides se diluyen en las secreciones de los órganos sexuales accesorios. La composición del fluido seminal también es importante para la función de los espermatozoides<sup>4</sup>.

El proceso de conservación de los espermatozoides conlleva la inactividad del metabolismo y movilidad, y la estabilidad de las membranas y estructuras espermáticas<sup>16</sup>. Durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo, sufren un proceso de maduración por el cual adquieren movilidad progresiva, habilidad para fecundar al ovocito, y mantenimiento del desarrollo embrionario inicial. Al parecer, la maduración ocurre en la cabeza y cuerpo del epidídimo, y es en la región caudal proximal donde se almacenan y se conservan gracias a una menor temperatura (34º C).

Las vesículas seminales y la ampolla poseen un epitelio secretor el cual produce fructosa<sup>16</sup>. El papel fisiológico de las vesículas seminales en humanos no se conoce plenamente. Los espermatozoides humanos del eyaculado o incubados en el fluido de las vesículas seminales muestran disminución de motilidad, vitalidad, contenido de zinc en la cromatina y profundos cambios en la estabilidad cromatínica<sup>16</sup>. Además, las vesículas seminales tienen una concentración de prostaglandinas muy superior a la concentración que hay en sangre, y su papel fisiológico todavía falta por esclarecerse<sup>16</sup>.

Durante la eyaculación, la mezcla de los espermatozoides con el fluido prostático restaura la movilidad y capacita a los espermatozoides para la

fecundación<sup>16</sup>. La próstata está formada por 20-30 glándulas diferentes que se abren al interior de la uretra y aportan al fluido prostático sustancias como: zinc, magnesio, calcio, citrato, fosfatasa ácida, y antígeno específico de la próstata (PSA)<sup>16</sup>.

Las secreciones de todos los órganos sexuales, desde los testículos al cuerpo del epidídimo, dependen de los andrógenos. La mayoría de los andrógenos provienen del fluido transportado desde el testículo (fluido luminal y linfático y plexo venoso local), mientras que el sistema circulatorio aporta andrógenos a la región caudal del epidídimo, los conductos deferentes, las vesículas seminales y la próstata<sup>16</sup>.

## **2.2. Parámetros de calidad seminal**

La condición de un varón fértil es eyacular un fluido seminal de óptima calidad espermática. Para determinar la calidad seminal de un varón los principales parámetros evaluados son: el volumen de eyaculado, la concentración o recuento espermático, la motilidad progresiva y la morfología espermática, y en algunos casos se realiza un análisis de fragmentación del ADN espermático. Diversos autores coinciden en que la evaluación de la integridad del ADN espermático se considera un buen indicador de la calidad seminal y de la capacidad reproductiva masculina, y que complementa el estudio básico del semen<sup>18,19</sup>. Tanto la recogida como el análisis de semen deben realizarse por procedimientos estandarizados para garantizar que los resultados proporcionen una información útil<sup>4</sup>. La quinta edición del manual “WHO Examination and processing of human semen” de la OMS<sup>4</sup> recoge los aspectos mencionados anteriormente y delimita el actual umbral mínimo de los parámetros seminales que define una calidad seminal aceptable.

### **2.2.1. Volumen**

El volumen del eyaculado está formado mayoritariamente por las secreciones de las vesículas seminales y la próstata, y en menor medida por las de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo<sup>4</sup>. El volumen del eyaculado puede medirse pesando la muestra en el recipiente de recogida. La medida del volumen permite calcular el

número total de espermatozoides en el eyaculado, asumiendo la densidad del semen como 1 g/ml<sup>4</sup>.

El límite inferior de referencia de la OMS para el volúmen seminal es 1,5 ml (percentil 5, IC 95%: 1,4–1,7)<sup>4</sup>.

### **2.2.2. Recuento**

El recuento total de espermatozoides en el eyaculado y la concentración están relacionados con el éxito de embarazo<sup>20</sup>.

La concentración de espermatozoides en el semen está influenciada por la secreción de las vesículas seminales y la próstata. El límite inferior de referencia es  $15 \times 10^6$  espermatozoides por ml (percentil 5, IC 95%:  $12-16 \times 10^6$ /ml)<sup>4</sup>.

El número total de espermatozoides en el eyaculado mide la capacidad de producción espermática en los testículos. Se obtiene multiplicando la concentración espermática por el volumen total de eyaculado<sup>4</sup>.

El límite inferior de referencia para el número total de espermatozoides es  $39 \times 10^6$  espermatozoides por eyaculado (percentil 5, IC 95%:  $33-46 \times 10^6$ )<sup>4</sup>.

### **2.2.3. Movilidad**

La movilidad espermática progresiva se asocia también al éxito del embarazo<sup>20</sup>.

La movilidad de cada espermatozoide se clasifica en 3 categorías:

- Movilidad progresiva (PR): espermatozoides con movimiento activo, lineal u ondulatorio de gran amplitud y rapidez.
- Movilidad no progresiva (NP): espermatozoides con movimiento, pero con ausencia de progresión.
- Inmóviles (IM): no se observa ningún movimiento.

El límite inferior de referencia para la movilidad total (PR+NP) es de 40% (percentil 5, IC 95%:38–42). También se considera el límite inferior de referencia para la movilidad progresiva (PR) de 32% (percentil 5, IC 95%: 31–34)<sup>4</sup>.

El número total de espermatozoides móviles progresivos en el eyaculado es también biológicamente significativo. Se obtiene multiplicando el número total de espermatozoides en el eyaculado por el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva<sup>4</sup>.

#### **2.2.4. Morfología**

La morfología del espermatozoide normal con potencial de fecundación se determinó a partir del estudio de espermatozoides del moco cervical femenino<sup>21</sup> y espermatozoides adheridos a la superficie de la zona pelúcida<sup>22</sup>. La morfología espermática también está relacionada con el éxito en la consecución del embarazo<sup>23,24</sup>.

El semen contiene un alto porcentaje de espermatozoides con distintas malformaciones en la cabeza y/o el flagelo. Los defectos más comunes observados en la cabeza son: grande o pequeña, redondeada, amorfa, piriforme, vacuolada (más de dos vacuolas o que ocupen más del >20% del área de la cabeza), vacuolas en la región post-acrosómica, acrosoma grande o pequeño (<40% o >70% del área de la cabeza), cabeza doble o alguna combinación de estas. Los defectos en el flagelo pueden estar localizados en el cuello o en la pieza media (inserción asimétrica en la cabeza o irregular, anormalmente delgada, doblada bruscamente o alguna combinación de estas) o en la pieza principal (corta, múltiple, rota, angulado bruscamente, ancho irregular, enrollada o alguna combinación de éstas)<sup>4</sup>. Además, algunos espermatozoides presentan exceso de citoplasma residual, considerado anormal cuando su tamaño es un tercio o más del tamaño de la cabeza.

El límite inferior de referencia para la morfología normal es 4% (percentil 5, IC 95%: 3,0–4,0)<sup>4</sup>.

### 2.2.5. Fragmentación del ADN espermático

La integridad del ADN espermático es esencial para la capacidad reproductiva del varón<sup>25</sup> y se ha asociado con la infertilidad masculina<sup>26,27</sup>. La fragmentación del ADN espermático puede darse por varios mecanismos: apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; remodelación de la cromatina espermática durante la espermiogénesis; presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el transporte espermático post-testicular; acción de endonucleasas endógenas; tratamiento radio y quimioterápico; o exposición a tóxicos y/o contaminantes ambientales<sup>28</sup>. Hasta el momento, la fragmentación del ADN espermático inducida durante el transporte post-testicular parece la causa más relevante<sup>16</sup>.

El espermatozoide es la única célula del cuerpo que carece de sistema de reparación de ADN. Sin embargo, el ovocito tiene capacidad para reparar el daño del ADN en el espermatozoide. Una reparación defectuosa podría resultar en translocaciones *de novo*, inversiones o deleciones<sup>16</sup>.

El daño del ADN espermático puede ser medido por distintos métodos: el ensayo *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL), la técnica *In Situ Nick Translation* (ISNT), el ensayo del cometa o *single cell gel electrophoresis* (SCGE), *DNA Breakage Detection-Fluorescence in Situ Hybridization* (DBD-FISH), el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) o el test *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD)<sup>2</sup>.

### 2.3. Variabilidad de la calidad seminal

La gran variabilidad en la calidad seminal, incluso en un mismo sujeto, requiere que el análisis de todos los parámetros seminales anteriores sea preciso<sup>29</sup>. Debido a esto, es difícil caracterizar la calidad seminal de un varón evaluando una sola muestra seminal, por lo que se recomienda analizar al menos dos<sup>29,30</sup>.

La bibliografía previa consultada encuentra una considerable variación en los parámetros seminales básicos<sup>31-36</sup> e incluso en el índice de fragmentación del ADN

espermático<sup>37,38</sup>. En estos estudios previos se calcula el porcentaje de coeficiente de variación (CV) intraindividual (%CVi), y en algunos casos también el CV interindividual (%CVe)<sup>30,33</sup>. A continuación, pasamos a revisar el grado de variabilidad para cada uno de los parámetros espermáticos y el índice de fragmentación del ADN espermático:

### **2.3.1. Variabilidad en el volumen de eyaculado**

El volumen de eyaculado refleja la actividad secretora de las glándulas anejas<sup>4</sup>. El CVi obtenido para el volumen de eyaculado concuerda entre los distintos estudios publicados<sup>30,31,33-35</sup>. Schwartz y colaboradores obtuvieron un CVi de 28%<sup>31</sup> en donantes y casi tres décadas más tarde, Keel y colegas obtuvieron CVi similares, de 25,3% y 29,6% en donantes y pacientes respectivamente<sup>30</sup>. Igualmente, Francavilla y colaboradores obtuvieron un CVi de 27,1% en varones sometidos a tratamientos de reproducción asistida<sup>34</sup>. Leushuis y colaboradores presentaron un CVi de 28% en varones de parejas subfértiles<sup>35</sup>. Algunos autores estudiaron la variabilidad interindividual, obteniendo un CVe de 98,6% en pacientes con problemas de infertilidad<sup>30</sup>.

### **2.3.2. Variabilidad en el recuento y la concentración espermática**

El número o recuento total de espermatozoides refleja la producción de esperma en los testículos y la permeabilidad del sistema de conductos post-testicular. La concentración de espermatozoides no es una medida directa de la producción de espermatozoides testiculares, ya que está influenciada por el funcionamiento de otros órganos reproductores<sup>4</sup>. La producción espermática es continua, y el hombre tiene la capacidad de tener varias eyaculaciones en un mismo día. La producción espermática humana diaria es relativamente baja respecto a otros mamíferos ( 100-500 millones por día)<sup>16</sup>.

Varios estudios previos han mostrado que el recuento espermático es el parámetro con mayor variabilidad intra<sup>30-33</sup>, e inter-individual<sup>30,33</sup>. No obstante, los CVi obtenidos por los distintos autores varían en función del grupo de pacientes estudiado. En pacientes infértiles los valores encontrados fueron de CVi=54,2% y CVi=56,8% en los estudios de Keel y colaboradores<sup>30</sup> y Francavilla y colaboradores<sup>34</sup>, respectivamente, y fueron superiores a los CVi encontrados en otros estudios con

varones no infértiles: CVi=39%<sup>31</sup>, CVi=45,8%<sup>30</sup>, CVi=47%<sup>32</sup> y CVi=28%<sup>33</sup> o subfértiles CVi=29%<sup>35</sup>. Los resultados de los CVe para la concentración espermática son aún más dispares, al comparar los CVe de 187,8% y 233,5% obtenidos por Keel y colaboradores en pacientes infértiles y donantes, respectivamente<sup>30</sup> con el CVe de 56,4% hallado por Álvarez y colaboradores en varones sanos<sup>33</sup>.

### **2.3.3. Variabilidad en la movilidad espermática**

La mayoría de los estudios previos indican que la movilidad espermática presenta menor variabilidad que la concentración espermática<sup>30,33,36</sup>, excepto para Leushuis y colaboradores, que encuentran similitud en los CVi en ambos parámetros seminales en varones de parejas subfértiles<sup>35</sup>. En el estudio de Álvarez y colaboradores, el CVi para el porcentaje de espermatozoides móviles totales fue de 20,4% en varones sanos<sup>33</sup> inferior al 26% obtenido en el estudio de Schrader y colaboradores<sup>36</sup> en varones de entre 25-35 años, sin problemas de fertilidad ni exposición conocida a tóxicos. El estudio de Álvarez y colaboradores muestra, además, un CVe de la movilidad espermática del 29,8%<sup>33</sup>.

### **2.3.4. Variabilidad en la morfología espermática**

En cuanto al porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, los estudios previos muestran valores de CVi del 29% en varones de parejas subfértiles<sup>35</sup> y CVi de 20,9% y de CVe del 44% en varones sanos<sup>33</sup>.

### **2.3.5. Variabilidad en la fragmentación del ADN espermático**

La variabilidad de la fragmentación del ADN espermático ha sido muy poco estudiada. Los estudios previos muestran resultados basados únicamente en el análisis de dos muestras seminales, obteniendo un CVi superior al 30%<sup>37,38</sup>. La variabilidad intraindividual existente en el índice de fragmentación del ADN espermático es equiparable a la de los parámetros seminales tradicionales<sup>30,33,34</sup>, lo cual contradice a otros autores que consideran este parámetro menos variable que los parámetros seminales rutinarios en pacientes infértiles<sup>39</sup>. Además, los resultados obtenidos en el estudio de Oleszczuk y colegas en varones infértiles indican que todas las mediciones del mismo sujeto permanecen por encima o por debajo del

umbral del 30% del índice de fragmentación del ADN espermático<sup>38</sup>.

## **2.4. Factores relacionados con la calidad seminal**

Poco se conoce sobre las causas de la variabilidad seminal biológica. Hasta hoy, la mayoría de estudios han ido encaminados a explorar los determinantes que influyen en la disminución o afectación de la calidad seminal. La época del año, los hábitos sexuales (abstinencia sexual y frecuencia de eyaculación), los hábitos de vida (nivel de actividad física, dieta, antioxidantes, consumo de tabaco, alcohol, otras drogas, café, medicamentos, etc), el estrés psicológico, y la exposición a tóxicos y contaminantes ambientales han sido entre otros los factores estudiados. No obstante, únicamente la influencia de la estacionalidad<sup>33,40-44</sup> y el tiempo de abstinencia sexual se han relacionado con la variabilidad de la calidad seminal hasta el momento<sup>33,34,45</sup>.

### **2.4.1. Estacionalidad**

El posible efecto de la estacionalidad sobre la variabilidad de los parámetros seminales continúa siendo un tema controvertido. Algunos autores han mostrado que la variabilidad en la calidad seminal puede estar condicionada por la estación del año<sup>33</sup>. En cuanto al volumen del eyaculado, en el estudio de Reinberg y colaboradores en varones normozoospermicos, observaron la existencia de un pico de variabilidad en los meses de abril y mayo<sup>40</sup>.

Diversos estudios coinciden en que la mayor variabilidad estacional observada es en el recuento espermático, que disminuye en verano tanto en pacientes que consultan por infertilidad<sup>41,42</sup>, como en varones fértiles<sup>43</sup>. Igualmente, la movilidad de los espermatozoides parece disminuir durante los meses de calor en pacientes subfértiles<sup>41,42</sup>. En otro estudio, se vió que la velocidad y linealidad del movimiento de los espermatozoides disminuyó en primavera en donantes de semen<sup>44</sup>. Además, un estudio encontró que los espermatozoides eyaculados morfológicamente normales disminuían también en verano en pacientes de infertilidad<sup>41</sup>. Centola y colaboradores observaron más defectos en la cola de los

espermatozoides en primavera, más espermatozoides “*tapered*” en otoño y más espermatozoides inmaduros en verano en pacientes que consultaban por infertilidad<sup>44</sup>.

Otros estudios no encuentran la estacionalidad como fuente de variabilidad para la calidad seminal<sup>44,46,47</sup>. Dos estudios no encontraron variabilidad en el volumen seminal atribuible a la estacionalidad ni en pacientes de infertilidad ni donantes<sup>44,46</sup>. Otros autores concluyen que no existe variabilidad en la movilidad espermática atribuible a la época del año en varones normozoospermicos<sup>46</sup>. Por último, en el estudio de Jarow y colaboradores, la morfología fue el parámetro menos variable, y su variación no dependió de la estación del año en sujetos normozoospermicos<sup>46</sup>.

#### **2.4.2. Periodo de abstinencia sexual**

La abstinencia sexual hace referencia al tiempo transcurrido desde la última eyaculación. En ausencia de eyaculación, los espermatozoides se acumulan en los epidídimos pudiendo alcanzar la uretra y aparecer en la orina<sup>45</sup>.

El número de espermatozoides en el eyaculado depende de los días de abstinencia y de la actividad sexual. Por ello, se tiene en cuenta no sólo el tiempo entre la eyaculación analizada y la previa, si no también la frecuencia de eyaculaciones que precede al análisis seminal<sup>16</sup>.

El tiempo de abstinencia sexual puede ser un condicionante de la variabilidad en la calidad seminal<sup>33</sup>. Existe consenso sobre la relación positiva entre el tiempo de abstinencia sexual y el volumen de eyaculado tanto en varones infértiles<sup>34</sup> como sanos<sup>45</sup>. Sin embargo, la influencia sobre la movilidad y el recuento espermático está más cuestionada<sup>34,45</sup>. Entre 1 y 7 días de abstinencia sexual no se observan variaciones significativas del porcentaje de espermatozoides móviles en donantes<sup>45</sup>. En otros estudios en varones infértiles, la movilidad disminuyó significativamente si la abstinencia era de 1 día<sup>34</sup>. Respecto a la concentración espermática, se observa variabilidad significativa con abstinencia menor de 2 días o superior a 7 días<sup>45</sup>.

Además, el almacenamiento prolongado de los espermatozoides en el tracto genital masculino podría generar roturas del ADN espermático y alteraciones

cromosómicas en los embriones subsiguientes<sup>16</sup>. Así pues, tanto la abstinencia sexual como la frecuencia de eyaculación podrían influir en el índice de fragmentación del ADN espermático<sup>48,49</sup>.

### **2.4.3. Actividad física y el sedentarismo**

La actividad física se ha relacionado positivamente con la calidad seminal<sup>50-52</sup>. Un estudio realizado en roedores demostró que la realización de ejercicio combinado con dieta disminuía el daño al ADN espermático<sup>53</sup>. Otros autores no encuentran relación entre la actividad física y la calidad seminal, mostrando al menos que no existe una asociación negativa entre ambas características en varones jóvenes<sup>54</sup>.

No obstante, diversos estudios concluyen que un régimen elevado de ejercicio físico podría afectar negativamente al resultado de los parámetros seminales en corredores a pié<sup>55</sup> o en bicicleta<sup>56</sup> y en deportistas de altitud<sup>57</sup>, lo cual podría atribuirse al daño espermático producido por el estrés oxidativo generado durante dicho ejercicio<sup>58</sup>.

En una revisión de Jozkow y colaboradores, sugieren que la actividad física intensa podría afectar negativamente a la concentración espermática, así como el número de espermatozoides móviles y morfológicamente normales. El entrenamiento a intensidades altas y con mayores cargas parece estar asociado con cambios más profundos en la calidad del semen<sup>51</sup>.

En otra revisión reciente de Hayden y colaboradores observaron una tendencia convincente mostrando que el ejercicio de alta intensidad podría afectar a la fertilidad masculina<sup>59</sup>.

### **2.4.4. Ingesta dietaria**

La influencia de la nutrición sobre la función reproductiva masculina es uno de los factores más estudiados. Dietas desequilibradas o la sobrealimentación son frecuentes en nuestro entorno. El tipo de dieta se ha relacionado con la calidad seminal. Estudios recientes en pacientes de clínicas de fertilidad asocian

positivamente patrones dietéticos saludables con mejores parámetros seminales, en cuanto a concentración, recuento, motilidad<sup>60-62</sup> y morfología espermática<sup>62</sup>.

Múltiples estudios sugieren que una mejor calidad seminal estaría asociada con la ingesta de frutas y verduras<sup>63-67</sup>, pescado y/o productos lácteos bajos en grasa<sup>66,67</sup>, carne de pollo y cereales de granos enteros<sup>66,67</sup>, y a un bajo consumo de bebidas y alimentos azucarados en varones de parejas infértiles<sup>68</sup>. Gaskins y colaboradores, encontraron una relación de la dieta rica en frutas, verduras, pescado, pollo y cereales integrales con la movilidad espermática, pero no con el recuento ni la morfología espermática en varones jóvenes americanos<sup>64</sup>.

Además, otros estudios, asocian una peor calidad seminal a la menor ingesta de verduras y hortalizas, y a un exceso de carne procesada en pacientes de clínicas de fertilidad<sup>63,65,66</sup>, y a un alto consumo de lácteos no desnatados en infértiles<sup>66</sup> y en jóvenes<sup>69</sup>, o la ingesta de bebidas azucaradas o dulces en varones jóvenes sanos o infértiles<sup>66</sup>.

Un estudio realizado en jóvenes sanos españoles sugiere que la ingesta de ácidos grasos omega 3, omega 6 y trans, está asociado con el volumen testicular, pudiendo influir en su función<sup>70</sup>. En una revisión reciente, dietas ricas en ácidos grasos omega-3, antioxidantes, vitaminas, y bajas en ácidos grasos saturados y trans se relacionaron con una mejor calidad espermática en varones infértiles<sup>66</sup>.

#### **2.4.5. Antioxidantes**

Las dietas saludables suelen ser ricas en diversos antioxidantes (vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno, selenio, zinc, criptoxantina y licopeno)<sup>66</sup>.

Estudios previos sugieren que una baja ingesta de antioxidantes está asociada con una peor calidad seminal en pacientes de fertilidad<sup>71</sup>. Así mismo, el consumo de antioxidantes podría ayudar a mantener la integridad del ADN espermático, la funcionalidad de los espermatozoides en hombres infértiles<sup>72</sup> y mejorar la calidad seminal<sup>73</sup>.

La ingesta dietaria de antioxidantes, criptoxantina, vitamina C,

licopeno, y beta-caroteno se ha correlacionado positivamente con el recuento espermático. Además, la vitamina C se asocia con un mayor volumen de eyaculado en varones jóvenes<sup>74</sup> y mayor recuento, movilidad y morfología espermática en varones con baja calidad seminal<sup>75</sup>.

Otros autores sugieren que el nivel de L-carnitina en el plasma seminal juega un papel esencial en el mantenimiento de la fertilidad masculina, siendo los niveles de L-carnitina mayores en los hombres fértiles<sup>76</sup>.

El sésamo también se ha relacionado con la calidad seminal por sus propiedades antioxidantes. Al parecer, mejora la concentración y la movilidad espermática, aunque parece no influir en la morfología de los espermatozoides en varones infértiles<sup>77</sup>. Se han estudiado otros antioxidantes incluidos en la dieta por su posible efecto protector sobre la calidad seminal, mejorando la movilidad y la fragmentación del ADN espermático, como el zinc<sup>78</sup>, el D-aspartato en varones de parejas con infertilidad<sup>79</sup> o la Coenzima Q10 en varones infértiles<sup>80,81</sup>.

En la práctica clínica, el uso de antioxidantes orales (vitaminas C y E, zinc, selenio, folato, carnitina y carotenoides) en hombres infértiles podría mejorar la calidad del esperma y las tasas de embarazo<sup>82</sup>. En la actualidad, aunque la evidencia no es todavía suficientemente fuerte, se recomienda el tratamiento con antioxidantes (N-acetil-cisteína, vitamina A, vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, carnitina, mioinositol, licopeno, etc) y micronutrientes (selenio, zinc, cobre) para mejorar la calidad seminal<sup>83</sup>.

#### **2.4.6. Consumo de tabaco y alcohol**

Aunque todavía es un tema poco estudiado, diversos trabajos sugieren que el hábito tabaquico tiene un efecto negativo sobre la calidad seminal y la fertilidad masculina<sup>84-88</sup>.

El tabaquismo podría derivar en cambios genéticos y epigenéticos que disminuyen la funcionalidad de los espermatozoides afectando a la fertilidad masculina, incluso en varones con calidad seminal normal, y que podría estar relacionado con la dosis de tabaco (efecto dosis-respuesta)<sup>87</sup>.

Además, varios autores relacionan un mayor índice de fragmentación del ADN espermático con el tabaquismo<sup>89,90</sup>. Sin embargo, estudios más recientes no encuentran una relación entre el tabaquismo y la fragmentación del DNA espermático<sup>86,91</sup>.

El consumo de bebidas alcohólicas podría afectar a la calidad seminal<sup>84,85</sup>. Podría influir negativamente sobre el volumen seminal y la morfología espermática normal y al igual que el tabaquismo, podría estar correlacionado con la dosis de la ingesta de alcohol (ocasional o diario), lo que sugiere que un consumo moderado podría no afectar negativamente a los parámetros seminales<sup>92</sup>. Otro estudio también relacionó negativamente el consumo de vino tinto 1-3 veces por semana con anomalías en la morfología espermática en varones de parejas infértiles<sup>93</sup>. La influencia del consumo de alcohol por separado y combinado con el tabaco podría tener un efecto perjudicial sobre la integridad de la cromatina espermática<sup>86</sup>.

#### **2.4.7. Consumo de otras drogas**

Algunos estudios relacionan el consumo de otras drogas con la calidad seminal. La exposición a cannabinoides (componentes de la planta de la marihuana) disminuye significativamente la movilidad espermática en pacientes de infertilidad<sup>94,95</sup>. Estas sustancias actúan inhibiendo la respiración celular en los espermatozoides y al parecer el plasma seminal podría desempeñar un papel protector<sup>96</sup>.

#### **2.4.8. Consumo de café**

Existe gran interés en estudiar la relación entre la calidad seminal y el consumo de otras sustancias cotidianas, como el café, que podría estar relacionado con el porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides con anomalías en la cabeza y el cuello<sup>93</sup>. Sin embargo, la mayoría de estudios no han mostrado una relación clara<sup>84,97,98</sup>. En dos revisiones publicadas en los últimos cinco años, el consumo de cafeína se ha asociado con una relativa baja tasa de fragmentación del ADN espermático<sup>99</sup>, aunque otra revisión posterior asoció el consumo de cafeína con roturas de ADN espermático<sup>98</sup>. Respecto a fertilidad, el consumo de café en el varón podría influir negativamente en la probabilidad de

embarazo<sup>66,98</sup>.

#### 2.4.9. Medicamentos

Existe gran interés en determinar los medicamentos que podrían alterar la calidad seminal y la fertilidad masculina<sup>100</sup>. Ciertos medicamentos podrían tener un efecto adverso sobre la fertilidad mediante varios mecanismos: toxicidad directa sobre los espermatozoides, alteraciones endocrinas o efectos sobre la salud sexual<sup>2</sup>. Respecto al efecto de los antibióticos sobre la calidad seminal, en ratas se ha observado que los antibióticos del grupo de las cefalosporinas tienen un efecto negativo sobre el movimiento de los espermatozoides mayor que la amoxicilina junto con el clavulánico<sup>101</sup>. El uso de antibióticos puede afectar a la espermatogénesis y a la capacidad funcional del espermatozoide. Tetraciclinas, azytromicina, clotrimazol y cloroquinas perjudican la movilidad y viabilidad espermática *in vitro*, pero todavía está en discusión si influyen o no en la calidad seminal *in vivo*. La amoxicilina ha demostrado no perjudicar a la calidad seminal en experimentos *in vitro*<sup>102</sup>.

En una revisión de Drobnis y colaboradores, observaron que los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) parecen tener un menor efecto sobre el sistema reproductivo masculino, aunque hay una escasez de estudios en humanos. Además, observaron que el paracetamol causaba anomalías en los espermatozoides, incluida la fragmentación del ADN, y aumentaba el tiempo hasta la consecución del embarazo. En roedores, el paracetamol tiene un impacto negativo en la histología y fertilidad del túbulo seminífero<sup>103</sup>. Recientemente, Kristensen y colaboradores han observado el efecto del tratamiento de ibuprofeno sobre las hormonas sexuales, lo cual podría afectar a la calidad seminal<sup>104</sup>.

El paracetamol y el ibuprofeno son utilizados en mayor o menor frecuencia por mujeres embarazadas. La evidencia reciente muestra vínculos entre exposición gestacional a paracetamol y testículos no descendidos en recién nacidos<sup>105</sup>.

La acumulación de evidencias indica que la ingesta de estas sustancias podría estar relacionada con malformaciones genitales en los niños recién nacidos y trastornos reproductivos en los adultos. Un estudio reciente de de Rossito y colaboradores al respecto muestra que la exposición prenatal a estos fármacos

durante el periodo crítico de determinación del sexo (ventana de programación de masculinización) puede afectar negativamente a la calidad del semen en ratones<sup>106</sup>.

Es conocido que los medicamentos opioides, como la morfina, cuyo uso está extendido, podrían tener efectos negativos sobre la fertilidad del varón, como la disminución del nivel de testosterona, causando hipogonadismo y perjudicando la función testicular. Además, esta sustancia podría reducir la calidad del semen, incluida una mayor fragmentación del ADN espermático<sup>103</sup>.

#### **2.4.10. Estrés psicológico**

El estrés psicológico se ha relacionado con la fertilidad masculina, pudiendo reducir el volumen de eyaculado<sup>107</sup>, la concentración<sup>84,107-109</sup>, la movilidad<sup>84,109</sup> y la morfología normal espermática<sup>84</sup>. No obstante, otros autores han mostrado una relación débil o inexistente entre el estrés psicológico y los parámetros seminales<sup>108,109</sup>.

#### **2.4.11. Exposición a tóxicos y contaminantes ambientales**

Skakkebaek y colaboradores elaboraron un marco conceptual en el que las exposiciones ambientales prenatales derivadas del estilo de vida moderno podrían tener un impacto sustancial sobre la fisiología reproductiva masculina, más incluso que los factores genéticos<sup>110</sup>. Los trastornos reproductivos relacionados con estas exposiciones prenatales incluirían hipospadias, criptorquidia, mala calidad del semen y cáncer de células germinales testiculares (TGCC), asociados potencialmente en lo que se denomina síndrome de disgenesia testicular (TDS)<sup>105,111-113</sup>.

Estos factores ambientales pueden actuar directamente o a través de mecanismos epigenéticos. En este último caso, los efectos de las exposiciones podrían tener un impacto durante varias generaciones tras la exposición<sup>112</sup>. En todo caso, es acuciante la necesidad de más investigaciones al respecto, particularmente en países altamente industrializados que se encuentran en retroceso demográfico<sup>110</sup>. Como se refleja en la recopilación de Bergman y colaboradores, en algunos países se observan grandes proporciones (hasta un 40%) de hombres jóvenes con baja calidad seminal, lo que reduciría su capacidad potencial para engendrar hijos<sup>105</sup>.

En la última década se ha mostrado una relación entre la exposición concurrente a determinados compuestos como las dioxinas, los compuestos policlorados o polibromados, los plaguicidas organoclorados o fosforados, fenoles y parabenos o los ftalatos -sustancias conocidas en general como compuestos disruptores endocrinos- y un mayor riesgo de subfertilidad masculina junto con alteraciones en el tracto reproductivo y en los niveles hormonales y parámetros espermáticos<sup>113,114</sup>.

No obstante, son todavía necesarios más estudios al respecto para afianzar la evidencia obtenida hasta el momento. Por ejemplo, la relación entre el bisfenol A y la calidad seminal todavía es un tema en debate<sup>115</sup>. La evidencia que apoya una asociación entre la exposición al bisfenol A y los resultados adversos en la salud reproductiva masculina sigue siendo no concluyente<sup>116</sup>.

La toxicidad de algunos compuestos fenólicos, entre ellos la benzofenona-3 (BP-3) usada en cosmética y alimentación se ha estudiado en animales y humanos. En hombres jóvenes, las concentraciones urinarias de filtros UV de tipo BP podrían estar asociados con una alteración moderada de algunas hormonas reproductivas, pero los efectos sobre la función reproductora probablemente sean pequeños y su importancia clínica no está clara<sup>117</sup>.

Además, la exposición a parabenos se ha asociado con la presencia aumentada de disomías cromosómicas en los espermatozoides de pacientes infértiles<sup>118</sup>. Estos compuestos se encuentran en productos de consumo habitual (metil, etil y butil parabenos) y podrían tener un impacto adverso sobre los parámetros espermáticos en varones de parejas que intentan quedarse embarazadas<sup>119</sup>. Sin embargo, otros autores no encuentran asociaciones significativas entre los parámetros espermáticos y las concentraciones de parabenos urinarios en varones de parejas subfértiles en Japón<sup>120</sup>.

La exposición a otras sustancias como pegamentos, disolventes, siliconas, o metales pesados, entre otros, también se ha relacionado con la infertilidad masculina y afectación de los parámetros reproductivos<sup>121</sup>. Por último, también se ha visto que

los plaguicidas podrían provocar daños en la estructura de la cromatina espermática<sup>122-124</sup>.

#### **2.4.12 Distancia anogenital (AGD)**

La distancia anogenital (AGD), distancia entre el ano y los genitales, es un dimorfismo sexual en mamíferos placentarios y es alrededor del doble en machos que en hembras<sup>5</sup>.

Numerosos estudios han mostrado que la AGD es un buen biomarcador de la exposición prenatal a disruptores endocrinos en humanos<sup>125</sup>, y concretamente de la acción de andrógenos durante la formación del aparato reproductor masculino tanto en experimentación animal<sup>13</sup> como en humanos<sup>7,8,14</sup>, y puede servir como un predictor de la calidad seminal en el varón adulto<sup>6,8,9</sup>.

Diversos estudios demuestran que la exposición prenatal a ftalatos<sup>126-131</sup>, bisfenol A<sup>132</sup>, plaguicidas<sup>133</sup>, dioxinas<sup>134</sup> o tabaco<sup>135</sup> provocan un acortamiento en la AGD en el varón. Estudios recientes en modelos animales muestran que la exposición a ftalatos [dibutil ftalato (DBP)] durante la ventana de programación de masculinización en el periodo fetal induce el TDS, causando disminución de AGD, disgenesia testicular focal y otros trastornos como criptorquidia o hipospadias. Los autores de estos trabajos sugieren que estos resultados podrían ser trasladables a humanos<sup>136</sup>.

Por último, numerosos estudios asocian una AGD acortada con algunas patologías relacionadas con la infertilidad masculina<sup>6-10,137</sup>, tales como criptorquidia<sup>7</sup>, hipospadias<sup>10</sup>, bajo nivel de testosterona<sup>8</sup>, menor tamaño testicular<sup>8</sup>, menor longitud del pene<sup>8,10</sup>, peor calidad seminal<sup>8,9</sup> y azoospermia no obstructiva<sup>6</sup>. Por el contrario, una AGD alargada se asocia con un mayor potencial reproductivo en el varón<sup>6,9,15</sup>.

#### **2.5. Referencias bibliográficas**

1. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic

- review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update* 2017; 23(6):646-659.
2. Larry I. Lipshultz, Stuart S. Howards and Craig S. Niederberger. Infertility in the male. Fourth Edition. *Cambridge University Press* 2009; ISBN 978-0-521-87289-8 .
  3. Manual de Andrología de la Sef. *Mario Brassesco* 2011; EdikaMed. ISBN: 978-84-7877.
  4. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. Geneva, Switzerland: *WHO Press* 2010.
  5. Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect* 2009 ;117(11):1786-90.
  6. Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. *PloS ONE* 2011; 6(5): e18973.
  7. Jain VG, Singal AK. Shorter anogenital distance correlates with undescended testis: detailed genital anthropometric analysis in human newborns. *Hum Reprod* 2013;28(9):2343-9.
  8. Dean A, Sharpe RM. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(6):2230-8.
  9. Mendiola J, Stahlhut RW, Jorgensen N, Liu F, Swan SH. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environ Health Perspect* 201 ;119(7):958-63.
  10. Thankamony A, Lek N, Carroll D, Williams M, Dunger DB, Acerini CL, Ong KK, Hughes IA. Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ Health Perspect* 2014;122(2):207-11.
  11. Hsieh MH, Eisenberg ML, Hittelman AB, Wilson JM, Tasian GE, Baskin LS. Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenita

I distance. *Hum Reprod* 2012;27(6):1577-80.

12. Physiology of Reproduction. Editors: Knobil and Neill's, 3rd edition, *Elsevier Academic Press*, Amsterdam, The Netherlands 2005.
13. Van den Driesche S, Scott HM, MacLeod DJ, Fiskén M, Walker M, Sharpe RM. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. *Int J Androl* 2011;34(6 Pt 2):e578-86. 13.
14. Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;21(8):5457-64.
15. Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J Urol* 2012 ;187(2):594-8.
16. Lars Björndah, David Mortimer, Christopher L. R. Barratt, Jose Antonio Castilla, Roelof Menkveld, Ulrik Kvist, Juan G. Alvarez and Trine B. Haugen. A practical guide to basic laboratory andrology. *Cambridge University Press* 2010. ISBN 978-0-521-73590-2.
17. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010; 205:117–131.
18. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010; 33:e221-7.
19. Evgeni E, Lymberopoulos G, Gazouli M, Asimakopoulos B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2015; 188:17-23.9.
20. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* 2000;21(1):145-53.
21. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;5(5):586-92.

22. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1991;30(4):346-52.
23. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001 ;16(6):1165-71.
24. Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod* 2003;18(11):2382-9.
25. Spanò M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73:43-50.
26. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8:11–29.3.
27. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93:1027–36.
28. Rubes Selevan SG, Sram RJ, et al. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007; 625:20-8.
29. Castilla JA et al.. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Human Reproduction* 2006; 21:847-851.
30. Keel BA. Within- and between- subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *FertilSteril* 2006; 85:128-34.
31. Schwartz D, Laplanche A, Jouannet P, David G. Within-subject variability of human semen in regard to sperm count, volume, total number of spermatozoa and length of abstinence. *J ReprodFertil* 1979; 57:391–5.
32. Knuth UA, Kuhne J, Bals-Pratsch M, Nieschlag E. Intra-individual variation of sperm velocity, linearity, lateral head displacement and beat frequency in

- healthy volunteers. *Andrologia* 1988; 20:243–8.
33. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003; 18:2082–8.
  34. Francavilla F, Barbonetti A, Necozone S, Santucci R, Cordeschi G, Marcerola B et al. Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. *Int J Androl* 2007; 30:174-81.
  35. Leushuis E, Van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Bossuyt PM, Blanckstein MA et al. Reproducibility and reliability of repeated semen analyses in male partners of subfertile couples. *FertilSteril* 2010; 94:2631-5.
  36. Schrader SM, Turnet TW, Breitenstein MJ, Simon SD. Longitudinal study of semen quality of unexposed workers. I. Study overview. *Reprod Toxicol* 1988;2:183-90.
  37. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J et al. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod* 2006; 21:2061–4.
  38. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples. *Hum Reprod* 2011; 26:3244-8.
  39. Smit M, Dohle GR, Hop WC, et ál. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int. J. Androl* 2007; 30:48-55.
  40. Reinberg A, Smolensky MH, Hallek M, Smith KD, Steinberger E. Annual variation in semen characteristics and plasma hormone levels in men undergoing vasectomy. *Fertil Steril* 1988;49(2):309-15.
  41. Levine RJ, Bordson BL, Mathew RM, Brown MH, Stanley JM, Starr TB. Deterioration of semen quality during summer in New Orleans. *Fertil Steril* 1988;49:900 –7.
  42. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Har-Vardi I. Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a

plausible explanation of a seasonal birth pattern. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208(5):406.e1-6.

43. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001;16:1012–9.
44. Centola GM, Eberly S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration. *Fertil Steril* 1999;72(5):803-8.)
45. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *FertilSteril* 2004;82:57-65.
46. Jarow JP, Fang X, Hammad TA. Variability of semen parameters with time in placebo treated men. *J Urol* 2013;189(5):1825-9.
47. Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Stahlhut RW, Liu F, Swan SH. Reproductive parameters in young men living in Rochester, New York. *Fertil Steril* 2014;101(4):1064-71.
48. Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, et ál. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011; 96:1083-6.
49. Sánchez-Martín P, Sánchez-Martín F, González-Martínez M, Gosálvez J. Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst Biol Reprod Med.* 2013; 59:256-60.
50. Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Barrera N, Vaamonde-Lemon B. Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *Eur J Apol Physiol* 2012;112:3267-73.
51. Jóźków P, Rossato M. The Impact of Intense Exercise on Semen Quality. *Am J Mens Health* 2017; 11:654–662.
52. Lalinde-Acevedo PC, Mayorga-Torres BJM, Agarwal A, du Plessis SS, Ahmad G, Cadavid AP, Cardona Maya WD. Physically active men show better semen parameters than their sedentary counterparts. *Int J Fertil Steril*

2017;11(3):156-165.

53. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M: Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:768–780.
54. Mínguez-Alarcón L, Chavarro JE, Mendiola J, Gaskins AJ, Torres-Cantero AM. Physical activity is not related to semen quality in young healthy men. *Fertil Steril* 2014;102:1103-9.
55. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol* 2009;200:259-71.
56. Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2011;95:1025-30.
57. Pelliccione F, Verratti V, D'Ángeli A, Micililo A, Doria C, Pezzella A, Iacutone G, Francavilla F, Di Giulio C, Francavilla S. Physical exercise at high altitude is associated with a testicular dysfunction leading to reduced sperm concentration but healthy sperm quality. *Fertil Steril* 2011;96(1):28-33.
58. Hallzadeh Maleki B, Ehgball M, Asri-Rezaei S. Comparison of seminal oxidants and antioxidants in subjects with different levels of physical fitness. *Andrology* 2013;1(4):607-14.
59. Hayden RP, Flannigan R, Schlegel PN. The Role of Lifestyle in Male Infertility: Diet, Physical Activity, and Body Habitus. *Curr Urol Rep* 2018; 19:56.
60. Karayiannis D, Kontogianni MD, Mendorou C, Douka L, Mastrominas M, Yiannakouris N. Association between adherence to the Mediterranean diet and semen quality parameters in male partners of couples attempting fertility. *Hum Reprod* 2017;32(1):215-222.
61. Oostingh EC, Steegers-Theunissen RP, de Vries JH, Laven JS, Koster MP. Strong adherence to a healthy dietary pattern is associated with better semen quality, especially in men with poor semen quality. *Fertil Steril*

2017;107(4):916-923.e2.

62. Efrat M, Stein A, Pinkas H, Unger R, Birk R. Dietary patterns are positively associated with semen quality. *Fertil Steril* 2018;109(5):809-816.
63. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, Bernabeu R. Food intake and its relationship with semen quality: a case-control study. *Fertil Steril* 2009;91(3):812-8.
64. Gaskins AJ, Colaci DS, Mendiola J, Swan SH, Chavarro JE. Dietary patterns and semen quality in young men. *Hum Reprod* 2012; 7(10):2899-907.
65. Eslamian G, Amirjannati N, Rashidkhani B, Sadeghi MR, Hekmatdoost A. Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: a case-control study. *Hum Reprod* 2012; 27(11):3328-36.
66. Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update* 2017 ;23(4):371-389.
67. Ricci E, Al-Beitawi S, Cipriani S, Alteri A, Chiaffarino F, Candiani M, Gerli S, Viganó P, Parazzini F. Dietary habits and semen parameters: a systematic narrative review. *Andrology* 2018;6(1):104-116.
68. Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, van der Spek PJ, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2009;24(6):1304-12.
69. Afeiche M, Williams PL, Mendiola J, Gaskins AJ, Jorgensen N, Swan SH, Chavarro JE. Dairy food intake in relation to semen quality and reproductive hormone levels among physically active young men. *Hum Reprod* 2013;28(8):2265-75.
70. MInguéz-Alarcón L, Chavarro JE, Mendiola J, Roca M, Tanrikut C, Vioque J, Jørgensen N, Torres-Cantero AM. Fatty acid intake in relation to reproductive hormones and testicular volume among young healthy men. *Asian J Androl* 2017; 19(2):184-190.
71. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Vioque J, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M,

- Moreno-Grau S, Bernabeu R. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril* 2010; 93(4):1128-33.
72. Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl* 2011; 13(3):374-81.
73. Horváth M, Czeizel E. Családtervezési és Genetikai Tanácsadó, Budapest, Bolgárkerék utca. Effect of a new dietary supplement on sperm quality. *Orv Hetil* 2012; 153(45):1787-92.
74. Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, Sarabia-Cos L, Vivero-Salmerón G, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Torres-Cantero AM. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. *Hum Reprod* 2012;27(9):2807-14.
75. Akmal M, Qadri JQ, Al-Waili NS, Thangal S, Haq A, Saloom KY. Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *J Med Food* 2006;9(3):440-2.
76. Ahmed SD, Karira KA, Jagdesh, Ahsan S. Role of L-carnitine in male infertility. *J Pak Med Assoc* 2011; 61(8):732-6.
77. Khani B, Bidgoli SR, Moattar F, Hassani H. Effect of sesame on sperm quality of infertile men. *J Res Med Sci* 2013; 18(3):184-7.
78. Ali Fallah, Azadeh Mohammad-Hasani, and Abasalt Hosseinzadeh Colagar. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. *J Reprod Infertil* 2018; 19(2): 69–81.
79. Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11(1):81.
80. Mancini A, Balercia G. Coenzyme Q(10) in male infertility: physiopathology and therapy. *Biofactors* 2011; 37(5):374-80.
81. Safarinejad MR. The effect of coenzyme

Q<sub>10</sub> supplementation on partner pregnancy rate in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: an open-label prospective study. *Int Urol Nephrol* 2012; 44(3):689-700.

82. Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online* 2010; 20(6):711-23.
83. Calogero AE, Condorelli RA, Russo GI, La Vignera S. Conservative Nonhormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *Biomed Res Int* 2017; 2017:4650182.
84. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011; 95:116-23.
85. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J PatholMicrobiol* 2010; 53:35-40.
86. Anifandis G, Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, Dafopoulos K, Sotiriou S, Messinis IE. et al. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm<sup>®</sup>. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 290(4):777-82.
87. Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, Plessis SS du. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health* 2015; 33:143–160.
88. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur Urol* 2016; 70:635–645.
89. Vilorio T, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M: Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril* 2007; 88:523–525. 86.

90. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P: The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; 223:54–60.
91. De Bantel A, Fleury-Feith J, Poirot C, Berthaut I, Garcin C, Landais P, Ravel C. Simultaneous vitality and DNA-fragmentation measurement in spermatozoa of smokers and non-smokers. *Cytometry B Clin Cytom* 2015; 88(2):120-4.
92. Ricci E, Beitawi S Al, Cipriani S, Candiani M, Chiaffarino F, Viganò P, Noli S, Parazzini F. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017; 34:38–47.
93. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med* 2014 ;60(1):43-51.
94. Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human spermfunction in vitro. *Fertil Steril* 2006;85(3):653-60.
95. Amoako AA, Marczylo TH, Marczylo EL, Elson J, Willets JM, Taylor AH, Konje JC. Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 2013;28(8):2058-66.
96. Badawy ZS, Chohan KR, Whyte DA, Penefsky HS, Brown OM, Souid AK. Cannabinoids inhibit the respiration of human sperm. *Fertil Steril* 2009;91(6):2471-6.
97. Jensen TK, Swan SH, Skakkebak NE, Rasmussen S, Jørgensen N. Caffeine Intake and Semen Quality in a Population of 2,554 Young Danish Men. *Am. J. Epidemiol* 2010; 171:883-91.
98. Ricci E, Viganò P, Cipriani S, Somigliana E, Chiaffarino F, Bulfoni A, Parazzini F. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *Nutr J* 2017;16(1):37.
99. Belloc, M. Cohen-Bacrie, A. Dalleac, E. Amar, A. Hazout, J. de Mouzon Caffeine intake and sperm parameters. Analysis of a cohort of 4474

- consecutive semen samples. *Fertil Steril* 2013; 100(3):212-224.
100. Stearns G, Turek PJ. Avoiding toxins including spermatotoxic medications. *Semin Reprod Med* 2013;31(4):286-92.
  101. Antohi E, Gales C, Nechifor M. Pharmacological agents that affect sperm motility. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2011;115(4):1183-8.
  102. Hangreares CA, Rogers S, Hills F, et al. Effects of cotrimazole, erythromycin, amoxicillin, tetracycline and chloroquine on sperm function in vitro. *Hum Reprod* 1998;13:1878-86.
  103. Drobnis EZ, Nangia AK. Pain Medications and Male Reproduction. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1034: 39-57.
  104. Kristensen DM, Desdoits-Lethimonier C, Mackey AL, Dalgaard MD, De Masi F, Munkbøl CH, Styrihave B, Antignac JP, Le Bizec B, Platel C, Hay-Schmidt A, Jensen TK, Lesné L, Mazaud-Guittot S, Kristiansen K, Brunak S, Kjaer M, Juul A, Jégou B. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115(4):715-724.
  105. Bergman A, Heindel JJ, Kasten T, Kidd KA, Jobling S, Neira M, Zoeller RT, Becher G, Bjerregaard P, Bornman R, et al. The Impact of Endocrine Disruption: A Consensus Statement on the State of the Science. *Perspectives Editorial* 2013; 121:104-106.
  106. Rossitto M, Marchive C, Pruvost A, Sellem E, Ghetas A, Badiou S, Sutra T, Poulat F, Philibert P, Boizet-Bonhoure B. Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and ibuprofen. *Faseb J* 2018:fj201800488RRR. doi: 10.1096/fj.201800488RRR. [Epub ahead of print]
  107. Nordkap L, Jensen TK, Hansen ÅM, Lassen TH, Bang AK, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Skakkebak NE, Jørgensen N. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertil Steril* 2016; 105:174-87.1-2
  108. Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden-Vrtovec H. Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage. *Int J Androl* 2008; 31:557-64.

109. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzick D, Overstreet JW, et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* 2010; 93:1104-11.
110. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson A-M, Eisenberg ML, Jensen TK, Jorgensen N, Swan SH, Sapra KJ, et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* 2015; 96:55–97.
111. Xing JS, Bai ZM. Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? *Life Sci* 2018; 194:120–129.
112. Juul A, Almstrup K, Andersson AM, Jensen TK, Jørgensen N, Main KM, Meyts ER De, Toppari J, Skakkebaek NE. Possible fetal determinants of male infertility. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:553–562
113. Giwercman A, Giwercman YL. Environmental factors and testicular function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(2):391-402.
114. Hond E Den, Tournaye H, Sutter P De, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, Cox B, Nawrot TS, Larebeke N Van, D’Hooghe T. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int* 2015; 84:154–160.
115. Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, Redmon JB, Drobnis EZ, Wang C, Sparks A, Thurston SW, Liu F, Swan SH. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect* 2010;118(9):1286-91
116. Mínguez-Alarcón L, Hauser R, Gaskins AJ. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertil Steril* 2016; 106:864–870.
117. Adoamnei E, Mendiola J, Moñino-García M, Vela-Soria F, Iribarne-Durán LM, Fernández MF, Olea N, Jørgensen N, Swan SH, Torres-Cantero AM. Urinary concentrations of benzophenone-type ultra violet light filters and reproductive parameters in young men. *Int J Hyg Environ Health* 2018 ;221(3):531-540.
118. Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B, Klimowska A, Kałużny P, Radwan P,

- Jakubowski L, Hanke W. Environmental exposure to parabens and sperm chromosome disomy. *Int J Environ Health Res* 2017; 27:332–343.
119. Smarr MM, Honda M, Kannan K, Chen Z, Kim S, Louis GMB. Male urinary biomarkers of antimicrobial exposure and bi-directional associations with semen quality parameters. *Reprod Toxicol* 2018; 77:103–108.
  120. Nishihama Y, Toshima H, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Yoneyama M, Nakajima D, Shiraishi H, Tokuoka S. Paraben exposure and semen quality of Japanese male partners of subfertile couples. *Environ Health Prev Med* 2017; 22:5.
  121. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S et al. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(6):842-50.
  122. Jamal F, Haque QS, Singh S, Rastogi S. The influence of organophosphate and carbamate on sperm chromatin and reproductive hormones among pesticide sprayers. *Toxicol Ind Health* 2015 29. pii: 0748233714568175. [Epub ahead of print]
  123. Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B, Sobala W, Piskunowicz M, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. The effect of environmental exposure to pyrethroids and DNA damage in human sperm. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61(1):37-43.
  124. O'Flaherty C. Iatrogenic genetic damage of spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 2014;791:117-35.
  125. Arbuckle TE, Hauser R, Swan SH, Mao CS, Longnecker MP, Main KM, Whyatt RM, Mendola P, Legrand M, Rovet J, Till C, Wade M, Jarrell J, Matthews S, Van Vliet G, Bornehag CG, Mieuisset R. Meeting report: measuring endocrine-sensitive endpoints within the first years of life. *Environ Health Perspect* 2008; 116(7):948-51.
  126. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL; Study for Future Families Research Team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113(8):1056-61.
  127. Lottrup G, Andersson AM, Leffers H, Mortensen GK, Toppari J, Skakkebaek

- NE, Main KM. Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *Int J Androl* 2006; 29(1):172-80; discussion 181-5.
128. Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, Swan SH. Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect* 2007; 115(2):73.
129. Jurewicz J, Hanke W. Exposure to phthalates: reproductive outcome and children Elath. A review of epidemiological studies. *Int J Occup Med Environ Health* 2011; 24(2):115-41.
130. Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Intl J Androl* 2012; 35. :236-44.
131. Bustamante-Montes LP, Hernández-Valero MA, Flores-Pimentel D, García-Fábila M, Amaya-Chávez A, Barr DB, Borja-Aburto VH. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. *J Dev Orig Health Dis* 2013; 4(4).
132. Miao M, Yuan W, He Y, Zhou Z, Wang J, Gao E, Li G, Li DK. In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91(10):867-72.
133. Torres-Sanchez L, Zepeda M, Cebrián ME, Belkind-Gerson J, Garcia-Hernandez RM, Belkind-Valdovinos U, López-Carrillo L. Dichlorodiphenyldichloroethylene exposure during the first trimester of pregnancy alters the anal position in male infants. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1140:155-62.
134. Vafeiadi M, Agramunt S, Papadopoulou E, Besselink H, Mathianaki K, Karakosta P, Spanaki A, Koutis A, Chatzi L, Vrijheid M, Kogevinas M. In utero exposure to dioxins and dioxina-like compounds and anogenital distance in newborns and infants. *Environ Health Perspect* 2013; 121(1):125-30.
135. Fowler PA, Bhattacharya S, Flannigan S, Drake AJ, O'Shaughnessy PJ. Maternal cigarette smoking and effects on androgen action in male offspring: unexpected effects on second-trimester anogenital distance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 ;96(9):1502-6

136. Driesche S van den, Kilcoyne KR, Wagner I, Rebourcet D, Boyle A, Mitchell R, McKinnell C, Macpherson S, Donat R, Shukla CJ, et al. Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight* 2017; 2:1–20.
137. Eisenberg ML, Shy M, Walters RC, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and azoospermia in adult men. *Int J Androl* 2012; 35(5):726-30.

### **3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **3.1. Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo es describir y analizar los factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal en sujetos voluntarios en un estudio de seguimiento.

Objetivos específicos:

1. Analizar las relaciones entre las características sexuales (tiempo de abstinencia sexual y la frecuencia de eyaculación), así como determinados hábitos de vida, y la variabilidad de los principales parámetros seminales (volumen, recuento, movilidad y morfología espermática).
2. Analizar la relación entre determinados hábitos de vida y exposiciones ambientales y la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático.
3. Analizar las asociaciones entre la distancia anogenital (AGD), como biomarcador prenatal de exposición a andrógenos, y la variabilidad de los parámetros seminales.

#### **3.2. Hipótesis**

1. La variabilidad de la calidad seminal está relacionada con los hábitos sexuales o de vida.
2. La integridad cromatínica espermática se relaciona con los hábitos de vida y exposiciones ambientales.
3. La AGD se relaciona con los valores medios de los parámetros seminales, así como con su estabilidad a lo largo del tiempo.

## CAPÍTULOS

## 4. CAPITULO 1. Factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal: un estudio de seguimiento.

### 4.1. Introducción

El estudio de los parámetros seminales básicos, como el recuento, la movilidad y la morfología espermática, es clave para el diagnóstico de fertilidad de un varón<sup>1</sup>. Sin embargo, numerosos estudios sugieren que los parámetros seminales no son constantes en un mismo individuo a lo largo del tiempo<sup>1-7</sup>. De hecho, los datos conocidos sugieren que el recuento espermático es uno de los parámetros seminales con mayor variabilidad intraindividual<sup>1-8</sup>.

Además de por factores fisiológicos, la variabilidad en la calidad seminal puede estar condicionada por el tiempo de abstinencia sexual y por determinados hábitos de vida y aspectos de estrés psicológico. Existe consenso sobre la relación positiva entre el tiempo de abstinencia sexual y el volumen de eyaculado<sup>6,9-11</sup>. Sin embargo, la influencia sobre la movilidad y el recuento espermático está más cuestionada<sup>6,9-12</sup>.

Además, determinados hábitos de vida también se han relacionado con la calidad seminal. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado potenciales beneficios de la actividad física sobre la calidad seminal<sup>13-15</sup>. No obstante, otros estudios concluyen que un régimen elevado de ejercicio físico podría afectar negativamente a los parámetros seminales<sup>16,17</sup>. Otros autores no encuentran relación entre la actividad física y la calidad seminal, mostrando al menos que no existe una asociación negativa entre ambas características<sup>18</sup>.

Con respecto al consumo de tabaco y alcohol, algunos autores no encuentran una clara evidencia del efecto negativo del hábito tabáquico<sup>19</sup> o el consumo excesivo de alcohol<sup>20</sup> sobre la calidad seminal y la fertilidad masculina. Sin embargo, otros autores sí asocian el hábito tabáquico<sup>21-23</sup> y el consumo de bebidas

alcohólicas<sup>22,23</sup> con una afectación de la calidad seminal. También existe gran interés en explorar la relación entre la calidad seminal y el consumo de otras sustancias cotidianas, como por ejemplo el café, aunque hasta el momento no se ha mostrado una relación clara<sup>22,24</sup>.

Por último, el estrés psicológico se ha relacionado con la fertilidad masculina, pudiendo reducir el volumen del eyaculado<sup>25</sup>, la concentración<sup>22,26,27</sup>, la movilidad<sup>22,27</sup> y la morfología normal espermática<sup>22,25</sup>. No obstante, se ha mostrado también que la relación entre el estrés psicológico y los parámetros seminales podría ser débil o inexistente<sup>26,27</sup>. El objetivo de este estudio es analizar si características sexuales como el tiempo de abstinencia sexual y la frecuencia de eyaculación, así como determinados hábitos de vida y el estrés psicológico contribuyen a la variabilidad de la calidad seminal en varones voluntarios.

## **4.2. Material y método**

### **4.2.1. Población de estudio y cuestionarios**

Se trata de un estudio prospectivo y de seguimiento que se llevó a cabo evaluando muestras seminales procedentes de varones voluntarios y sanos que contactaron o acudían a un centro de reproducción asistida humana ubicado en la ciudad de Murcia. Se reclutaron 24 varones (16 por su interés en el programa de donación de semen y 8 sujetos de parejas de pacientes de ginecología u obstetricia, no de infertilidad, de la propia clínica), de los cuales se excluyeron 5 (uno por azoospermia y 4 por abandono voluntario del estudio). Finalmente se realizó un seguimiento de la calidad seminal de 19 individuos (18-40 años) durante un periodo de un año (2012-2013) para registrar la variabilidad de los parámetros seminales en cada uno de ellos. De ellos, 11 tenían fertilidad probada (hijos/as) y 8 no presentaban descendencia, principalmente porque aún no habían considerado la posibilidad de paternidad. Las recogidas de muestras seminales fueron aproximadamente cada 4-6 semanas y los varones cumplimentaron encuestas epidemiológicas sobre datos demográficos, exposiciones y hábitos de vida, y se

sometieron a una exploración andrológica. Cada participante aportó entre 6 y 14 muestras seminales cada uno (un sujeto: 6 muestras; un sujeto: 7 muestras; un sujeto: 12 muestras; un sujeto: 14 muestras, y 15 sujetos: 10 muestras seminales) repartidas durante un periodo de 12 meses. El número total de muestras seminales analizadas fue de 189, de las cuales 46 fueron de donantes y 143 del resto de sujetos. Los participantes fueron recompensados por su participación con una tarjeta regalo de 100 euros. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes y la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia aprobó este estudio. Todos los sujetos realizaron un cuestionario inicial que incluyó datos sobre edad, nivel de estudios, ocupación, antecedentes clínicos previos y actuales, desarrollo sexual, estilo de vida (consumo de tabaco, actividad física, etc.), hábitos sexuales y situaciones extraordinarias, en los 3 meses anteriores al inicio del estudio. Posteriormente, tras cada obtención de muestra, los varones cumplimentaron encuestas de seguimiento registrando datos de estilos de vida y hábitos sexuales durante las 4 semanas previas.

#### **4.2.2. Análisis seminal y exploración física**

Todas las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en un frasco estéril de plástico de boca ancha (Deltalab 150 ml PP B/I) etiquetado y atemperado a temperatura ambiente, en la sala para obtención de muestras del centro de reproducción humana. El tiempo de abstinencia se registró como el número de horas desde la obtención de la muestra hasta la eyaculación anterior. En cada análisis, los sujetos informaron sobre la frecuencia de eyaculación en los 15 días previos. Todas las muestras seminales se analizaron siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud<sup>1</sup> y se procesaron entre 30 y 60 min tras la eyaculación. El volumen seminal se estimó por peso de la muestra, suponiendo una densidad de esperma de 1,0 g/ml. Para determinar el porcentaje de espermatozoides móviles, los espermatozoides fueron clasificados como progresivos rápidos y no progresivos<sup>1</sup>. Brevemente, 10 µl de semen bien mezclados se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio que se había mantenido a 37°C y se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm e inmediatamente se examinó con un aumento de x400. La concentración espermática se evaluó utilizando un hemocitómetro (Improved Neubauer; Hauser Scientific Inc.,

Horscham, PA, EE.UU.). Las muestras fueron diluidas en una solución de 0,6 M de  $\text{NaHCO}_3$  y 0,4% (v/v) de formaldehído en agua destilada y se evaluaron al menos 200 espermatozoides en 2 réplicas. También se calculó el recuento total de espermatozoides (volumen x concentración de espermatozoides). Se realizaron frotis para la morfología espermática con secado al aire, fijación y tinción Diff-Quik, y se evaluó mediante los criterios estrictos de Kruger<sup>28</sup>. La misma bióloga especializada (C.P-P.) realizó todos los análisis seminales. En la exploración física se recogieron datos antropométricos (peso y altura), y se evaluó el tamaño testicular usando un orquidiómetro de Prader (Andrology Australia, Clayton, Victoria, Australia) y la presencia o no de varicocele u otras anomalías escrotales.

#### 4.2.3. Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos sobre características demográficas, examen físico y calidad seminal. Se calculó el porcentaje de coeficiente de variación (CV) intraindividual (%CVi) y el CV interindividual (%CVe).

Las variables independientes dicotómicas (sí/no) analizadas fueron: tabaquismo, consumo de vino, cerveza, café o licores, estrés, práctica de ejercicio ligero, moderado o intenso, y de ejercicio moderado/intenso y hábitos sedentarios. Excepto para el tabaquismo (sí/no), las variables de consumo se dicotomizaron por la mediana, y se consideró al sujeto en el grupo del «sí» si registró más de la mitad de las respuestas afirmativas en los cuestionarios de seguimiento (consumidor habitual o regular). En el caso del estrés, se consideró un sujeto sometido a estrés al responder a 2 o más preguntas afirmativamente (de las 8 presentes en el cuestionario<sup>26</sup>) más del 50% de las veces en dichos cuestionarios (estrés habitual o regular). Con respecto a la actividad física, se calculó el equivalente metabólico total (MET) para cada sujeto usado en estudios previos<sup>13</sup>. Se estableció una clasificación en ejercicio ligero (< 3 MET), moderado (3-6 MET) e intenso (> 6 MET). Igualmente, se consideró que un sujeto realizaba o no un tipo de ejercicio concreto si respondió afirmativamente a más del 50% de las veces durante el seguimiento (ejercicio habitual o regular). Las actividades sedentarias (ver televisión [TV], etc.) se registraron según el número medio de horas semanales durante el seguimiento. Se emplearon correlaciones de Spearman (pruebas no paramétricas) con el objetivo de estudiar las relaciones

existentes entre variables continuas. Las pruebas fueron de 2 colas y el nivel de significación estadística se fijó en 0,05. Para la realización de los análisis estadísticos se empleó el paquete estadístico SPSS 19.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE.UU.).

### **4.3. Resultados**

Los 19 individuos participantes tenían entre 18 y 40 años y sin patologías conocidas. En la Tabla 1 podemos observar el resultado de los CVi y CVe para cada uno de los parámetros seminales y características sexuales. El recuento espermático total y la concentración espermática fueron los parámetros seminales que mostraron el mayor CVi (74,5 y 62,6%, respectivamente), mientras que el porcentaje de movilidad mostró el menor CVi (14,6%). El resto de parámetros mostraron un CVi intermedio respecto a los previamente citados.

La variabilidad de la calidad seminal interindividual mostró un patrón similar a la intraindividual, obteniéndose en este caso un CVe relativamente mayor para la concentración espermática que para el recuento espermático total (214% vs.199%).

Respecto a la variabilidad en las características o pautas sexuales de los sujetos, los resultados mostraron un CVi más elevado para el tiempo de abstinencia comparado con la frecuencia eyaculatoria. Los resultados de los CVe siguieron la misma pauta descrita anteriormente.

Los resultados de la relación entre distintos hábitos de vida (tabaquismo, consumo de alcohol, consumo de café, estrés, ejercicio físico) y la variabilidad de la calidad seminal se muestran en las Tablas 2 a 5. En general, en todas las variables se obtuvieron tanto los CVe como los CVi más altos para la concentración y el recuento total espermático, frente a los CVe y los CVi más bajos en el porcentaje de movilidad espermática para ambos grupos de sujetos, los que presentaban la característica de interés o no. Como cabría esperar, en global los CVe fueron más elevados que los CVi, a excepción del porcentaje de espermatozoides normales en los sujetos no

consumidores regulares de café (2,2% vs. 12,2%) y el porcentaje de movilidad en los no consumidores habituales de cerveza (1,1% vs. 5,2%). Los sujetos que practicaban regularmente ejercicio ligero o moderado presentaron valores de CVi y CVe relativamente más bajos que los que no lo practicaban. La práctica de ejercicio moderado intenso no afectaba a la variabilidad intraindividual, pero sí aumentaba la interindividual en el caso de la morfología espermática. El ejercicio intenso aumentaba la variabilidad intra e interindividual de la concentración, recuento total y la morfología espermática. La relación entre actividades sedentarias como ver la TV, videojuegos, etc., y la variabilidad espermática se analizó mediante pruebas de correlación. Los resultados mostraron que el número de horas viendo TV estaba directamente relacionado con una mayor variabilidad en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales ( $r$  de Spearman = 0,219;  $p = 0,003$ ). Respecto al resto de hábitos, se obtuvieron los CVi y CVe más altos para los sujetos consumidores regulares de vino, cerveza o café que los no consumidores, para todos los parámetros seminales estudiados. En el caso del consumo habitual de licores, los CVi y los CVe fueron similares en ambos grupos, excepto para la movilidad, donde los CVi fueron más altos en los consumidores que en los no consumidores. Respecto al tabaquismo, se observó que los individuos no fumadores presentaban un ligero incremento del CVi, respecto a los fumadores, para la concentración, el porcentaje de espermatozoides normales y el recuento total. Los CVe fueron más altos en los sujetos fumadores que en los no fumadores, a excepción del porcentaje de espermatozoides normales (66,5% vs. 103%). En el estudio de la valoración del estrés psicológico se observaron tanto los CVi como los CVe más altos en los individuos que no presentaban un estrés habitual que en los estresados para todos los parámetros seminales.

**Tabla 1.** Coeficientes de variabilidad intra (CVi) e inter- individual (CVe) con respecto a parámetros seminales y características sexuales.

| <u>Parámetros seminales</u>                         | <u>CVi</u> | <u>CVe</u> |
|-----------------------------------------------------|------------|------------|
| Volumen de eyaculado (ml)                           | 30,1%      | 95,0%      |
| Concentración espermática ( $10^6$ /ml)             | 62,6%      | 214%       |
| Recuento espermático total ( $10^6$ )               | 74,5%      | 199%       |
| % movilidad espermática ([PR] + no progresiva [NP]) | 14,6%      | 30,1%      |
| % morfología espermática normal                     | 41,2%      | 119%       |
| <u>Características sexuales</u>                     |            |            |
| Tiempo de abstinencia (horas)                       | 181%       | 421%       |
| Frecuencia de eyaculación <sup>a</sup>              | 40,4%      | 113%       |

<sup>a</sup> Número total de eyaculaciones durante los 15 días previos al análisis seminal.

**Tabla 2.** Coeficientes de variabilidad intra (CVi) e interindividual (CVe) de los parámetros espermáticos relacionados con los distintos hábitos de vida.

| Parámetros<br>seminales                         | Tabaquismo |       |       |       | Consumo habitual de vino |       |       |       | Consumo habitual de café |       |       |       |
|-------------------------------------------------|------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|
|                                                 | Si         |       | No    |       | Si                       |       | No    |       | Si                       |       | No    |       |
|                                                 | CVi        | CVe   | CVi   | CVe   | CVi                      | CVe   | CVi   | CVe   | CVi                      | CVe   | CVi   | CVe   |
| Volumen de eyaculado (ml)                       | 35,2%      | 66,2% | 22,9% | 68,6% | 25,5%                    | 76,5% | 15,8% | 55,1% | 28,3%                    | 87,2% | 10,7% | 28,9% |
| Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml) | 62,3%      | 167%  | 73,2% | 131%  | 48,8%                    | 150%  | 39,0% | 149%  | 60,2%                    | 205%  | 20,0% | 65,4% |
| Recuento espermático total (10 <sup>6</sup> )   | 75,2%      | 144%  | 84,2% | 132%  | 58,2%                    | 154%  | 46,6% | 128%  | 68,4%                    | 188%  | 27,7% | 56,1% |
| % movilidad espermática (PR+ NP)                | 15,8%      | 22,4% | 15,0% | 20,1% | 12,7%                    | 24,9% | 7,5%  | 12,5% | 14,1%                    | 29,3% | 3,9%  | 6,4%  |
| % morfología espermática normal                 | 37,4%      | 66,5% | 54,7% | 103%  | 36,3%                    | 110%  | 21,1% | 50,6% | 40,5%                    | 118%  | 12,2% | 2,2%  |

**Tabla 3.** Coeficientes de variabilidad intra (CVi) e interindividual (CVe) de los parámetros espermáticos relacionados con los distintos hábitos de vida

| Parámetros<br>seminales                         | Consumo habitual de cerveza |       |       |       | Consumo habitual de licores |       |       |       | Estrés habitual |       |       |       |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|
|                                                 | Si                          |       | No    |       | Si                          |       | No    |       | Si              |       | No    |       |
|                                                 | CVi                         | CVe   | CVi   | CVe   | CVi                         | CVe   | CVi   | CVe   | CVi             | CVe   | CVi   | CVe   |
| Volumen de eyaculado (ml)                       | 27,5%                       | 78,5% | 11,7% | 31,4% | 21,3%                       | 64,3% | 21,2% | 63,9% | 13,5%           | 22,1% | 26,9% | 74,5% |
| Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml) | 56,3%                       | 185%  | 24,3% | 69,5% | 44,6%                       | 146%  | 44,0% | 159%  | 30,6%           | 105%  | 55,6% | 187%  |
| Recuento espermático total (10 <sup>6</sup> )   | 67,5%                       | 189%  | 31,4% | 65,2% | 52,1%                       | 143%  | 52,8% | 123%  | 36,5%           | 109%  | 65,8% | 162%  |
| % movilidad espermática (PR + NP)               | 13,7%                       | 30,0% | 5,2%  | 1,1%  | 12,1%                       | 21,3% | 8,4%  | 18,9% | 7,1%            | 14,2% | 12,9% | 22,5% |
| % morfología espermática normal                 | 38,2%                       | 112%  | 15,6% | 43,6% | 28,3%                       | 80,7% | 30,4% | 86,9% | 18,3%           | 62,7% | 37,2% | 103%  |

**Tabla 4.** Coeficientes de variabilidad intra (CVi) e interindividual (CVe) de los parámetros espermáticos relacionados con los distintos hábitos de vida

| Parámetros<br>seminales                 | Ejercicio intenso habitual |        |       |        | Ejercicio moderado-intenso habitual |        |       |        |
|-----------------------------------------|----------------------------|--------|-------|--------|-------------------------------------|--------|-------|--------|
|                                         | Si                         |        | No    |        | Si                                  |        | No    |        |
|                                         | CVi                        | CVe    | CVi   | CVe    | CVi                                 | CVe    | CVi   | CVe    |
| Volumen de eyaculado (ml)               | 23,0%                      | 58,1%  | 18,9% | 75,6%  | 21,9%                               | 56,9%  | 19,0% | 67,8%  |
| Concentración espermática ( $10^6$ /ml) | 50,5%                      | 160%   | 39,1% | 130,5% | 44,0%                               | 124,6% | 43,3% | 138,8% |
| Recuento espermático total ( $10^6$ )   | 59,3%                      | 133,3% | 47,0% | 131,2% | 51,9%                               | 136,4% | 52,9% | 136,8% |
| % movilidad espermática (PR + NP)       | 10,4%                      | 17,6%  | 10,3% | 24,4%  | 8,9%                                | 16,5%  | 11,6% | 22,0%  |
| % morfología espermática normal         | 34,2%                      | 96,6%  | 24,6% | 66,8%  | 31,4%                               | 91,1%  | 27,0% | 77,3%  |

**Tabla 5.** Coeficientes de variabilidad intra (CVi) e interindividual (CVe) de los parámetros espermáticos relacionados con los distintos hábitos de vida

| Parámetros<br>seminales                         | Ejercicio moderado habitual |        |       |        | Ejercicio ligero habitual |       |       |        |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|--------|-------|--------|---------------------------|-------|-------|--------|
|                                                 | Si                          |        | No    |        | Si                        |       | No    |        |
|                                                 | CVi                         | CVe    | CVi   | CVe    | CVi                       | CVe   | CVi   | CVe    |
| Volumen de eyaculado (ml)                       | 15,2%                       | 48,1%  | 28,7% | 69,7%  | 11,2%                     | 33,0% | 29,7% | 80,9%  |
| Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml) | 33,6%                       | 124,8% | 52,7% | 170,5% | 30,9%                     | 92,2% | 55,0% | 196,8% |
| Recuento espermático total (10 <sup>6</sup> )   | 43,6%                       | 123,8% | 65,3% | 152,8% | 31,9%                     | 83,2% | 71,4% | 184,6% |
| % movilidad espermática (PR + NP)               | 7,2%                        | 139,5% | 13,3% | 209,6% | 7,9%                      | 15,5% | 12,3% | 257,5% |
| % morfología espermática normal                 | 23,5%                       | 74,6%  | 35,6% | 91,8%  | 19,3%                     | 75,0% | 36,8% | 91,5%  |

#### 4.4. Discusión

Hasta donde conocemos, este es el primer trabajo de seguimiento realizado para estudiar la variabilidad de los parámetros seminales en varones voluntarios sanos en relación con sus hábitos de vida. La calidad seminal de los sujetos participantes en nuestro estudio presentó una importante variabilidad temporal, más acusada para el recuento de espermatozoides, seguido de la morfología espermática y del volumen de eyaculado, siendo la movilidad de los espermatozoides el parámetro de mayor estabilidad. Además, se evidencia algo esperado, que la variabilidad de la calidad seminal entre individuos fue característicamente mayor que la variabilidad en un mismo individuo para todos los parámetros seminales estudiados.

También se observó que tanto la variabilidad intra como interindividual fue menor en varones no consumidores regulares de vino, cerveza o café; en varones que practicaban habitualmente ejercicio moderado o ligero, y en varones sometidos a estrés. Sin embargo, en el caso de varones fumadores la variabilidad intraindividual observada fue menor que en los no fumadores. No se observó una variación apreciable con respecto al consumo de licores. En cuanto al sedentarismo (horas de TV, videojuegos, etc.), se correlacionó directamente con una mayor variabilidad en la morfología espermática.

El número de sujetos estudiados y el número total de muestras analizadas fueron comparables al de algunos estudios previos<sup>2-4</sup>, aunque significativamente menor que en otros<sup>5-8</sup>. No obstante, la singularidad del presente estudio fue también la frecuencia y el periodo de obtención de muestras de los sujetos, que aportaron entre 6 y 14 muestras seminales cada uno repartidas durante un periodo de 12 meses, lo cual es novedoso con respecto a los estudios anteriores<sup>2-8</sup>.

Los resultados de este estudio son coherentes con trabajos previos que muestran al recuento espermático como el parámetro seminal con mayor variabilidad intraindividual<sup>2-5,8</sup> y entre individuos<sup>4,5,8</sup>. En nuestro estudio el recuento total y la concentración espermática fueron los parámetros seminales que mostraron el mayor CVi. El CVi para la concentración de espermatozoides fue del 62,6%. Considerando que eran varones sanos voluntarios sin problemas conocidos de fertilidad, observamos que es un dato cercano, aunque ligeramente superior, al CVi del 54,2 y del 56,8% obtenido en pacientes infértiles en el estudio de Keel<sup>5</sup> y en el de Francavilla et al.<sup>6</sup>, respectivamente. Sin embargo, sí es relativamente superior a los CVi encontrados en otros estudios con varones no infértiles: CVi = 39%<sup>2</sup>, CVi = 47%<sup>3</sup>, CVi = 28%<sup>4</sup>, CVi = 45,8%<sup>5</sup> y CVi = 44%<sup>8</sup> o subfértiles: CVi = 29%<sup>7</sup>. El CVe para la concentración espermática en nuestro estudio fue del 214%, comparable al CVe del 187,8 y del 233,5% obtenidos por Keel<sup>5</sup> en pacientes infértiles y donantes, respectivamente. No obstante, no se asemeja al CVe de 56,4% hallado por Álvarez et al.<sup>4</sup>.

Para el volumen de eyaculado, el CVi obtenido fue del 30,1%; aunque ligeramente superior, concuerda con estudios previos<sup>2,5-8</sup>. Schwartz et al.<sup>2</sup> obtuvieron un CVi de 28%, y un CVi de 27% Schrader et al.<sup>8</sup>. Casi 3 décadas más tarde, Keel<sup>5</sup> obtuvo CVi similares, del 25,3 y del 29,6% en donantes y pacientes, respectivamente. Igualmente, Francavilla et al.<sup>6</sup> obtuvieron un CVi del 27,1% en varones sometidos a tratamientos de reproducción asistida. Leushuis et al.<sup>7</sup> presentaron un CVi del 28% en varones de parejas subfértiles. Además, el CVe obtenido en nuestro estudio para el volumen de eyaculado fue del 95%, muy similar al 98,6% mostrado por Keel<sup>5</sup> en pacientes con problemas de infertilidad.

Nuestros resultados indican que el porcentaje de movilidad espermática es el parámetro seminal que muestra la menor variabilidad intraindividual. El CVi obtenido fue del 14,6%, inferior al 26% obtenido en el estudio de Schrader et al.<sup>8</sup> y al obtenido por Álvarez et al.<sup>4</sup>, donde el CVi para el porcentaje de espermatozoides móviles fue

del 20,4%. Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los estudios previos, que sugieren que la movilidad espermática presenta menor CVi que la concentración espermática<sup>4,5,8</sup>, excepto para Leushuis et al.<sup>7</sup>, que encuentran similitud en los CVi en ambos parámetros seminales. El CVe de movilidad espermática obtenido en este estudio fue del 30,1%, el cual coincide con el CVe del estudio de Álvarez et al.<sup>4</sup> (CVe = 29,8%). En cuanto al porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, el CVi de este estudio fue del 41,2%, muy superior a otros estudios, que muestran valores de CVi del 20,9%<sup>4</sup>, CVi del 29%<sup>7</sup> y CVi del 14%<sup>8</sup>. De manera similar, el CVe obtenido del 11,9% también es mucho mayor al CVe del 4,4% observado por otros autores<sup>4</sup>.

Al estudiar la variabilidad en la calidad seminal considerando los hábitos de actividad física y sedentarismo, tabaquismo, consumo de alcohol y café y estrés, los resultados continúan indicando la mayor variabilidad en la concentración y recuento total espermático y la menor en la movilidad espermática. Como cabría esperar, y de forma generalizada, la variabilidad interindividual observada fue superior a la variabilidad intraindividual en todos los parámetros seminales.

Según nuestros resultados, el ejercicio intenso regular aumenta la variabilidad intra e interindividual de la concentración y morfología espermática, al contrario que la práctica de ejercicio moderado y/o ejercicio ligero, que disminuyen la variabilidad de todos los parámetros seminales. El ejercicio moderado-intenso no se asocia con una variabilidad de la calidad seminal intraindividual, sin embargo, aumenta la variabilidad interindividual de la morfología espermática y disminuye la de la movilidad. Nuestros resultados relacionan la actividad física con los parámetros seminales, lo cual es coherente con estudios previos<sup>13-17</sup>. No obstante, hasta donde conocemos, ningún trabajo anterior consideró y estudió la variabilidad de la calidad seminal en sí misma. Por tanto, podríamos hipotetizar que realizar una actividad física ligera o moderada habitualmente podría estar relacionado con una calidad seminal más estable, sin fluctuaciones. Sin embargo, la realización de ejercicio intenso o pasar mucho tiempo viendo la TV podrían considerarse factores influyentes en la

variabilidad en la concentración y la morfología espermática, que son dos de los parámetros seminales con mayor variabilidad en la calidad seminal.

Los resultados de nuestro estudio también muestran una posible relación entre el consumo regular de alcohol y de café y la variabilidad de la calidad seminal en un mismo individuo y entre individuos. Los no consumidores habituales de vino, y más notablemente los no consumidores habituales de cerveza y café, presentan una variabilidad en la calidad seminal menor que los que sí consumían regularmente. Sin embargo, el consumo habitual de licores parece no relacionarse con la variabilidad de la calidad seminal. Distintos estudios previos cuestionan la influencia del consumo de alcohol sobre la fertilidad del varón<sup>20</sup>. No obstante, otros trabajos han mostrado una relación negativa entre el consumo de alcohol y el volumen de eyaculado, la movilidad, la morfología y el recuento espermático<sup>22,23</sup>. Respecto al consumo de café, en la bibliografía previa no está patente que tenga una relación con la calidad seminal de un varón<sup>22,24</sup>. Sin embargo, nuestros resultados sí relacionan la no ingesta habitual de café con una menor variabilidad en los parámetros seminales. Los CVi de los individuos consumidores regulares de café son apreciablemente más altos que los de los no consumidores para el volumen (28,3% vs. 10,7%), la concentración (60,2% vs. 20,0%), la movilidad (14,14% vs. 3,90%), el porcentaje de espermatozoides normales (40,5% vs. 12,2%) y el recuento total espermático (68,4% vs. 27,7%). En los resultados sobre tabaquismo, sin embargo, se incrementa la variabilidad en la calidad seminal de los no fumadores frente a los fumadores, en cuanto a los parámetros de concentración, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y recuento total espermático. No obstante, existe controversia sobre el posible efecto del tabaco sobre la calidad seminal<sup>19</sup>, aunque diversos autores sí han observado una influencia negativa del tabaquismo sobre la fertilidad del varón<sup>21-23</sup>.

Por último, nuestros resultados muestran una mayor variabilidad en la calidad seminal en los individuos no sometidos a estrés habitualmente que en los sometidos a estrés, pero desconocemos por el momento qué mecanismos podrían

estar detrás de estos hallazgos. No obstante, la relación entre los procesos de estrés y la calidad seminal o la infertilidad sigue siendo un tema controvertido y abierto, encontrando resultados a favor y en contra<sup>22,25-27</sup>.

Que sepamos, nuestro estudio es el primero que explora los hábitos de vida en relación con la variabilidad de los parámetros seminales más importantes. En general, los trabajos realizados hasta el momento han estudiado la asociación entre los hábitos de vida y el valor individual de cada parámetro seminal. No obstante, este estudio presenta limitaciones, como por ejemplo las inherentes a un estudio observacional, y por tanto no podemos inferir causalidad. El número de sujetos es relativamente bajo, pero similar a otros estudios publicados previamente. A nivel metodológico no podemos descartar la posible interacción entre distintas variables (tabaquismo, consumo de alcohol, etc.), pero dichos análisis se realizarán en un futuro próximo. Además, tampoco podemos descartar que posibles exposiciones medioambientales u ocupacionales pudieran influir en los resultados observados.

#### **4.5. Conclusión**

Desde un punto de vista clínico, y en coherencia con estudios previos<sup>5,7</sup>, la recomendación de analizar una única muestra seminal nos podría comprometer a un diagnóstico erróneo del potencial fértil de un varón, considerando la importante variabilidad en el recuento y en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en el eyaculado durante un mismo año. Sin embargo, esto no es así para el parámetro de movilidad espermática, el cual es mucho más constante en distintos eyaculados del varón. No obstante, el resultado de un único análisis seminal de un varón podría considerarse más fiable o consistente (a subsiguientes análisis) si este practica regularmente ejercicio moderado o ligero, o no es consumidor habitual de vino, y en mayor medida si no es consumidor habitual de cerveza o café.

#### 4.6. Bibliografía

1. World Health Organization WHO. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed Geneva, Switzerland: *WHO Press* 2010.
2. Schwartz D, Laplanche A, Jouannet P, David G. Within-subject variability of human semen in regard to sperm count, volume, total number of spermatozoa and length of abstinence. *J Reprod Fertil* 1979;57:391-5.
3. Knuth UA, Kuhne J, Bals-Pratsch M, Nieschlag E. Intra-individual variation of sperm velocity, linearity, lateral head displacement and beat frequency in healthy volunteers. *Andrologia* 1988;20:243-8.
4. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003;18:2082-8.
5. Keel BA. Within- and between- subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril* 2006;85:128-34.
6. Francavilla F, Barbonetti A, Necozone S, Santucci R, Cordeschi G, Marcerola B, et al. Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. *Int J Androl* 2007;30:174-81.
7. Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Bossuyt PM, Blanckstein MA, et al. Reproducibility and reliability of repeated semen analyses in male partners of subfertile couples. *Fertil Steril* 2010;94:2631-5.
8. Schrader SM, Turnet TW, Breitenstein MJ, Simon SD. Longitudinal study of semen quality of unexposed workers. I. Study overview. *Reprod Toxicol* 1988;2:183-90.

9. Sauer MV, Zeffer KB, Buster JE, Sokol RZ. Effect of abstinence on sperm motility in normal men. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:604-7.
10. Blackwell JM, Zaneveld LJ. Effect of abstinence on sperm acrosin, hypoosmotic swelling, and other semen variables. *Fertil Steril* 1992;58:798-802.
11. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*. 2004;82:57-65.
12. Pellestor F, Girardet A, Andreo B. Effect of long abstinence periods on human sperm quality. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994;39:278-82.
13. Vaamonde D, da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Barrera N, Vaamonde-Lemon B. Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *Eur J Appl Physiol* 2012;112:3267-73.
14. Gaskins AJ, Mendiola J, Afeiche M, Jorgensen N, Swan SH, Chavarro JE. Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men. *Br J Sports Med* 2015;49: 265-70-L.
15. Gaskins AJ, Afeiche MC, Hauser R, Williams PL, Gillman MW, Tanrikut C, et al. Paternal physical and sedentary activities in relation to semen quality and reproductive outcomes among couples from a fertility center. *Hum Reprod* 2014;29: 2575-82.
16. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: A randomized controlled study. *J Endocrinol* 2009;200:259---71.

17. Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2011;95:1025-30.
18. Mínguez-Alarcón L, Chavarro JE, Mendiola J, Gaskins AJ, Torres-Cantero AM. Physical activity is not related to semen quality in young healthy men. *Fertil Steril* 2014;102:1103-9.
19. Hughes EG, Brennan BG. Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertil Steril* 1996;66:679-89.
20. Jensen TK, Hjollund NH, Henriksen TB, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, et al. Does moderate alcohol consumption affect fertility? Follow up study among couples planning first pregnancy. *BMJ* 1998;317:505-10.
21. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007;22:188-96.
22. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psychological behavioral factors and male semen quality: Systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011;95:116-23.
23. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: Impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:35-40.
24. Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jørgensen N. Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. *Am J Epidemiol* 2010;171:883-91.
25. Giblin PT, Poland ML, Moghissi KS, Ager JW, Olson JM. Effects of stress and characteristic adaptability on semen quality in healthy men. *Fertil Steril*

1988;49:127-32.

26. Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden-Vrtovec H. Psychological factors in male partners of infertile couples: Relationship with semen quality and early miscarriage. *Int J Androl* 2008;31:557-64.
27. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzick D, Overstreet JW, et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* 2010;93:1104-11.
28. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;5: 586-92.

## 5. CAPITULO 2. Determinantes asociados a la variabilidad del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en varones sanos: un estudio de seguimiento

### 5.1. Introducción

Un genoma espermático en buen estado es esencial para la capacidad reproductiva del varón<sup>1</sup>. En la última década, diversos estudios han establecido una relación entre las roturas en la cadena del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los espermatozoides y los problemas de infertilidad masculina<sup>2-6</sup>.

Enfermedades o exposiciones como el cáncer<sup>7</sup>, las radiaciones o la quimioterapia<sup>8,9</sup>, el aumento de la temperatura escrotal<sup>10</sup>, el tabaco<sup>11-15</sup>, la contaminación del aire<sup>16</sup>, o los plaguicidas<sup>17-19</sup>, provocan daño en la estructura de la cromatina espermática<sup>20</sup>. La exposición ambiental a otras sustancias o compuestos como pegamentos, disolventes, siliconas, plásticos o metales, entre otros, se ha relacionado con la infertilidad masculina<sup>21</sup>, aunque no se conoce bien su influencia o posible efecto sobre la fragmentación del ADN espermático. Otros factores estudiados por su posible relación con la fragmentación del ADN espermático son por ejemplo el ejercicio físico<sup>22</sup>, el consumo de alcohol<sup>15,23</sup> o la cafeína<sup>24</sup>. Los hábitos sexuales reflejados en la frecuencia de eyaculación o la abstinencia sexual podrían influir en el índice de fragmentación del ADN espermático<sup>25,26</sup>.

Diversos autores coinciden en que la evaluación de la integridad del ADN espermático se considera un buen indicador de la calidad seminal y de la capacidad reproductiva masculina, y se trata de un estudio complementario de utilidad en la evaluación de los parámetros de recuento, movilidad y morfología espermática<sup>27-30</sup>.

La variabilidad intraindividual en los parámetros seminales tradicionales<sup>31-</sup>  
<sup>35</sup> es bien conocida, pero apenas se ha estudiado con respecto a la fragmentación del ADN espermático. Estudios previos sugieren que la variabilidad del índice de fragmentación de ADN espermático es menor que la de los parámetros seminales tradicionales<sup>36,37</sup>. Otros autores, no obstante, describen una moderada variabilidad del índice de fragmentación de ADN espermático entre varias muestras seminales en varones potencialmente infértiles<sup>38,39</sup>.

Una elevada variación del índice de fragmentación del ADN espermático intraindividual sería relevante para la evaluación clínica del varón, al dificultar el diagnóstico de su capacidad fértil a partir de una única muestra. Además, de existir una variabilidad importante en la medida del daño del ADN espermático sería conveniente conocer qué factores están relacionados con dicha variación. El objetivo de este trabajo es estudiar la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático en una cohorte de varones sanos y analizar los factores o determinantes asociados a dicha variabilidad, incluyendo hábitos de vida y exposiciones ambientales.

## **5.2. Material y Método**

### **5.2.1. Población de estudio**

Se trata de un estudio prospectivo y de seguimiento que se llevó a cabo evaluando muestras seminales procedentes de varones voluntarios y sanos que contactaron o acudían a un centro de reproducción humana ubicado en la ciudad de Murcia (España). Se reclutaron 24 varones (16 por su interés en el programa de donación de semen y 8 sujetos parejas de pacientes de ginecología, no de fertilidad, de la propia clínica), de los cuales se excluyeron 5 (1 por azoospermia y 4 por abandono voluntario del estudio). Finalmente se realizó un seguimiento de la calidad seminal de 19 individuos (18-40 años) durante un periodo de 1 año (2012/13) para

registrar la variabilidad de la integridad del ADN espermático en cada uno. De ellos, 11 tenían fertilidad probada (hijos/as) y 8 no presentaban descendencia, principalmente porque aún no habían considerado la posibilidad de paternidad. Las recogidas de muestras seminales fueron aproximadamente cada 4-6 semanas y los varones cumplimentaron encuestas epidemiológicas sobre datos demográficos, exposiciones medioambientales y hábitos de vida, y se sometieron a una exploración andrológica. Cada participante aportó entre 6 y 14 muestras seminales (un sujeto: 6 muestras; un sujeto: 7 muestras; un sujeto: 12 muestras; un sujeto: 14 muestras, y 15 sujetos: 10 muestras seminales) repartidas durante un periodo de 12 meses. El número total de muestras seminales analizadas fue de 189, de las cuales 46 fueron de donantes y 143 del resto de sujetos. Los participantes fueron recompensados por su participación con una tarjeta regalo de 100 €. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes y la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia aprobó este estudio. Todos los sujetos realizaron un cuestionario inicial que incluyó datos sobre edad, nivel de estudios, ocupación, antecedentes clínicos previos y actuales, desarrollo sexual, estilo de vida, hábitos sexuales y situaciones extraordinarias en los 3 meses anteriores al inicio del estudio. Posteriormente, tras cada obtención de muestra, los varones cumplimentaban encuestas de seguimiento registrando datos de estilos de vida, exposiciones medioambientales y hábitos sexuales durante las 4 semanas previas.

### **5.2.2. Análisis de fragmentación del ADN espermático y exploración física**

Todas las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en un frasco estéril de plástico de boca ancha (Deltalab 150 mL PP B/I) etiquetado y atemperado a temperatura ambiente, en la sala para obtención de muestras del centro de reproducción humana. El tiempo de abstinencia se registró como el número de horas desde la obtención de la muestra hasta la eyaculación anterior. En cada análisis, los sujetos informaban de la frecuencia de eyaculación en los 15 días previos. Las muestras seminales se analizaron siguiendo las directrices de la Organización

Mundial de la Salud<sup>31</sup>. Todas las muestras se atemperaron a 37 ° C y se licuaron dentro de los 30 minutos post-eyacuación. Una vez licuada cada muestra seminal, inmediatamente se congeló una alícuota en criotubos (CryoTube Vials 4,5 mL Thermo Scientific) sin crioprotector a -20 ° C, y posteriormente fueron almacenados en un congelador a -80 ° C hasta su análisis<sup>40</sup>. Se descongelaron las alícuotas con los espermatozoides mediante inmersión 30 s en agua a 37 ° C. En algunos casos, fue necesario, diluir con PBS hasta una concentración de  $5-10 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Inmediatamente tras la descongelación, se procesaron las muestras según el test Halotech Dna (Halosperm) basado en la técnica SCD (Sperm Chromatin Dispersion)<sup>41,42</sup>. Tras el procesamiento de las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (SYBR®Green II RNA Gel Stain, InvitrogenTM, Life Technologies Corporation, Paisley, Reino Unido). El índice de fragmentación se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados. En cada alícuota se estudiaron 300 espermatozoides. La misma bióloga especializada realizó todos los análisis microscópicos (CP-P). En la exploración física se recogieron datos antropométricos y se evaluó el tamaño testicular usando un orquidómetro de Prader (Andrology Australia, Clayton, Victoria, Australia) y la presencia o no de varicocele u otras anomalías escrotales.

### **5.2.3. Análisis estadístico**

Se realizaron análisis descriptivos sobre características demográficas, examen físico y fragmentación del ADN espermático. Se calculó el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de variación intraindividual (CVi) de los datos diferenciado por grupos de interés según variables relativa a hábitos de vida y exposiciones ambientales. Además, se estudió la significación estadística de la diferencia de resultados entre los grupos mediante la prueba de Miller y Feltz<sup>43</sup>. Para distinguir grupos de interés se utilizaron las variables independientes dicotómicas (sí/no): tabaquismo, consumo de vino, cerveza, café, o licores, exposición a tóxicos o contaminantes, estrés, práctica de ejercicio ligero, moderado o intenso y de ejercicio

moderado/intenso conjuntamente. Tabaquismo, consumo de vino, cerveza, licores y café, reflejaban la exposición durante el mes anterior a alguna de estas sustancias. Se registró el número de cigarrillos, número de copas de vino y licores, número de tercios de cerveza, y el número de tazas de café semanales. En cuanto a la exposición a tóxicos o contaminantes se consideró el contacto (al menos 1 hora a la semana) con sustancias tales como metales, plaguicidas, pinturas, disolventes, desengrasantes u otros. Las variables de consumo se separaron por la mediana, y se consideró al sujeto en el grupo del "sí" si registró más de la mitad de las respuestas afirmativas en los cuestionarios de seguimiento (consumidor habitual o regular), excepto para la exposición a tóxicos o contaminantes, en la cual se consideró al sujeto en el grupo del "sí" si había estado en contacto en alguna ocasión durante el periodo de estudio con estas sustancias. En el caso del estrés, se tuvieron en cuenta los acontecimientos personales, familiares, y situaciones difíciles experimentadas durante el mes previo. Se consideró un sujeto sometido a estrés al responder a 2 o más preguntas afirmativamente (de las 8 presentes en el cuestionario)<sup>44</sup> más del 50 % de las veces en dichos cuestionarios (estrés habitual o regular). Con respecto a la actividad física, se expresó en 3 niveles: intensa (ejercicio extremo que es muy fatigoso o sudoroso), moderada (ejercicio que produce cierta fatiga y sudoración), y ligera (que no produce mucha fatiga o sudoración), midiendo las horas semanales para cada nivel de intensidad, durante el último mes. Igualmente, se consideró que un sujeto realizaba o no un tipo de ejercicio concreto si respondió afirmativamente a más del 50 % de las veces durante el seguimiento (ejercicio habitual o regular). Las actividades sedentarias se registraron según el número medio de horas semanales que el sujeto permanecía sentado (viendo la TV, vídeo o DVD, frente al ordenador, conduciendo, etc.) durante el último mes. Se estudió la frecuencia de eyaculación considerando el número de eyaculaciones en los 15 días previos y el tiempo de abstinencia sexual previo a la recogida de la muestra seminal registrado en número de horas. Las relaciones existentes entre variables continuas se analizaron mediante la correlación de Spearman. Todas las pruebas fueron de 2 colas y el nivel de significación estadística se fijó en 0,05. Para la realización de los análisis

estadísticos se empleó el paquete estadístico SPSS 21.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE. UU.).

### 5.3. Resultados

En la Tabla 1 observamos el resultado de los CV y CVi para el índice de fragmentación del ADN espermático en relación con los distintos hábitos de vida (tabaquismo, consumo de alcohol, consumo de café, exposición a tóxicos o contaminantes, estrés y ejercicio físico). Los CV difieren significativamente para todas las variables estudiadas, a excepción de la exposición a tóxicos ambientales. Por otro lado, los individuos que realizan ejercicio intenso o moderado-intenso y los individuos expuestos a tóxicos o contaminantes presentan los CVi más bajos (34,1 %; 34,5 % y 37,5 % respectivamente), mientras que los fumadores, o consumidores habituales de cerveza o licores mostraron mayores CVi. Los consumidores de vino o café, o sometidos a estrés, expuestos a tóxicos, que practican ejercicio intenso o moderado-intenso mostraron significativamente menores CVi que los que no presentaban ninguna de estas características. En general, hubo diferencias significativas en el CVi entre ambos grupos de sujetos para todas las variables estudiadas, excepto para la práctica de ejercicio ligero.

La Tabla 2 muestra la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y las características sexuales y hábitos sedentarios de los sujetos. Los resultados no mostraron una correlación significativa ( $p$ -valor = 0,08 y 0,77) al comparar con la abstinencia sexual y la frecuencia de eyaculación, respectivamente. Sin embargo, en relación a los hábitos sedentarios, los resultados mostraron un coeficiente de correlación significativo ( $p$ -valor = 0,05), mostrando una relación positiva entre el número de horas viendo TV, etc. y el índice de fragmentación del ADN espermático.

**Tabla 1.** Coeficiente de variación (CV) y CV intraindividual (CVi) del índice de fragmentación de ADN espermático relacionado con las distintas características o hábitos de vida.

| <u>Variables</u>                       |    | <u>CV</u> | <u>p-valor</u> | <u>CVi</u> | <u>p-valor</u> |
|----------------------------------------|----|-----------|----------------|------------|----------------|
| Tabaquismo                             | SÍ | 47,56 %   | < 0,001        | 50,56 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 53,43 %   |                | 42,73 %    |                |
| Consumo de vino                        | SÍ | 47,41 %   | < 0,001        | 44,11 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 52,83 %   |                | 49,04 %    |                |
| Consumo de café                        | SÍ | 50,28 %   | < 0,001        | 44,18 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 52,81 %   |                | 53,95 %    |                |
| Consumo de cerveza                     | SÍ | 49,57 %   | < 0,001        | 47,56 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 52,71 %   |                | 45,06 %    |                |
| Consumo de licores                     | SÍ | 46,14 %   | < 0,001        | 49,02 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 52,78 %   |                | 45,50 %    |                |
| Exposición a tóxicos o contaminantes   | SÍ | 50,90 %   | 0,34           | 37,51 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 51,27 %   |                | 52,84 %    |                |
| Estrés                                 | SÍ | 44,67 %   | < 0,001        | 41,39 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 51,43 %   |                | 51,60 %    |                |
| Práctica de ejercicio intenso          | SÍ | 50,59 %   | 0,01           | 34,14 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 52,21 %   |                | 51,37 %    |                |
| Práctica de ejercicio moderado         | SÍ | 49,23 %   | < 0,001        | 43,87 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 55,87 %   |                | 48,18 %    |                |
| Práctica de ejercicio ligero           | SÍ | 53,75 %   | < 0,001        | 47,79 %    | 0,08           |
|                                        | NO | 51,86 %   |                | 47,01 %    |                |
| Práctica de ejercicio moderado-intenso | SÍ | 50,42 %   | < 0,001        | 34,54 %    | < 0,001        |
|                                        | NO | 53,92 %   |                | 52,84 %    |                |

**Tabla 2.** Correlación entre hábitos sexuales y sedentarios y el índice de fragmentación del ADN espermático.

| <u>Variable</u>           | <u>Índice de fragmentación del ADN espermático</u> |                |
|---------------------------|----------------------------------------------------|----------------|
|                           | <u>r</u>                                           | <u>p-valor</u> |
| Frecuencia de eyaculación | 0,025                                              | 0,77           |
| Tiempo de abstinencia     | -0,132                                             | 0,08           |
| Hábitos sedentarios       | 0,151                                              | 0,05           |

#### 5.4. Discusión

Hasta donde conocemos este es el primer trabajo de seguimiento realizado en el sur de Europa para estudiar la variabilidad de la fragmentación del ADN espermático en varones sanos, y el primero que estudia su relación con sus hábitos de vida y exposiciones ambientales. Los resultados de nuestro estudio son consistentes con estudios previos que muestran una variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático superior al 30 %<sup>38,39</sup> y por tanto, equiparable a la variabilidad intraindividual existente en los parámetros seminales tradicionales<sup>32-35</sup>, lo cual contradice a otros autores que consideran la medición del índice de fragmentación del ADN espermático más estable que otros parámetros seminales, como movilidad, concentración, etc.<sup>36,37</sup>.

Hasta donde conocemos, son escasos los estudios que han relacionado los hábitos de vida con el índice de fragmentación del ADN espermático. Por ejemplo, un estudio experimental realizado en ratones macho mostró que la realización de ejercicio combinado con dieta disminuía el daño al ADN espermático<sup>22</sup>. En estudios observacionales, algunos autores han relacionado un mayor índice de fragmentación del ADN espermático con el tabaquismo<sup>11-15</sup>, con el aumento de la temperatura escrotal<sup>10</sup> o con la exposición a plaquicidas<sup>17-19</sup>. Los hallazgos conocidos sobre la relación entre el consumo de alcohol y los problemas de infertilidad masculinos son todavía poco concluyentes<sup>23</sup>. Se ha mostrado que el alcohol causa un aumento del estrés oxidativo, y esto a su vez podría afectar a los parámetros seminales, pero todavía no se conocen bien los mecanismos relacionados con este proceso<sup>15,23</sup>. Sin embargo, el consumo de cafeína sí se ha asociado con índices relativamente menores de fragmentación del ADN espermático<sup>24</sup>.

En nuestro estudio se observó que los CV del índice de fragmentación del ADN espermático fueron significativamente distintos para todas las variables estudiadas, a excepción de la exposición a tóxicos ambientales (similar CV) y el ejercicio físico ligero (similar CVi). Con respecto a las exposiciones ambientales a tóxicos, cabe señalar que existe un número muy bajo de dichas exposiciones entre los varones participantes, lo cual

podría influir en gran manera en la ausencia de significación estadística en esta variable, por lo que dicho resultado debe ser tomado con cautela. Con referencia al ejercicio físico ligero, podríamos argumentar que la realización o no de este tipo de ejercicio no es determinante para la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático en los varones, y es concordante con resultados similares publicados con respecto a los parámetros seminales convencionales (concentración, movilidad, etc.)<sup>45</sup>.

Respecto a la influencia de otros factores en el índice de fragmentación del ADN espermático, como los hábitos sexuales, los resultados no mostraron una correlación significativa. No obstante, estudios previos indican que un aumento en la frecuencia de eyaculación (cada 24 horas) y un menor tiempo de abstinencia sexual (entre 3 y 24 horas) podrían disminuir el nivel de fragmentación de ADN espermático<sup>25,26</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio, el número de horas de sedentarismo sí se relacionó positiva y significativamente con el índice de fragmentación del ADN espermático.

Hasta donde conocemos, ningún trabajo anterior ha estudiado la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático en relación con los hábitos de vida y exposiciones ambientales. Los resultados obtenidos permiten establecer una primera asociación entre dichos factores y la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático, y son consistentes con los resultados obtenidos en otro estudio previo, que muestra la existencia de una relación entre los hábitos de vida y la variabilidad de los parámetros seminales convencionales<sup>35</sup>.

No obstante, no podemos descartar totalmente que otros factores o la combinación de varios, pudieran estar influyendo en la variabilidad de dicho parámetro. Las limitaciones del presente estudio también son las inherentes a cualquier estudio observacional, con lo cual no se puede inferir causalidad de los resultados obtenidos. Un sesgo de información (recuerdo) podría existir *a priori*, pero el periodo sobre el que se preguntaba eran unas pocas semanas atrás y los participantes desconocían qué relaciones se iban a investigar con respecto a sus hábitos de vida o exposiciones ambientales. Además, cabría señalar que no se midieron biomarcadores de estrés fisiológico o del

estatus antioxidante, así como la diferenciación entre ejercicio aeróbico y anaeróbico. Son parámetros que recomendamos encarecidamente investigar en futuros estudios. De esta forma, hacemos hincapié en que nuestros resultados deben ser tratados con cautela y la necesidad de nuevos estudios (incluyendo parámetros analíticos) que confirmen estos hallazgos.

## 5.5. Conclusión

El índice de fragmentación del ADN espermático presenta una considerable variabilidad (CV e CVi), que coincide con hallazgos encontrados en estudios previos<sup>38,39</sup>. Desde un punto de vista clínico, un único análisis de fragmentación del DNA espermático podría ser poco fiable para determinar el diagnóstico de fertilidad o infertilidad, al igual que ocurre con el análisis de los parámetros seminales tradicionales<sup>33,35</sup>. No obstante, serían conveniente realizar más estudios sobre la asociación entre los hábitos de vida y la fragmentación del ADN espermático, especialmente con el fin de esclarecer una posible relación con la actividad física o la exposición a tóxicos y contaminantes ambientales. En definitiva, este estudio muestra que determinados factores o características del varón podrían estar relacionadas con una mayor o menor variabilidad de su índice de fragmentación de ADN espermático.

## 5.6. Bibliografía

1. Spanò M, Bonde JP, Hjollund HI, et ál. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Ferti. Steril* 2000; 73:43-50.
2. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, et ál. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8:11-29.

3. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:466-72.
4. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;14:746-57.
5. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful?. Pros and cons. *J Androl* 2009; 30:219-29.
6. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93:1027-36.
7. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, et ál. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008; 23:1044-52.
8. Fosså SD, De Angelis P, Kraggerud SM, et ál. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* 1997; 30:192-6.
9. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25:255-61.
10. Zhang MH, Shi ZD, Yu JC, et ál. Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-specific proteinases 3 changes in fertile men. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32:747-55.
11. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, et ál. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423:103-11.
12. Vilorio T, Garrido N, Fernández JL, et ál. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril* 2007; 88(2):523-5.
13. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, et ál. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; 223(1-2):54-60.

14. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, et ál. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* 2012; 80(4):822-5.
15. Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, et ál. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 290(4):777-82.
16. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, et ál. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005; 20:2776-83.
17. Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B, et ál. The effect of environmental exposure to pyrethroids and DNA damage in human sperm. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61(1):37-43.
18. Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, et ál. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196:108-13.
19. Jamal F, Haque QS, Singh S, Rastogi S. The influence of organophosphosphate and carbamate on sperm chromatin and reproductive hormones among pesticide sprayers. *Toxicol. Ind Health* 2015. 29. pii: 0748233714568175.
20. O'Flaherty C. Iatrogenic genetic damage of spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 2014; 791:117-35.
21. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, et ál. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(6):842-50.
22. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, et ál. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(7):768-80.

23. Koch OR, Pani G, Borrello S, et ál. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 2004; 25(1-2):191-8.
24. Belloc S, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, et ál. Caffeine intake and sperm parameters. Analysis of a cohort of 4474 consecutive semen samples. *Fertil Steril* 2013; 100(3):S212.
25. Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, et ál. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011; 96:1083-6.
26. Sánchez-Martín P, Sánchez-Martín F, González-Martínez M, Gosálvez J. Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst Biol Reprod Med* 2013; 59:256-60.
27. Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, et ál. Evaluation of the quality of the human spermatozoon: comparison between spermatid DNA integrity and semen variables. *Invest Clin* 2010; 51:87-99.
28. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et ál. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod* 2007;22:174–9.
29. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et ál. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010; 33:e221-7.
30. Evgeni E, Lymberopoulos G, Gazouli M, Asimakopoulos B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2015; 188:17-23.
31. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and

Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization; 2010.

32. Álvarez C, Castilla JA, Martínez L, et ál. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum. Reprod* 2003; 18:2082-8.
33. Keel BA. Within and between subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril* 2006; 85:128-34.
34. Francavilla F, Barbonetti A, Necozone S, et ál. Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. *Int J Androl* 2007; 30:174-81.
35. Pérez-Palazón C, López-Espín JJ, Mendiola J, et ál. Factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal: un estudio de seguimiento. *Rev Int Androl* 2016;14(1):1-7. Datos actualizados.
36. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, et ál. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991; 5:115-25.
37. Smit M, Dohle GR, Hop WC, et ál. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int J Androl* 2007; 30:48-55.
38. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, et ál. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod* 2006; 21:2061-4.
39. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples. *Hum Reprod* 2011; 26:3244-8.
40. Sarabia-Cos L, Arenal-Gonzalo JJ, Mínguez-Alarcón L, et ál. Estudio de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en jóvenes varones.

*Rev Int Androl* 2015;13(1):1-7.

41. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, et ál. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24:59-66.
42. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, et ál. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84:833-42.
43. Martín Andrés A, Luna del Castillo JD. Bioestadística para las ciencias de la salud. Madrid: A. Capitel Editores 2004.
44. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, et ál. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* 2010; 93:1104-11.
45. Mínguez-Alarcón L, Chavarro JE, Mendiola J, et ál. Physical activity is not related to semen quality in young healthy men. *Fertil Steril* 2014.

## **6. CAPÍTULO 3. Relación entre la distancia anogenital y la variabilidad de la calidad seminal.**

### **6.1. Introducción**

La distancia anogenital (AGD), distancia entre el ano y los genitales, es un dimorfismo sexual en mamíferos placentarios y es alrededor del doble en machos que en hembras<sup>1</sup>. Esta distancia se ha asociado recientemente con alteraciones reproductivas e infertilidad masculina<sup>2</sup>. Estudios en animales<sup>3</sup> y humanos<sup>4-8</sup> han relacionado una AGD acortada con la presencia de patologías o anomalías reproductivas, como criptorquidia<sup>3,7</sup>, hipospadias<sup>3,8,9</sup>, bajo nivel de testosterona sérica<sup>6</sup>, disminución en el tamaño testicular<sup>6</sup>, disminución en la longitud del pene<sup>6,8</sup>, peor calidad seminal<sup>2,4,6</sup> y azoospermia no obstructiva<sup>5</sup>.

La producción de espermatozoides en el testículo es un proceso complejo que requiere una completa sucesión de fenómenos celulares y hormonales que se inician tempranamente en las primeras semanas del desarrollo fetal<sup>10</sup>. Diversos estudios en animales<sup>11</sup> y humanos<sup>6,7,12</sup> han mostrado que la AGD es un marcador fiable de la acción de andrógenos durante la formación del sistema reproductivo masculino. Por lo tanto, podría ser usada como un biomarcador útil del desarrollo y función gonadal normal, incluyendo calidad seminal, en el varón adulto<sup>2,4,6-13</sup>.

Sin embargo, la calidad seminal en un individuo no es constante a lo largo del tiempo<sup>14-20</sup>. El recuento espermático es el parámetro con mayor variabilidad intraindividual<sup>15-17,20</sup>, mientras que la movilidad espermática parece ser el parámetro más estable en medidas repetidas en el mismo individuo<sup>20</sup>. Los factores que interfieren con la variabilidad de la calidad seminal son aún parcialmente desconocidos. Hasta ahora, algunos hábitos de vida (actividad física, consumo de ciertos alimentos, etc.) se han asociado con la variabilidad de los parámetros seminales<sup>20</sup>. No obstante, cabría la posibilidad de que la mayor o menor variabilidad de la calidad seminal pudiera estar

relacionada también con factores prenatales. En este caso, se podría hipotetizar que la variabilidad intraindividual sería diferente en función del ambiente hormonal al que los individuos han estado expuestos durante su desarrollo prenatal. El objetivo de este estudio es analizar la relación entre la AGD y los parámetros seminales y su variabilidad.

## **6.2. Material y método**

### **6.2.1. Población de estudio**

Este estudio prospectivo de seguimiento fue realizado para evaluar la variabilidad de las muestras de semen procedentes de varones voluntarios sanos. Un total de 24 sujetos fueron invitados a participar en este estudio. De entre ellos, 16 eran candidatos a participar en el programa de donación de semen, y 8 eran parejas de pacientes de ginecología. Un individuo tuvo que ser excluido (1 azoospermia), y 4 varones abandonaron el estudio. Finalmente se realizó un seguimiento de la calidad seminal de 19 individuos (18-40 años) durante un periodo de un año. Cada 4 semanas los sujetos obtuvieron una muestra de semen, cumplieron un cuestionario sobre hábitos de vida durante las semanas previas, y se sometieron a una exploración andrológica.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes y la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia aprobó este estudio (no. 495/2010 aprobado 14 mayo 2010). Los participantes fueron recompensados por su participación con una tarjeta regalo de 100€.

### **6.2.2. Análisis seminal**

Todas las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en un frasco estéril de plástico de boca ancha (Deltalab 150 ml PP B/I) etiquetado y atemperado a temperatura ambiente, en la sala para obtención de muestras del centro de reproducción Humana. El tiempo de abstinencia se registró como el número de horas desde la

obtención de la muestra hasta la eyaculación anterior. En cada análisis, los sujetos informaban de la frecuencia de eyaculación en los 15 días previos. Todas las muestras seminales se analizaron siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud<sup>14</sup>. El volumen seminal se estimó por peso de la muestra, suponiendo una densidad de espermatozoides de 1,0 g / ml. Para la evaluación de la motilidad, los espermatozoides fueron clasificados como progresivos rápidos y no progresivos<sup>14</sup> para determinar el porcentaje de espermatozoides móviles. Brevemente, 10 microlitros de semen bien mezclados se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio que se había mantenido a 37°C y se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm e inmediatamente se examinó con un aumento de x400. La concentración espermática se evaluó utilizando un hemocitómetro (Improved Neubauer; Hauser Scientific Inc., Horsham, PA, EE.UU.). Las muestras fueron diluidas en una solución de 0,6 M de NaHCO<sub>3</sub> y 0,4 % (v/v) de formaldehído en agua destilada y se evaluaron al menos 200 espermatozoides en 2 réplicas. También se calculó el recuento total de espermatozoides (volumen x concentración de espermatozoides). Se realizaron frotis para la morfología espermática con secado al aire, fijación, y tinción Diff-Quik y se evaluó mediante los criterios estrictos de Kruger<sup>21</sup>. La misma bióloga especializada realizó todos los análisis seminales (C.P-P.).

### **6.2.3. Análisis de fragmentación del ácido desoxiribonucleico (ADN)**

Una vez licuefactada cada muestra seminal, una alícuota fue criopreservada en criotubos (4.5 ml Vials CryoTube Thermo Scientific) sin crioprotector -20 ° C<sup>22</sup> y después fueron almacenadas en un congelador a -80 ° C hasta el análisis. Las alícuotas con los espermatozoides fueron descongeladas por inmersión en agua 30 s a 37° C. En algunos casos, fue necesario, diluir con PBS hasta una concentración de 5-10 millones de espermatozoides por mililitro. Inmediatamente después de la descongelación, las muestras fueron procesadas según el test Halotech Dna (Halosperm) basado en la SCD (Sperm Chromatin Dispersion)<sup>23,24</sup>. Tras el procedimiento técnico, las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia (II RNA Gel SYBR®Green stain, Invitrogen™, Life Technologies Corporation, Paisley, UK). El índice de fragmentación fue definido como el porcentaje de espermatozoides con AND fragmentado sobre el total de

espermatozoides analizados. Fueron estudiados 300 espermatozoides en cada alícuota. La misma bióloga especializada realizó todos los análisis microscópicos (C.P-P.).

#### **6.2.4. Exploración física**

El mismo examinador (JM) midió la AGD, la altura y el peso, y evaluó la presencia de varicocele u otras anomalías. El tamaño testicular fue estimado a través de un orquidómetro de Prader (Andrología Australia, Clayton, Victoria, Australia). El procedimiento de medición de la AGD ha sido descrito<sup>25</sup>. De manera que se midieron dos variantes de AGD (Figura 1): a) desde la inserción anterior del pene al centro del ano ( $AGD_{AP}$ ), y b) desde la base posterior (primer pliegue) del escroto al ano ( $AGD_{AS}$ ), usando un pie de rey digital de acero inoxidable (VWR International, LLC, West Chester, PA, EE.UU.) y mientras el varón estaba en posición de litotomía, con los muslos en un ángulo de 45 ° respecto a la mesa de examen. Para mejorar la precisión, el examinador hizo cada una de estas mediciones dos veces, y la media de ambas se utilizó como la estimación. Ambas AGD presentaron una alta correlación (Prueba de correlación de Spearman, coeficiente=1,00,  $p<0.05$ ).



**Figura 1.** Mediciones de distancia anogenital. AGD<sub>AP</sub>: desde la base anterior del pene hasta el borde superior del ano. AGD<sub>AS</sub>: desde el aspecto posterior (primer pliegue) del escroto hasta el borde superior del ano. (Reproducido con permiso de los autores).

#### **6.2.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico tuvo cuatro partes. En primer lugar, el análisis descriptivo se realizó para determinar las características de los participantes. En segundo lugar, el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de variación intraindividual (CVi) de cada parámetro seminal (volumen seminal, concentración espermática, movilidad espermática PR+NP, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, el recuento total de espermatozoides y la fragmentación de ADN) fueron calculados sobre las muestras agrupadas según AGD más larga o más corta que la mediana de las AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub>. El CV es el coeficiente de variación estándar definido como el ratio de la desviación estándar hasta la media y el CVi es la media del coeficiente de variación dentro de cada grupo. El

test de Feltz and Miller<sup>26</sup> se utilizó para determinar la diferencia entre ambos coeficientes (CV y CVi) en cada grupo.

En tercer lugar, se utilizó el modelo lineal generalizado (GLM) para medidas repetidas para analizar las diferencias a través del tiempo en los parámetros seminales, como variables dependientes, entre los varones con AGDs más alargada y acortada que la mediana, como variable independiente. El procedimiento GLM de medidas repetidas consiste en un análisis de varianza cuando se toman las mismas medidas varias veces para cada sujeto o caso. Las covariables usadas fueron el tiempo de abstinencia e índice de masa corporal (IMC), y para la movilidad espermática además se ajustó por el tiempo hasta el inicio del análisis. En todos los casos, se utilizó el Test de Mauchly para Esfericidad como parte del procedimiento de medidas repetidas GLM. El test multivariable usado para medir las diferencias a lo largo del tiempo fue el test Traza de Pillai (lambda de Wilks, traza de Hotelling, raíz máxima de Roy)<sup>27</sup>.

En cuarto lugar, se utilizaron modelos mixtos<sup>28</sup> (modelos con datos panel de efectos fijos) para estudiar la relación entre  $AGD_{AP}$  y  $AGD_{AS}$  con cada uno de los parámetros seminales ajustados por covariables importantes. Los modelos mixtos son una extensión de los modelos de regresión. Un modelo de efectos mixtos tiene ambos, efectos aleatorios y efectos fijos, mientras que un modelo de regresión lineal estándar tiene únicamente efectos fijos. Los modelos obtenidos por el procedimiento se compararon utilizando los criterios del parámetro de Akaike (AIC) utilizados para determinar la prueba de bondad de ajuste. Los valores bajos indicaron un mejor ajuste del modelo. Se usaron modelos mixtos para estudiar por separado la relación entre  $AGD_{AP}$  (ajustado por IMC) y  $AGD_{AS}$  (ajustado por IMC) con cada parámetro seminal teniendo en cuenta covariables relevantes. En cada modelo, el parámetro de semen era la variable dependiente y AGD era la variable independiente. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS v.18.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE. UU.).

### 6.3. Resultados y discusión

Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que aborda la asociación entre las mediciones de AGD y los parámetros seminales en un estudio de seguimiento. Este estudio incluyó un total de 16 individuos con al menos diez muestras de semen en el análisis por individuo. Hubo 8 sujetos en cada grupo de AGD acortada y alargada desde el ano hasta la base posterior del escroto (AGD<sub>AS</sub>) y de la inserción cefálica del pene (AGD<sub>AP</sub>). La edad media (desviación típica -DT-) en AGD<sub>AP</sub> acortada y alargada fue de 27.3 (4.7) años y 30.8 (7.3) años, respectivamente, y en AGD<sub>AS</sub> acortada y alargada fue de 26.4 (5.4) años y 31.6 (6.1) años. El promedio (DT) del IMC en AGD<sub>AP</sub> acortada y alargada fue de 24.1 (2.3) Kg / m<sup>2</sup> y 26.5 (2.7) Kg / m<sup>2</sup>, respectivamente, y en AGD<sub>AS</sub> acortada y alargada fue de 24.2 (2.3) Kg / m<sup>2</sup> y 26.4 (2.8) kg/m<sup>2</sup>. El IMC se correlacionó con la AGD<sub>AP</sub> (Test de Correlación de Pearson, coeficiente=0.704,  $p=0.002$ ) y mostró una asociación casi estadísticamente significativa con la AGD<sub>AS</sub> (Test de Correlación de Pearson, coeficiente=0.486,  $p=0.057$ ). Las características de los participantes se muestran en la Tabla 1.

| <b>Tabla 1.</b> Características de los participantes.                                                                                                                                                                |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <u>Variable</u>                                                                                                                                                                                                      | <u>Total (n=16)</u> |
| Edad (años)                                                                                                                                                                                                          | 29.0 (6.2)          |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )                                                                                                                                                                                             | 25.3 (2.8)          |
| Estado de fertilidad, n (%)                                                                                                                                                                                          |                     |
| Si                                                                                                                                                                                                                   | 14 (87.5)           |
| No                                                                                                                                                                                                                   | 2 (12.5)            |
| AGD <sub>AP</sub> (mm)                                                                                                                                                                                               | 121.4 (18.8)        |
| AGD <sub>AS</sub> (mm)                                                                                                                                                                                               | 51.8 (28.2)         |
| Tiempo de abstinencia (horas)                                                                                                                                                                                        | 72.9 (44.1)         |
| <u>Parámetros seminales</u>                                                                                                                                                                                          |                     |
| Volumen seminal (ml)                                                                                                                                                                                                 | 3.4 (1.3)           |
| Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml)                                                                                                                                                                      | 35.2 (28.7)         |
| Movilidad progresiva y no progresiva (%)                                                                                                                                                                             | 69.3 (10.4)         |
| Morfología espermática (%)                                                                                                                                                                                           | 20.3 (9.6)          |
| Recuento total espermático (10 <sup>6</sup> )                                                                                                                                                                        | 115.0 (99.6)        |
| Fragmentación ADN espermático (%)                                                                                                                                                                                    | 36.3 (19.0)         |
| <i>Nota:</i>                                                                                                                                                                                                         |                     |
| Las variables continuas se muestran como media y desviación típica entre paréntesis.                                                                                                                                 |                     |
| IMC: índice de masa corporal; AGD <sub>AP</sub> : distancia anogenital desde el ano hasta la inserción cefálica del pene; AGD <sub>AS</sub> : distancia anogenital desde el ano hasta la base posterior del escroto. |                     |
| Esta tabla resume un análisis descriptivo de las características de los participantes incluidos en el estudio.                                                                                                       |                     |

Evaluamos la variabilidad de los parámetros seminales en relación con la AGD como se resume en la Figura 2 (AGD<sub>AP</sub>) y Figura 3 (AGD<sub>AS</sub>). La movilidad progresiva y no progresiva mostró el CV general más bajo con la AGD alargada (AGD<sub>AP</sub>:14.13%, p-valor>0.001; AGD<sub>AS</sub>: 17.12%, p-valor>0.001), seguido por el volúmen (AGD<sub>AP</sub>: 34.58, p-valor>0.001; AGD<sub>AS</sub>: 37.49%, p-valor>0.001), morfología normal (AGD<sub>AP</sub>:37.01%, p-valor>0.001; AGD<sub>AS</sub>: 41.38%, p-valor>0.001), concentración (AGD<sub>AP</sub>: 34.58%, p-valor < 0.001), recuento espermático total (AGD<sub>AP</sub>: 77.26%, p-valor < 0.001); mientras que la AGD acortada lo mostró con el porcentaje de fragmentación de ADN espermático (AGD<sub>AP</sub>: 47.33%, p-valor < 0.001; AGD<sub>AS</sub>: 48.59%, p-valor < 0.001). La concentración espermática y el recuento total de espermatozoides no se relacionaron con la AGD<sub>AS</sub> (p-valor = 0.37 and 0.25, respectivamente) (Tabla 2).

Los varones con AGD<sub>AS</sub> por encima de la mediana tenían significativamente menor coeficiente de variación (CV) que los varones por debajo de la mediana para todos los parámetros seminales excepto la fragmentación de ADN espermático. Los varones con una AGD<sub>AP</sub> alargada presentaban un significativo menor CV en el volúmen seminal, la movilidad total (PR+NP), y la morfología espermática que aquellos con una AGD<sub>AP</sub> acortada. La fragmentación del ADN se relacionó con una menor variabilidad en la AGD acortada. No obstante, como no se conocen bien los factores que pueden influir en la variabilidad de la fragmentación del ADN, no podríamos descartar la posibilidad de una confusión residual en nuestros hallazgos.

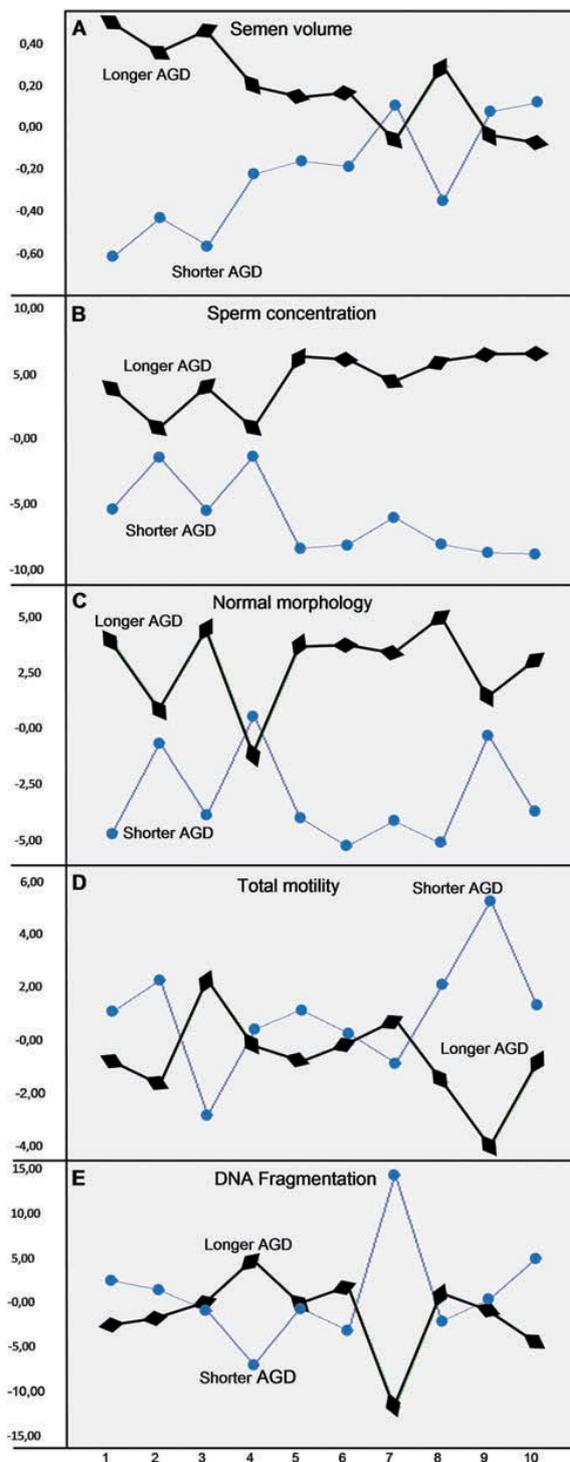
**Tabla 2.** Coeficiente de variación general (CV) de cada parámetro de semen en relación con mediciones de AGD alargadas y acortadas.

| <u>Parámetros seminales</u>          | <u>AGD<sub>AP</sub></u> |              |                | <u>AGD<sub>AS</sub></u> |              |                |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------|--------------|----------------|
|                                      | <u>Larga</u>            | <u>Corta</u> | <u>p-valor</u> | <u>Larga</u>            | <u>Corta</u> | <u>p-valor</u> |
| Volúmen seminal                      | 34.58%                  | 45.30%       | <0.001         | 37.49%                  | 39.90%       | <0.001         |
| Concentración espermática            | 72.24%                  | 96.17%       | <0.001         | 83.65%                  | 83.95%       | 0.37           |
| Movilidad progresiva y no progresiva | 14.13%                  | 23.27%       | <0.001         | 17.12%                  | 19.61%       | <0.001         |
| Morfología normal espermática        | 37.01%                  | 63.63%       | <0.001         | 41.38%                  | 58.30%       | <0.001         |
| Recuento total espermático           | 77.26%                  | 101.79%      | <0.001         | 89.40%                  | 88.75%       | 0.25           |
| Fragmentación ADN espermático (%)    | 53.36%                  | 47.33%       | <0.001         | 52.82%                  | 48.59%       | <0.001         |

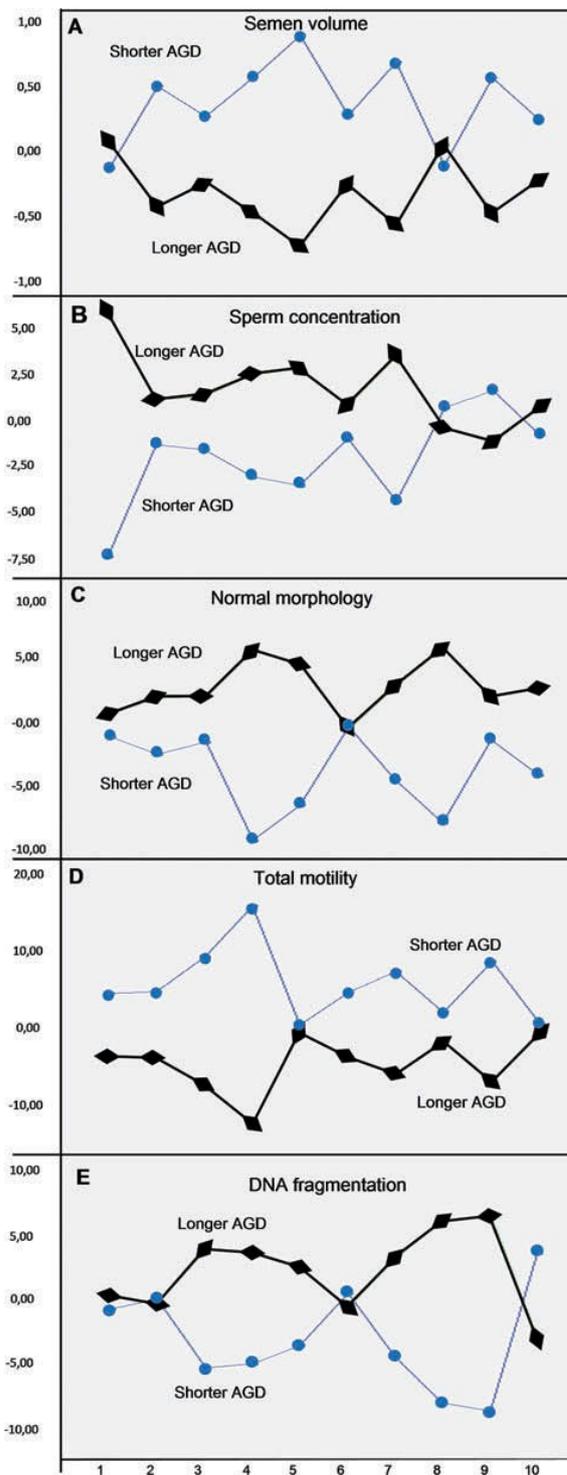
**Nota:**

AGD<sub>AP</sub>: distancia anogenital desde el ano hasta la inserción cefálica del pene; AGD<sub>AS</sub>: distancia anogenital desde el ano hasta la base posterior del escroto.

Esta tabla muestra la evaluación de la variabilidad de los parámetros del semen en relación con la AGD dividida por la mediana.



**Figura 2.** Parámetros del semen agrupados por hombres con AGD<sub>AP</sub> alargada y acortada. Volumen seminal (A), concentración de espermatozoides (B), morfología normal (C), motilidad total (D) y fragmentación del ADN (E). El eje X representa el número de muestra durante el estudio de un año, el eje Y representa la medida AGD estandarizada. La forma de diamante representa la AGD<sub>AP</sub> alargada y la forma del círculo la AGD<sub>AP</sub> acortada. Los gráficos muestran las medias marginales estimadas para los parámetros seminales ajustados por el índice de masa corporal, la duración de la abstinencia y la movilidad de los espermatozoides, ajustada adicionalmente por el tiempo hasta el análisis de semen.



**Figura 3.** Parámetros de semen agrupados por hombres con AGD<sub>AS</sub> alargada y acortada. Volumen seminal (A), concentración de espermatozoides (B), morfología normal (C), motilidad total (D) y fragmentación del ADN (E). El eje X representa el número de muestra durante el estudio de un año, el eje Y representa la medida AGD estandarizada. La forma del diamante representa la AGD<sub>AS</sub> alargada y la forma del círculo la AGD<sub>AS</sub> acortada. Los gráficos muestran las medias marginales estimadas para los parámetros seminales ajustados por el índice de masa corporal, la duración de la abstinencia y la movilidad de los espermatozoides, ajustada adicionalmente por el tiempo hasta el análisis de semen.

Cuando buscamos evaluar la utilidad de la AGD para determinar la variabilidad intraindividual en los parámetros espermáticos, encontramos que el volumen seminal mostró el CVi más bajo con una AGD<sub>AP</sub> alargada (28.28%, valor de  $p = 0.015$ ), seguido de una morfología normal (35.47%, valor  $p = 0.01$ ), concentración espermática (56.52%, valor  $p = 0.05$ ) y recuento total de espermatozoides (66.74%, valor  $p = 0.03$ ), y una AGD<sub>AS</sub> acortada con motilidad progresiva y no progresiva (12.83%, valor  $p = 0.01$ ). No se identificaron otras asociaciones con AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub> (valores de  $p > 0.05$ ). Los varones con AGD<sub>AP</sub> acortada presentaron una mayor variabilidad en todos los parámetros seminales, excepto en la fragmentación del ADN, aunque sólo la concentración, el recuento total y la morfología de los espermatozoides fueron estadísticamente significativos. Por el contrario, los hombres con AGD<sub>AS</sub> acortada presentaron una menor variabilidad en la motilidad espermática que los de AGD<sub>AS</sub> alargadas (Tabla 3). Por lo tanto, el volumen seminal, la concentración, el recuento total y la morfología espermática fueron más variables a lo largo del tiempo en los hombres con una AGD acortada comparado con hombres con una AGD alargada. Ya se sabía que con respecto a la variabilidad intra-sujeto, la concentración de espermatozoides, el recuento total de espermatozoides y la morfología espermática son los parámetros menos estables<sup>20</sup>. Nuestro estudio aporta que esos tres parámetros tienen una mayor variabilidad en los hombres con una AGD acortada. Sin embargo, hemos observado que una AGD<sub>AS</sub> acortada se relaciona con una menor variabilidad intraindividual con respecto a la motilidad espermática, mientras que una AGD alargada se asocia con un coeficiente de variación general menor. Estos resultados no son congruentes y en este caso particular pueden deberse a hallazgos casuales u otras limitaciones metodológicas.

El modelo lineal generalizado (GLM) para las medidas repetidas durante el año de seguimiento mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los hombres agrupados por AGD<sub>AS</sub> alargadas y acortadas en motilidad espermática total (suma de cuadrados tipo III = 3380.60,  $F = 13.62$  y valor de  $p = 0.003$  en las pruebas de efectos entre sujetos). Las Figuras 2 y 3 muestran el comportamiento de los parámetros seminales a lo largo del año en hombres agrupados en AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub> alargadas y acortadas. Aunque sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas con la motilidad espermática, la representación visual de los datos sugiere mejores valores de volumen seminal, concentración de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides con morfología

normal en hombres con AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub> alargadas en comparación con los valores de los sujetos de AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub> por debajo de la mediana. Esto es consistente con trabajos previos<sup>2,6,7</sup>, aunque la falta de poder en nuestro estudio podría impedirnos encontrar diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 3.** Coeficiente de variación intraindividual (CVi) de cada parámetro de semen en relación con mediciones de AGD alargadas y acortadas.

| <u>Parámetros<br/>seminales</u>            | <u>AGD<sub>AP</sub></u> |              |                | <u>AGD<sub>AS</sub></u> |              |                |
|--------------------------------------------|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------|--------------|----------------|
|                                            | <u>Larga</u>            | <u>Corta</u> | <u>p-valor</u> | <u>Larga</u>            | <u>Corta</u> | <u>p-valor</u> |
| Volúmen seminal                            | 28.28%                  | 31.95%       | 0.15           | 31.02%                  | 29.35%       | 0.32           |
| Concentración<br>espermática               | 56.52%                  | 69.29%       | 0.05           | 65.38%                  | 58.36%       | 0.18           |
| Movilidad<br>progresiva y no<br>progresiva | 13.93%                  | 15.22%       | 0.23           | 16.61%                  | 12.83%       | 0.01           |
| Morfología<br>normal<br>espermática        | 35.47%                  | 48.27%       | 0.01           | 41.32%                  | 38.49%       | 0.28           |
| Recuento total<br>espermático              | 66.74%                  | 84.03%       | 0.03           | 74.20%                  | 74.73%       | 0.48           |
| Fragmentación<br>ADN espermático<br>(%)    | 48.22%                  | 46.39%       | 0.37           | 48.86%                  | 45.58%       | 0.28           |

*Nota:*

AGD<sub>AP</sub>: distancia anogenital desde el ano hasta la inserción cefálica del pene; AGD<sub>AS</sub>: distancia anogenital desde el ano hasta la base posterior del escroto.

Esta tabla muestra la evaluación de la variabilidad intraindividual de los parámetros del semen en relación con la AGD dividida por la mediana.

Además, se observó una relación cuadrática significativa con el volumen seminal cuando se estudió el comportamiento de los parámetros a lo largo del año. Eso significaba que el volumen era más alto en los meses cálidos y más bajo durante el resto del año. La literatura previa muestra asociaciones entre los parámetros seminales y las variaciones estacionales. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no mostraron diferencias estacionales con el volumen seminal<sup>29-31</sup>, y en una población china se encontró un menor volumen en verano<sup>32</sup>. Sin embargo, nuestro estudio no fue diseñado para este propósito.

Los resultados del uso de modelos mixtos para el efecto fijo y sus covariables fueron similares para AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub>. En todos los modelos, la intersección y el efecto fijo (AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub>) fueron estadísticamente significativos para todos los parámetros espermáticos (valor de  $p \leq 0.01$ ). Los criterios de información de Akaike (AIC) variaron desde el valor más bajo de 553,6 para el volumen seminal hasta el valor más alto de 2989,7 para la motilidad total. Por lo tanto, los valores de AGD<sub>AP</sub> y AGD<sub>AS</sub> tienen una influencia fija en cada uno de los parámetros seminales en nuestra población de estudio. Por ejemplo, los hombres con AGD<sub>AP</sub> alargadas (o AGD<sub>AS</sub>) tendrán consistentemente un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en comparación con aquellos con AGD acortadas (Figuras 2 y 3). Este análisis muestra que los parámetros básicos del semen (volumen, concentración, recuento total, motilidad y morfología del espermatozoides) y la fragmentación del ADN dependen de la AGD individual en todos los casos.

Nuestros hallazgos son en parte consistentes con la literatura previa. Los estudios transversales han mostrado una relación entre los parámetros seminales y la AGD<sup>2,7</sup>, mientras que otros estudios no encontraron asociaciones significativas<sup>33,34</sup>. La razón de estos resultados contradictorios puede deberse a diferencias étnicas, de edad o de lugar de realización. Zhou et al.<sup>33</sup> analizó la relación en una población joven china, y el estudio de Parra et al.<sup>34</sup> estuvo compuesto por jóvenes universitarios sanos en un rango de edad entre 18 y 23 años. Se ha sugerido que la disminución de los niveles de exposición a andrógenos en el útero podría dar como resultado una AGD acortada<sup>4</sup>. Una AGD acortada se ha asociado con parámetros seminales disminuidos<sup>2</sup> y podría relacionarse con la variabilidad de los indicadores espermáticos. Por lo tanto, muchos autores consideran la AGD como un buen predictor para los parámetros seminales<sup>2,6,7</sup>. Sin embargo, estos parámetros no son constantes en el tiempo en un individuo<sup>17-20</sup> y una alta variabilidad en dichos parámetros

podría conducir a un diagnóstico erróneo del potencial fértil del varón basado en un único seminograma<sup>20</sup>.

#### 6.4. Conclusión

Podríamos concluir que los voluntarios con AGD alargadas, como biomarcadores del desarrollo prenatal normal del sistema reproductivo, podrían tener sistemáticamente mejores parámetros seminales a lo largo del tiempo, con la excepción de la fragmentación del ADN espermático. La fragmentación del ADN podría estar influenciada por factores a corto plazo que no se comprenden bien y se necesitan más estudios al respecto. Para cada individuo (coeficiente intra-variación), se han detectado diferencias más altas en los parámetros espermáticos, aunque aquellos con un AGD<sub>AP</sub> alargada tienden a presentar una variabilidad constantemente más baja. Una cuestión importante que no se puede abordar en este estudio es el valor relativo de cada medición de AGD. La mayoría de los estudios hasta la fecha han utilizado ambas medidas, aunque la mayoría de las asociaciones se han encontrado con la AGD<sub>AS</sub><sup>2,4</sup>. Sin embargo, no está claro por qué se han encontrado anteriormente diferentes asociaciones con ambas medidas de AGD. Por lo tanto, el acceso a más datos normativos para ambas medidas de AGD podría ofrecer la posibilidad de explorar y utilizar este biomarcador con potenciales aplicaciones clínicas futuras. La AGD puede ser un proxy útil no sólo para los valores promedio de los parámetros seminales si no también para su estabilidad a lo largo del tiempo.

#### 6.5. Bibliografía

1. Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect* 2009 ;117(11):1786-90.2.
2. Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. *PLoS ONE* 2011; 6(5): 18973.

3. Sharpe RM. Endocrine disruption and human health effects —a call to action. *Sh Nat Rev Endocrinol* 2011; 7, 633–634.
4. Mendiola J, Stahlhut RW, Jorgensen N, Liu F, Swan SH. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environ Health Perspect* 2011;119(7):958-63.
5. Eisenberg ML, Shy M, Walters RC, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and azoospermia in adult men. *Int J Androl* 2012;35(5):726-30.
6. Dean A, Sharpe RM. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(6):2230-8.
7. Jain VG, Singal AK. Shorter anogenital distance correlates with undescended testis: detailed genital anthropometric analysis in human newborns. *Hum Reprod* 2013;28(9):2343-9.
8. Thankamony A, Lek N, Carroll D, Williams M, Dunger DB, Acerini CL, Ong KK, Hughes IA. Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ Health Perspect* 2014;122(2):207-11.
9. Hsieh MH, Eisenberg ML, Hittelman AB, Wilson JM, Tasian GE, Baskin LS. Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenital distance. *Hum Reprod* 2012;27(6):1577-80.
10. Neill, J.D. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3rd edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands 2005.
11. Van den Driesche S, Scott HM, MacLeod DJ, Fisker M, Walker M, Sharpe RM. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. *Int J Androl* 2011;34(6 Pt 2):578-586.

12. Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014; 21(8):5457–5464.
13. Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J Urol* 2012;187(2):594-8.
14. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5<sup>th</sup> edn. Geneva, Switzerland: *WHO Press* 2010.
15. Schwartz D, Laplanche A, Jouannet P, David G. Within-subject variability of human semen in regard to sperm count, volume, total number of spermatozoa and length of abstinence. *J Reprod Fertil* 1979;57: 391–5.
16. Keel BA. Within- and between- subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril* 2006; 85: 128-34.
17. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003;18:2082– 8.
18. Francavilla F, Barbonetti A, Necozone S, Santucci R, Cordeschi G, Macerola B, et al. Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. *Int J Androl* 2007; 30(3):174-181.
19. Leushuis E, Van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Bossuyt PM, Blankenstein MA, et al. Reproducibility and reliability of repeated semen analyses in male partners of subfertile couples. *Fertil Steril* 2010;94(7):2631-5.
20. Pérez-Palazón C, López-Espín JJ, Mendiola J, Román-Arias JD, Torres-Cantero AM. Factors associated with the variability of semen quality: A follow-up study. *Rev Int Androl* 2016;14:1-7.

21. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, Van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;5:586-92.
22. Sarabia-Cos L, Arenal-Gonzalo JJ, Mínguez-Alarcón L, Gosálvez J, Mendiola J, Torres-Cantero AM. Estudio de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en jóvenes varones. *Rev Int Androl* 2015;13(1):1-7.
23. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24:59-66.
24. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84:833-42.
25. Mendiola, J., Oñate-Celdrán, J., Samper-Mateo, P., Árenal-Gonzalo, J.J., Torres-Roca, M., Sánchez-Rodríguez, C., et al. Comparability and reproducibility of adult male anogenital distance measurements for two different methods. *Andrology* 2016;4(4):626–631.
26. Feltz, C.J and Miller, G.E. An asymptotic test for the equality of coefficients of variation from k populations. *Stat Med* 1996;15(6):646–658.
27. Hand, D.J. and Taylor, C.C. Multivariate analysis of variance and repeated measures: A practical approach for behavioural scientists. *Chapman and Hall* 1987.; New York, USA.
28. Goldstein. Multilevel statistical models. Edward Arnold, London. UK.
29. Richthoff, J., Rylander, L., Hagmar, L., Malm, J. and Giwercman, A. Higher sperm counts in Southern Sweden compared with Denmark. *Hum Reprod* 2002; 17(9):2468–2473.

30. Carlsen, E., Petersen, J.H., Andersson, A.M. and Skakkebaek, N.E. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2014; 82(2):358–366.
31. Chen, Z., Godfrey-Bailey, L., Schiff, I. and Hauser, R. Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience. *J Exp Clin Assist Reprod* 2004; 1(1):2.
32. Zhang, X.Z., Liu, J.H., Sheng, H.Q., Wu, H.J., Wu, Y., Yao, K.S., et al Seasonal variation in semen quality in China. *Andrology* 2013; 1(4):639-643.
33. Zhou, N., Sun, L., Yang, H., Chen, Q., Wang, X., Yang, H., et al Anogenital distance is associated with serum reproductive hormones, but not with semen quality in young men. *Hum Reprod* 2016; 31(5):958-67.
34. Parra, M.D., Mendiola, J., Jørgensen, N., Swan, S.H. and Torres-Cantero, A.M. Anogenital distance and reproductive parameters in young men. *Andrologia* 2016; 48(1):3–10.

## 7. CONCLUSIONES

1. Hay una importante variabilidad en el recuento y en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en el eyaculado de un mismo sujeto durante un mismo año. La movilidad espermática es un parámetro mucho más constante y por tanto un marcador más fiable entre los distintos eyaculados.
2. La elevada variabilidad en los parámetros mencionados anteriormente hace que, desde el punto de vista clínico, analizar una única muestra seminal pueda conllevar un elemento de error aleatorio considerable sobre el potencial fértil de un varón, por lo que sería deseable valorar pruebas repetidas en el mismo sujeto.
3. En los varones que practican regularmente ejercicio ligero o moderado, o que no consumen habitualmente alcohol o café, la variabilidad de la calidad seminal es menor por lo que analizar una única muestra seminal sería más fiable.
4. Existe una alta variabilidad en el índice de fragmentación del ADN espermático en las medidas repetidas, por lo que, desde un punto de vista clínico, un único análisis de fragmentación del ADN espermático podría ser poco fiable para determinar el diagnóstico de mayor o menor fertilidad.
6. La práctica de ejercicio intenso o moderado/intenso, la exposición a tóxicos o el estrés psicológico, son factores que se asocian a una menor variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático.
7. Los varones con una distancia anogenital (AGD) alargada, de forma consistente en las mediciones repetidas, tienen mejores valores en todos los parámetros seminales medidos, a excepción de la fragmentación del ADN espermático.
8. La fragmentación del ADN espermático parece estar influenciada por exposiciones recientes y con consecuencias a corto plazo. La naturaleza e importancia relativa de estos factores requiere investigaciones adicionales.

9. La concentración, el recuento total y la morfología espermática presentan unos valores mayores y una variabilidad intraindividual consistentemente menor en varones con una AGD<sub>AP</sub> alargada.
10. El valor relativo de cada una de las dos mediciones de AGD no está claro. El acceso a más datos normativos para ambas medidas de AGD podría ofrecer la posibilidad de explorar y utilizar este biomarcador con potenciales aplicaciones clínicas futuras.
11. La AGD puede ser un proxy útil en la clínica no sólo para los valores promedio de los parámetros seminales si no también para predecir su estabilidad a lo largo del tiempo.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Información sobre las publicaciones

De la presente tesis doctoral se han realizado tres publicaciones en revistas científicas incluidas en índices de calidad como el *Journal Citation Reports* (JCR) o Latindex.

Los trabajos publicados son:

Artículo 1:

**Pérez-Palazón C, López-Espín JJ, Mendiola J, Román-Arias JD, Torres-Cantero AM. Factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal: un estudio de seguimiento. Rev Int Androl. 2016;14(1): 1-7.**

Información y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 17/12/2014; aceptado el 10/02/2015.
- Factor de impacto (JCR-SCIE, 2017):0,096
- Área temática y posición: Andrology (6/6).

Se trata del primer trabajo derivado de un estudio de seguimiento coordinado por los Doctores Torres-Cantero y Mendiola, sobre los determinantes asociados a la variabilidad de la calidad seminal. En mi caso participé en la organización del estudio y en la investigación de la bibliografía de interés. Lideré la realización del trabajo de campo, desde la selección de los sujetos participantes, la realización de los procedimientos de análisis seminal y encuestas epidemiológicas, el registro de los datos generados, hasta la integración de los resultados. Además, participé en la elaboración de este manuscrito desde su inicio hasta la versión final.

Artículo 2:

**Pérez-Palazón C, López-Espín JJ, Román-Arias JD, Mendiola J, Torres-Cantero AM. Determinantes asociados a la variabilidad del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en varones sanos: un estudio de seguimiento. Rev. salud ambient. 2016;16(1):25-32.**

Información y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 20/10/2015; aceptado el 21/03/2016.
- Características cumplidas (Latindex, 2017): 29/36
- Área temática: Ciencias Médicas: Medicina, Salud Pública.

Se trata del segundo trabajo derivado del proyecto sobre determinantes asociados a la variabilidad de la calidad seminal, siendo en este caso el parámetro estudiado el índice de fragmentación del ADN espermático. En este caso lideré la fase de investigación, incluyendo la búsqueda bibliográfica, y la realización de los procedimientos de análisis de la integridad cromatínica espermática, el registro de los datos generados, y la interpretación de los resultados. También participé en la elaboración de este manuscrito desde su inicio hasta la versión final.

Artículo 3:

**López-Espín JJ, Pérez-Palazón C, Maldonado-Cárceles AB, Román-Arias JD, Mendiola J, Torres-Cantero AM. Anogenital distance and variability in semen parameters. Syst Biol Reprod Med. 2018 Feb;64(1):71-79.**

Información y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 10/04/2017; aceptado el 9/10/2017.
- Factor de impacto (JCR-SCIE, 2017): 1,582
- Área temática y posición: Andrology (5/6).

Es el tercero de los trabajos resultado de esta tesis. Con respecto a este trabajo, participé en la búsqueda y recopilación de la bibliografía relacionada. Realicé los procedimientos de análisis seminal y encuestas epidemiológicas y el registro de los datos generados. Colaboré en el procedimiento de exploración física de los sujetos, así como en la integración de los resultados. Además, inicié la elaboración del manuscrito y colaboré hasta su versión final.