



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**EFFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA CALIDAD
ESPERMÁTICA DEL HOMBRE**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona en el programa de doctorado del Dpt. de Pediatría, Obstetrícia i Ginecologia, Medicina Preventiva i Salut Pública.

Rafael S. Lafuente Varea

Codirectores de tesis: Dr. Miguel Ángel Checa Vizcaíno y Dra. Bénédicte Jacquemin

Julio 2017

El Dr. Miguel A. Checa Vizcaíno, Profesor de la UAB, la Dra. Bénédicte Jacquemin, investigadora en el ISGlobal, Barcelona.

CERTIFICAN

Que Rafael S. Lafuente Varea ha realizado bajo su dirección el trabajo que para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona en el programa de doctorado del Dpt. de Pediatría, Obstetricia i Ginecologia, Medicina Preventiva i Salut Pública, titulado:

**EFFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA CALIDAD
ESPERMÁTICA DEL HOMBRE**

Doctorando Rafael S. Lafuente Varea

Dr. Miguel A. Checa Vizcaíno

Dra. Bénédicte Jacquemin

Barcelona, julio de 2017

DEDICATORIA

A mi madre por estar ahí en todo momento, y a mi padre por todo lo que me enseñó, sé que te hubiera gustado estar aquí.

A Marta, por aguantarme, por entender lo importante que es para mí este proyecto y por su apoyo. Gracias cariño, espero poder compensarte algún día.

A mis hijas Alba y Judit, luceros que iluminan mi camino y de las que me siento muy orgulloso, os quiero.

A mis queridos hermanos, Mari, Antonio y Carlos, y sobrinos, estáis lejos pero os llevo en mi corazón, y al resto de familia que aunque está dispersa os recuerdo con cariño.

AGRADECIMIENTOS

Empecé a vincularme con la investigación en los últimos años de mi licenciatura y en el año 1993 comencé mis estudios de doctorado en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Tengo que agradecer a mi primer director de tesis, el Dr. Ricard Guerrero, catedrático de Microbiología (UB), con quien aprendí a leer artículos científicos y a publicar los primeros trabajos incluso antes de acabar la carrera. Gracias Ricard porque con los años me he dado cuenta de todo lo que aprendí contigo.

En el año 1995 hago un giro en mi carrera profesional y descubro el apasionante mundo de la Reproducción Asistida, y entro a formar parte de la familia del Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH). Aquí me encuentro con el Dr. Mario Brassesco de quien he aprendido todo lo que sé de la Andrología y a quién agradezco su apoyo tanto a nivel profesional como a nivel personal. Me ha apoyado en todo momento para la realización de esta tesis, sabiendo que no era fácil compaginar el desarrollo de una tesis doctoral con la rutina de trabajo diario. Gracias Mario.

En el año 2013 surge la posibilidad de continuar con los estudios de doctorado, a través de la Facultad de Medicina de la UAB, y bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Checa, quien me ha ayudado a recuperar un proyecto iniciado en 1993 y a quien le agradezco profundamente su apoyo y confianza, no sólo por ofrecerme esta oportunidad de desarrollo personal, sino por vincularme a la Dra. Bénédicte Jacquemin, codirectora de mi tesis. Bene forma parte de uno de los grupos de investigación ambiental más punteros a nivel mundial y sin su ayuda este proyecto no hubiera sido posible. El papel de Bene dará continuidad a este proyecto, un proyecto que no acaba aquí, sino que seguirá en un futuro ya que hay perspectivas de poder avanzar mucho en este campo. Bene ha sido capaz de guiarme en un área como el de la epidemiología, y creo que cada uno hemos podido aportar nuestros conocimientos y establecer sinergias muy positivas. A raíz del desarrollo del proyecto SEMAP, la Dra. Jacquemin logró obtener una ayuda económica a través de un FIS, por lo que agradezco el apoyo del Ministerio de Sanidad por el soporte económico.

No puedo olvidarme de parte de su equipo con el que estoy teniendo una estrecha relación a quienes les doy las gracias: Tania Martínez (research technician), quien ha estado a mi lado incondicionalmente y ha colaborado intensamente en la elaboración de la

estadística. También Anna Delgado (enfermera) que se está encargando de dar continuidad al proyecto. Debo agradecer su alta profesionalidad y humanidad.

Dejo para el final a lo que se puede considerar parte de mi familia, el personal del CIRH donde he desarrollado mi carrera profesional durante 22 años. A mi maravilloso equipo del Laboratorio de Andrología, con Gemma López, Judith Canals, Dunia Rey y Enrique Carballo, y muchas otras personas que han ido pasando por el laboratorio. Sin su apoyo todo hubiera sido más difícil. Y por supuesto, compañeros y compañeras de otros departamentos con las que he vivido muchos cambios, por citar a los más veteranos: Anna Balquier, Marta Sala, Eva Boraó, Olga Cairó, Felipe Del Río, Enrique Fabián y el resto del equipo. Gracias por ser cómo sois.

Por último y no menos importante, debo dejar constancia de la paciencia infinita que ha demostrado tener mi familia, mi mujer Marta y mis hijas Alba y Judit. Gracias por apoyarme durante estos años y compartir conmigo los momentos buenos y no tan buenos. Os quiero.

Rafael Lafuente

13 de julio de 2017

“La Ciencia apenas sirve más que para darnos una idea de la extensión de nuestra ignorancia”

Lamennais

Resumen

Introducción

La asociación entre los factores ambientales y la calidad seminal es un tema controvertido que necesita ser estudiado. Sabemos que la calidad seminal ha ido disminuyendo en las últimas décadas y se ha constatado un aumento de anomalías espermáticas, así como de los problemas de infertilidad. Estos cambios, que han ocurrido en pocas décadas, son muy probablemente causados por factores ambientales que podrían influir en la espermatogénesis. Este proyecto se centra en estudiar cómo afectan diferentes factores ambientales, principalmente contaminación atmosférica y hábitos de vida, en los principales parámetros seminales considerando dos poblaciones: individuos normozoospermicos jóvenes y sanos, y pacientes que acuden a un centro de Reproducción Asistida.

Material y métodos

Se estudia una población joven y sana de 172 individuos y una población de pacientes formada por 230 individuos. Se recoge información del historial clínico para ambas poblaciones y se aplican cuestionarios de exposición ambiental al grupo de pacientes. Se valoran características sociodemográficas (edad, nivel de estudios, tipo de jornada laboral, índice de masa corporal) y los principales hábitos de vida (tabaco, alcohol, café, cannabis, exposición a tóxicos, hábitos dietéticos, etc.). En la población joven y sana se valora la exposición a los principales contaminantes atmosféricos: partículas en suspensión (PM), NO₂ y NO_x, y la temperatura ambiental. Se estudia la asociación entre todos estos factores y los parámetros seminales como el volumen del eyaculado, concentración espermática, movilidad progresiva, morfología y fragmentación del ADN espermático.

Resultados

En el grupo de individuos jóvenes y sanos se observa que el tabaco afecta a la movilidad progresiva, aunque no hay significancia a nivel estadístico. El cannabis afecta significativamente disminuyendo el volumen del eyaculado. La exposición a los contaminantes atmosféricos en el grupo de normozoospermicos no parece tener efecto. Sin embargo, sí encontramos un efecto de la temperatura ambiental disminuyendo la concentración de espermatozoides y la movilidad progresiva.

En el grupo de pacientes, se observa que la edad se asocia a un aumento de la fragmentación del ADN y menor movilidad. Un nivel de estudios alto se asocia a una mejor concentración, y la exposición ocupacional (químicos, gases y temperatura) afecta negativamente a la concentración y movilidad. El tabaco disminuye la movilidad y el alcohol disminuye la concentración y aumenta la fragmentación.

Discusión y conclusiones

En el grupo de individuos jóvenes y sanos no se detecta un efecto directo de los factores ambientales en la calidad seminal. Seguramente, dado que se trata de una población joven, los mecanismos antioxidantes de los individuos permiten contrarrestar el efecto de los factores ambientales. Debe considerarse que puede existir un efecto dependiente de las dosis de exposición y no hay que descartar el efecto acumulativo de estas sustancias que con los años pueden acabar afectando a la calidad seminal. Cabe destacar el efecto de la temperatura ambiental que se asocia negativamente tanto a la concentración espermática como a la movilidad progresiva.

En cuanto al grupo de pacientes se han podido identificar factores que repercuten negativamente, como la edad, la exposición ocupacional, el tabaco, el alcohol, etc.

La revisión sistemática realizada evidencia que existe un efecto de la polución del aire en la calidad seminal, particularmente en la fragmentación del ADN y en la morfología espermática. Los estudios realizados muestran grandes limitaciones, ya que ninguno estima la exposición a nivel individual y las mediciones de exposición ambiental no son precisas. Hay numerosos factores de confusión que dificultan establecer asociaciones, aunque en el modelo animal se ha podido realizar. Son necesarios más estudios, con muestras repetidas y con estimaciones más precisas.

Abstract

Introduction

Association between environmental factors and seminal quality is a controversial issue that needs to be studied. It is known that seminal quality has decreased in the last decades and there is an increase in sperm anomalies as well as in infertility problems. These changes in seminal quality, which occurred in a few decades, are probably due to environmental factors that may influence spermatogenesis. This project focuses on studying the effects of some environmental factors on the main seminal parameters considering two populations: young and healthy normozoospermic individuals, and patients who come to an assisted reproductive center.

Material and methods

A young and healthy population of 172 individuals and a population of 230 patients of assisted reproductive center were studied. Information is collected from the clinical history for both population and an environmental questionnaire is applied to the patients. Socio-demographic characteristics (age, study level, type of working day, body mass index) and the main lifestyles (tobacco, alcohol, coffee, cannabis, exposure to toxics and dietary habits...) are considered. In the young and healthy population, the exposure to the main atmospheric pollutants is evaluated: particulate matter (PM), NO₂ and NO_x, and environmental temperature. The association between all these factors and the seminal parameters such as ejaculate volume, sperm concentration, progressive motility, morphology and sperm DNA fragmentation was studied.

Results

In the group of young and healthy individuals it is observed that tobacco affects progressive motility, although there is no statistical significance. Cannabis affects significantly by decreasing ejaculate volume. The exposure to air pollutants in the group of normozoospermics does not seem to have an important effect. However, there is an effect of environmental temperature decreasing the sperm concentration and progressive mobility.

In the group of patients, it is observed that age is associated with an increase in DNA fragmentation and less progressive motility. A high education is associated with a better sperm concentration, and occupational exposure (chemicals, gas and temperature) affects

negatively the concentration and the motility. Tobacco decreases sperm motility and alcohol decreases concentration and increases DNA fragmentation.

Discussion and conclusions

In the group of young and healthy individuals, a direct effect of environmental factors on seminal quality is not detected. Surely, given that it is a young population, the antioxidant mechanisms of individuals can minimize the effect of environmental factors. Probably, there may be an effect dependent on exposure doses and the cumulative effect of these substances. For this reason, over the years, seminal quality could be affected. Moreover, environmental temperature is negatively associated with both sperm concentration and progressive mobility.

In the second group, the patients, some environmental factors have a negative impact on sperm quality, such as age, occupational exposition at work, tobacco and alcohol.

The systematic review showed that there is an effect of air pollution on seminal quality, particularly on DNA fragmentation and sperm morphology. However, most of these studies show major limitations, since none estimates individual exposure and ambient exposure measurements are not very accurate. In addition, there are numerous confounding factors that make it difficult to establish associations, although in the animal model it has been done. More studies are needed, with repeated samples and more accurate exposure estimates.

ÍNDICE

Resumen	9
Abstract	11
Abreviaturas	15
Lista de tablas.....	16
Lista de figuras.....	18
PARTE 1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO.....	19
1.1. El factor masculino: el papel de la Andrología en Medicina Reproductiva	19
1.1.1. Definición	19
1.1.2. Epidemiología.....	19
1.1.3. Causas de infertilidad masculina.....	21
1.2. Factores ambientales que afectan la calidad seminal	23
1.2.1. Hábitos de vida	24
1.2.2. Contaminación atmosférica.....	29
1.2.3. Otros componentes tóxicos del medioambiente que podrían afectar la calidad seminal	40
PARTE 2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS	48
2.1. En individuos sanos y jóvenes.....	48
2.2. En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida	48
2.3. Hipótesis.....	48
PARTE 3. METODOLOGÍA	50
3.1. Diseño y poblaciones de estudio	50
3.1.1. Estudios en individuos sanos.	50
3.1.2. Estudio en pacientes de clínicas de Reproducción Asistida.....	50
3.2. Parámetros seminales	51
3.2.1. Parámetros clásicos de un seminograma.....	51
3.2.2. Determinación de la fragmentación del ADN.....	52
3.3. Variables de exposición.....	53
3.3.1. Contaminación atmosférica.....	53
3.3.2. Temperatura ambiental	54
3.3.3. Hábitos de vida y otros factores sociodemográficos.....	54
3.4. Análisis estadístico	60
3.4.1. En individuos jóvenes y sanos	60

3.4.2. En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida	61
PARTE 4. RESULTADOS.....	63
4.1. Estudios en individuos jóvenes y sanos.....	63
4.1.1. Análisis descriptivo.....	63
4.1.2. Hábitos de vida	64
4.1.3. Contaminación atmosférica y temperatura ambiental.....	65
4.2. Estudios en pacientes de clínicas de Reproducción Asistida	70
4.2.1. Análisis descriptivo.....	70
4.2.2 <i>Hábitos de vida</i>	73
4.2.3. <i>Contaminación atmosférica</i>	109
PARTE 5. DISCUSION Y CONCLUSIONES	110
5.1. Discusión	110
5.1.1. En individuos jóvenes y sanos.....	110
5.1.2. En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida	114
5.2. Implicaciones clínicas y de salud pública.....	123
5.3. Perspectivas de futuro	125
5.4. Conclusión	126
Lista de referencias	128
ANEXOS	141
<i>Anexo 1. Publicación Fertility and Sterility.....</i>	<i>141</i>
<i>Anexo 2. Historia Clínica para los individuos jóvenes y sanos</i>	<i>158</i>
<i>Anexo 3. Documento informativo para pacientes sobre el proyecto</i>	<i>164</i>
<i>Anexo 4. Consentimiento para participar en el estudio.....</i>	<i>166</i>
<i>Anexo 5. Cuestionario de exposición ambiental</i>	<i>167</i>
<i>Anexo 6. Minicuestionario de evaluación 24 horas antes a la eyaculación</i>	<i>178</i>
<i>Anexo 7. Procedimiento para la realización del seminograma.....</i>	<i>179</i>
<i>Anexo 8. Procedimiento para la determinación de la fragmentación del ADN espermático mediante SCSA</i>	<i>184</i>

Abreviaturas

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

ASESA: Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva

CFC: clorofluorocarbonos

COV: compuestos orgánicos volátiles

ESCAPE: European Study of Cohorts for Air Pollution Effects

GIS: sistema de información geográfica

GSTM1: gen glutatión-S transferasa M1

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IMC: Índice de masa corporal

IQR: rango intercuartil

LUR: Land use regression (modelos de regresión de uso del terreno)

MHb : metahemoglobina

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PM: Material particulado

PM_{0,1}: fracción de al menos el 50% de partículas con un diámetro de corte aerodinámico de 0,1 mm. Partículas ultrafinas

PM_{2,5}: fracción de al menos el 50% de partículas con un diámetro de corte aerodinámico de 2,5 mm. Partículas finas

PM₁₀: fracción de al menos el 50% de partículas con un diámetro de corte aerodinámico de 10 mm. Partículas gruesas

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PROSPERO: International prospective register of systematic reviews

ROS: especies reactivas del oxígeno

SES: indicador socioeconómico

U.B.E.: Unidad de bebida estándar

WHO (OMS): Organización Mundial de la Salud

Lista de tablas

Tabla 1. Distribución de los factores asociados a la infertilidad masculina en 10.469 pacientes (Nieschlag <i>et al.</i> , 2010)	22
Tabla 2. Efectos de los hábitos de vida en la calidad seminal según la bibliografía revisada (Lafuente <i>et al.</i> , 2017).....	29
Tabla 3. Guía de calidad del aire de la OMS y objetivo intermedio para el ozono: concentraciones de ocho horas (OMS, 2006).	33
Tabla 4. Usos de los disruptores endocrinos más conocidos y presencia en los productos de consumo y en el ámbito laboral (Romano, 2012).	44
Tabla 5. Grupos de disruptores endocrinos con efectos en la salud humana (Romano, 2012).	46
Tabla 6. Hábitos de vida y factores sociodemográficos considerados para cada una de las poblaciones de estudio.....	55
Tabla 7. Hábitos dietéticos considerados en el cuestionario de exposición y puntuación asignada (Martínez-González <i>et al.</i> , 2004).....	60
Tabla 8. Características y hábitos de vida de la población de estudio	63
Tabla 9. Descripción de los contaminantes atmosféricos modelizados a la dirección del participante sin extrapolación temporal y los valores de temperatura ambiental mostrados como medias de los tres meses anteriores a cada eyaculado.....	63
Tabla 10. Resultados de los efectos de los hábitos de vida sobre los parámetros seminales en individuos sanos. Se muestra en negrita estimaciones significativas con un $p < 0.05$	64
Tabla 11. Comparación de los parámetros seminales entre los pacientes incluidos en el estudio y los pacientes que no devolvieron el cuestionario.	71
Tabla 12. Análisis descriptivo de los parámetros seminales del total de la población incluida en el estudio y que acude a un centro de Reproducción Asistida.....	71
Tabla 13. Análisis de los parámetros seminales restringiendo la población en los que presentan alguna alteración en los principales parámetros seminales según OMS 2010.	72
Tabla 14. Medias de los parámetros seminales al evaluar hábitos de vida 24 horas previas al seminograma en pacientes. Se realiza una comparación de medias mediante el test t-student. .	74
Tabla 15. Asociación entre el volumen seminal y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA.....	81

Tabla 16. Asociación entre la concentración espermática y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un test Kruskal Wallis.	84
Tabla 17. Asociación entre la movilidad progresiva y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA.....	87
Tabla 18. Asociación entre la morfología espermática y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un test Kruskal Wallis.	90
Tabla 19. Asociación entre la fragmentación del ADN y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA.....	93
Tabla 20. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre el volumen seminal y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.	96
Tabla 21. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la concentración espermática y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.....	99
Tabla 22. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la movilidad progresiva y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.	102
Tabla 23. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la morfología y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.....	105
Tabla 24. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la fragmentación del ADN y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.	108

Lista de figuras

Figura 1. Interdependencia de las funciones reproductivas masculinas y femeninas (adaptado de Nieschlag <i>et al.</i> , 2010).....	20
Figura 2. Nivel de penetración de las diferentes partículas en suspensión y de los gases presentes en la contaminación atmosférica en el aparato respiratorio (Jacquemin <i>et al.</i> 2015).....	32
Figura 3. Diagrama de flujo de la revisión sistemática de bibliografía.....	36
Figura 4. Distribución de los niveles de contaminación atmosférica en Barcelona modelizado mediante modelos de regresión del uso del terreno (Nieuwenhuijsen <i>et al.</i> , 2014)	53
Figura 5. (A) Asociación entre el volumen seminal y los diferentes contaminantes a diferentes intervalos de tiempo y ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico (SES). (B) Ajustado también por temperatura ambiental. (C) Considerando sólo el efecto de la temperatura ambiental ajustado por los otros factores. Coeficientes (95% CI).....	66
Figura 6. (A) Asociación entre la concentración espermática y los diferentes contaminantes a diferentes intervalos de tiempo y ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico (SES). (B) Ajustado también por temperatura ambiental. (C) Considerando sólo el efecto de la temperatura ambiental ajustado por los otros factores. Coeficientes (95% CI).....	68
Figura 7. (A) Asociación entre la movilidad progresiva y los diferentes contaminantes a diferentes intervalos de tiempo y ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico (SES). (B) Ajustado también por temperatura ambiental. (C) Considerando sólo el efecto de la temperatura ambiental ajustado por los otros factores. Coeficientes (95% CI).....	69
Figura 8. Alteraciones de los parámetros seminales estudiados en la población de individuos que acude a centros de Reproducción Asistida	72
Figura 9. Proporción de pacientes que acuden a un centro de Reproducción Asistida que consume tabaco, café o té	73

PARTE 1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

1.1. El factor masculino: el papel de la Andrología en Medicina Reproductiva

1.1.1. Definición

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad es una enfermedad del aparato reproductor definida como la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de mantener relaciones sexuales regulares sin protección durante 12 meses o más (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Más concretamente, la infertilidad en el hombre es la incapacidad de fecundar con éxito el óvulo de una mujer debido a problemas relacionados con los órganos reproductores masculinos, con los espermatozoides, o con el líquido seminal. El hombre puede ser estudiado por infertilidad o subfertilidad utilizando diferentes intervenciones clínicas y también evaluando la calidad espermática en un laboratorio de andrología (WHO, 2010).

1.1.2. Epidemiología

De las parejas que planean un embarazo, hasta el 50% lo consiguen en el primer ciclo, y en el resto, el porcentaje de éxito va disminuyendo cada mes paralelamente que la proporción de parejas subfértiles dejan de intentarlo. Aproximadamente el 85% conseguirá un primer embarazo dentro de los 6-12 meses intentándolo. Por tanto, según los estudios epidemiológicos más amplios, los problemas de fertilidad afectan al 15% de la población en edad reproductiva en países occidentales, es decir, una de cada seis parejas. Y estas cifras están experimentando una evolución creciente. Finalmente, el 5% de estas parejas se quedan sin tener hijos en contra de su voluntad (Matorras *et al.*, 2012)

Concretamente en España, la infertilidad se sitúa entre el 15% y 17% de la población, y se calcula que el 3% de los niños nacidos proceden de técnicas de Reproducción Asistida.

Es indudable que la mujer tiene un papel fundamental en el éxito o el fracaso a la hora de conseguir descendencia, ya que es la responsable de llevar a término el embarazo, pero el papel del hombre no se debe desestimar, sobre todo en aquellos casos en los que no se produce embarazo. Cada vez más se describen anomalías en la función reproductiva

masculina y el hombre presenta anomalías hasta en el 50% de las parejas con problemas de infertilidad, que muchas veces pueden coexistir con disfunciones reproductivas femeninas (Nieschlag *et al.*, 2016). La interdependencia de las funciones reproductivas femeninas y masculinas es el motivo por el que el factor masculino, debe ser estudiado desde el inicio de una primera visita por infertilidad. La infertilidad puede ser un trastorno multifactorial en el que se requiere la intervención de un equipo multidisciplinar de expertos. Este es el motivo por el que se aconseja disponer de personal especializado (andrólogo, urólogo, biólogo, etc.) que pueda estudiar el factor masculino de forma paralela al estudio de la mujer.

La figura 1 ayuda a entender la interdependencia de las funciones reproductivas masculinas y femeninas (Nieschlag *et al.*, 2010). El grupo 1 representa a parejas ambos con una función reproductiva óptima. El grupo 2, corresponde a parejas con alguna deficiencia en la función reproductiva de alguno de los dos miembros. Seguramente, la óptima función de uno de ellos compense la del otro. Es el modelo de pareja más habitual en la población. El grupo 3 representa a las parejas en las que sólo uno de los miembros debe ser tratado clínicamente por el ginecólogo o por el andrólogo. En el grupo 4 y 5, ambos miembros de la pareja necesitarán ser tratados por un especialista.

Por tanto, el papel de la Andrología en la Medicina Reproductiva es fundamental, aunque aún todavía está en desarrollo y el acceso a esta especialidad no está implantada de manera generalizada en los centros de reproducción y en cada país (Nieschlag *et al.*, 2016).

Funciones Reproductivas Masculinas	Óptimo	3	2	1
	Dañado	5	4	2
	Ausente	5	5	3
		Ausente	Dañado	Óptimo
		Funciones Reproductivas Femeninas		

Figura 1. Interdependencia de las funciones reproductivas masculinas y femeninas (adaptado de Nieschlag *et al.*, 2010).

1.1.3. Causas de infertilidad masculina

Probablemente la causa principal de infertilidad es la edad. Sabemos que la edad óptima de la función reproductiva en la mujer se sitúa entre los 20 y 30 años, y disminuye considerablemente a partir de los 35 años (Velde *et al.*, 2002). En el caso del hombre, la espermatogénesis continua durante toda la vida del individuo, y se producen espermatozoides a edades avanzadas, sin embargo la movilidad suele ir disminuyendo con la edad (Hellstrom *et al.*, 2006) y más recientemente se ha hipotetizado que la fertilidad masculina también disminuye con la edad. A partir de los 40 años, el tiempo necesario para conseguir un embarazo es mayor (Hassan *et al.*, 2003), la tasa de abortos espontáneos aumenta (Slama *et al.*, 2005) y la tasa de nacido vivo disminuye (Frattarelli *et al.*, 2008). Además, se detecta una mayor tasa de niños nacidos con anomalías cromosómicas y enfermedades genéticas autosómicas dominantes (Sartorius *et al.*, 2010).

La necesidad de desarrollar las técnicas en Reproducción Humana Asistida se debe a una notable disminución de las tasas de fertilidad en las dos últimas décadas (Grant *et al.*, 2006). La disminución de la calidad espermática en la especie humana es un hecho que ha recibido especial atención por parte de la comunidad científica, y puede ser responsable de hasta el 50% de los problemas de fertilidad. Se ha observado una disminución tanto en el conteo total de espermatozoides como en el volumen del eyaculado (Carlsen *et al.*, 1992), también como alteraciones en la morfología, independientemente de la edad e incluso en hombres fértiles (Auger *et al.*, 1995). La Organización Mundial de la Salud (WHO) ha ido disminuyendo en varias ocasiones los valores de normalidad de los principales parámetros seminales clásicos (Cooper *et al.*, 2010), ya que en las últimas décadas dichos parámetros han disminuido en hombres sanos (Skakkebaek *et al.*, 2006).

Es esencial comprender cuáles son las causas de esta disminución de la calidad espermática (Louis *et al.*, 2013). Y seguramente la explicación pueda estar en el aumento de la incidencia de enfermedades crónicas (Lehtihet *et al.*, 2015; La Vignera *et al.*, 2012; Tvrdá *et al.*, 2015), el consumo de tabaco (Harlev *et al.*, 2015), el alcohol (Muthusami *et al.*, 2005), la obesidad (MacDonald *et al.*, 2010), el estrés (Gollenberg *et al.*, 2010), y la exposición a contaminantes ambientales como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los metales pesados o los contaminantes atmosféricos (Deng *et al.*, 2016).

La fertilidad masculina puede verse reducida como consecuencia de (WHO, 2010):

- anomalías genitourinarias congénitas o adquiridas
- infecciones de las vías genitourinarias
- aumento de la temperatura escrotal (por ejemplo, como consecuencia de un varicocele)
- trastornos endocrinos
- anomalías genéticas
- factores inmunitarios
- causas idiopáticas

Infertilidad masculina idiopática	31 %
Criptorquidia	7.8 %
Infección genitourinaria	8.0 %
Trastornos del depósito del semen y factores sexuales	5.9 %
Enfermedades generales y sistémicas	3.1 %
Varicocele	15.6 %
Hipogonadismo	8.9 %
Factores inmunitarios	4.5 %
Obstrucciones	1.7 %
Otros	13.5%

Tabla 1. Distribución de los factores asociados a la infertilidad masculina en 10.469 pacientes (Nieschlag *et al.*, 2010)

La causa de infertilidad masculina idiopática se sospecha que puede deberse a trastornos endocrinos como consecuencia de la contaminación ambiental o presencia de radicales libres (ROS).

Una de las principales causas que está recibiendo cada vez más atención es el deterioro medioambiental (Giwerzman *et al.*, 2011), particularmente, la polución por agentes xenobióticos que actúan como disruptores endocrinos, simulando a la actividad de hormonas estrogénicas. Los efectos en particular se traducen en un aumento del cáncer testicular (Chia *et al.*, 2010), hipospadias, criptorquismo (Toppari *et al.*, 2010) y una reducción de la espermatogénesis debido a una disminución de las células de Sertoli durante la vida fetal. (Oatley *et al.*, 2011). Aunque hasta ahora, ha sido difícil demostrar una causa efecto entre la contaminación ambiental y estos efectos negativos para la función reproductiva en el

hombre, algunos autores sugieren que el deterioro de la salud reproductiva puede ser causado por factores ambientales (Skakkebaek *et al.*, 2006).

En este sentido, está ampliamente aceptado que la polución del aire tiene efectos adversos para la salud en general del hombre (Brunekreef *et al.*, 2002), detectándose enfermedades cardiovasculares (Beelen^b *et al.*, 2014), enfermedades respiratorias (Sava *et al.*, 2012), efectos sobre el feto como defectos en el desarrollo neuronal (Yorifuji *et al.*, 2016). No hay que olvidar que la contaminación atmosférica ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinogénica en humanos (Loomis *et al.*, 2013). Se han realizado numerosos estudios en animales que indican una relación directa entre contaminación atmosférica y fertilidad, particularmente con la calidad del semen (Chen *et al.*, 2009; Ema *et al.*, 2013), pero en humanos todavía no se ha podido establecer una relación de forma clara.

Pero, ¿qué nivel de conocimiento tiene el paciente acerca de la infertilidad masculina asociada con factores médicos, ambientales o psicológicos? Un trabajo publicado recientemente por Daumler, *et al.* (2016) realiza un estudio para valorar el grado de conocimiento del varón relativos a su fertilidad. La conclusión a la que llegan es que el hombre, considerando diferentes grupos demográficos, tiene un conocimiento limitado en distintos factores asociados a la infertilidad masculina, sólo es capaz de identificar el 51% de los factores de riesgo y el 45% de los problemas de salud asociados a la infertilidad masculina. La mitad de los encuestados expresan su interés en ser informados acerca de la salud reproductiva, lo que corrobora que hay una falta de información en la población en general, de los factores de riesgo y de la posibilidad que puede tener el paciente de detectarlo y modificarlos en la medida de lo posible.

1.2. Factores ambientales que afectan la calidad seminal

Desde la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha definido el concepto de salud ambiental como una disciplina que comprende aquellos aspectos de la salud humana, incluida la calidad de vida y el bienestar social, que son determinados por factores ambientales físicos; químicos, biológicos, sociales y psico-sociales. También se refiere a la teoría y práctica de evaluar, corregir, controlar y prevenir aquellos factores en el medio ambiente que pueden potencialmente afectar adversamente la salud de presentes y futuras generaciones.

Los factores ambientales, incluidos los hábitos de vida, se consideran los factores más evidentes que contribuyen a la disminución de la calidad del semen (Barazani *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2014 y Sharma *et al.*, 2013).

En este apartado, se considera a los hábitos de vida más comunes, los principales tóxicos presentes en el aire, y finalmente, se describen otros tipos de tóxicos presentes en el ambiente.

1.2.1. Hábitos de vida

Esta sección ha sido adaptada del capítulo 5 del manual editado conjuntamente por ASEBIR y ASESА (Lafuente *et al.*, 2017).

Los hábitos de vida pueden influir mucho en la salud general y en el bienestar, incluyéndose la fertilidad (Sharma *et al.*, 2013). Factores como la edad a la hora de formar una familia, la nutrición, el peso, el ejercicio, el estrés y la exposición ambiental afectan a la fertilidad, pero el tabaquismo, el consumo de alcohol, las drogas, y la cafeína también pueden influir negativamente en la fertilidad.

La calidad seminal es un buen indicador de las alteraciones medioambientales, de los hábitos de vida de un individuo o de la exposición ocupacional. Dependiendo de la exposición se pueden producir efectos tóxicos directos o disrupciones hormonales. Algunas de estas exposiciones pueden producir cambios reversibles, pero a veces, cuando la exposición se produce en células germinales o en la pre-pubertad, aparecen secuelas permanentes. La interacción entre la exposición a la polución, los hábitos de vida y la exposición ocupacional, junto con los múltiples factores de confusión, dificulta el trabajo a la hora de encontrar una explicación a la disminución de la calidad seminal.

Se sospecha que los hábitos de vida son factores que pueden contribuir a la disminución paulatina de la calidad espermática (Sharma *et al.*, 2013; Barazani *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Jurewicz *et al.*, 2014b y Sermondade *et al.*, 2012).

A continuación, se valoran los principales hábitos de vida que afectan a la fertilidad masculina y las posibles repercusiones en los procesos reproductivos. No obstante, quedan muchas preguntas por responder y por ahora, no se ha investigado lo suficiente como para saber con certeza los efectos de todos estos factores sobre la fertilidad masculina.

1.2.1.1. Ejercicio físico y estrés

Una cantidad de ejercicio moderado resulta beneficioso para el hombre mejorando los parámetros de calidad seminal. Realizar ejercicio al menos tres veces a la semana mejora casi todos los parámetros seminales en comparación con individuos que realizaban ejercicio más frecuente e intenso (Vaamonde *et al.*, 2009). La morfología también mejora en comparación con deportistas de competición o atletas de élite (Vaamonde *et al.*, 2009). Por otro lado, practicar ciclismo más de cinco horas a la semana se correlaciona negativamente con la concentración y movilidad espermática (Wise *et al.*, 2011).

Un ejercicio excesivo puede afectar negativamente alterando el balance energético del cuerpo y afectando al sistema reproductivo (Redman *et al.*, 2006), pero si se practica adecuadamente disminuye el estrés.

El estrés es un sentimiento de tensión física o emocional. Es la reacción del cuerpo a un desafío o demanda. Cuando dura mucho tiempo puede afectar a la salud. La infertilidad en sí es estresante debido a las presiones sociales, al fracaso, deseos insatisfechos, etc. Se ha demostrado que el estrés debido al trabajo, por situaciones vividas, o incluso por tensiones sociales, tiene un impacto significativo y disminuye la concentración espermática, el recuento total de espermatozoides, la movilidad progresiva y la morfología (Li *et al.*, 2011). El estrés y la depresión parece que reduce la testosterona (Gollenberg *et al.*, 2010 y Schweiger *et al.*, 1999), interrumpen la función gonadal (Schweiger *et al.*, 1999) y en última instancia reduce la espermatogénesis.

1.2.1.2. Tabaco

Se estima que hasta un 35% de hombres en edad reproductiva son fumadores (ASRM, 2008), y que los hombres que fuman antes o durante los intentos de concebir tienen una fertilidad disminuida en comparación con los no fumadores (Augood *et al.*, 1998). Los efectos nocivos del tabaco en la fertilidad masculina están bien descritos en la literatura, aunque también hay numerosos estudios que no observan un efecto negativo del tabaco en la calidad seminal (Sharma *et al.*, 2013 y Harlev *et al.*, 2015). El tabaco afectaría a la concentración espermática (Li *et al.*, 2011), movilidad (Calogero *et al.*, 2009 y Mitra *et al.*, 2012), morfología (Li *et al.*, 2011, Mitra *et al.*, 2012, Said *et al.*, 2005, Ramlau-Hansen *et al.*, 2007a), volumen del eyaculado (Li *et al.*, 2011) y a la tasa de fecundación (Soares *et al.*,

2008), seguramente debido a una reducción de la actividad mitocondrial (Calogero *et al.*, 2009). Un meta-análisis muy reciente, incluyendo 5.865 participantes, ha demostrado que el tabaquismo, sobre todo el tabaquismo moderado o elevado, está asociado con una disminución del conteo y de la movilidad espermática (Sharma *et al.*, 2016). También hay estudios que demuestran un aumento de la aneuploidía en espermatozoides (Shi *et al.*, 2001, Robbins *et al.*, 2005, Jurewicz *et al.*, 2014a), altos niveles de estrés oxidativo (Saleh *et al.*, 2002), y aumento de la fragmentación del ADN (Calogero *et al.*, 2009, Sepaniak *et al.*, 2006, Vilorio *et al.*, 2007) asociados con el tabaquismo.

El incremento en la fragmentación del ADN puede ser debido a un aumento de la presencia de leucocitos en el líquido seminal, lo cual incrementaría la generación de radicales libres aumentando el estrés oxidativo (Saleh *et al.*, 2003 y Agarwal *et al.*, 2006). Posiblemente la respuesta inflamatoria inducida por la presencia de los metabolitos derivados del tabaco sería la responsable de esta cascada de reacciones (Saleh *et al.*, 2003).

Otros trabajos describen como el tabaco podría ser responsable de alterar la función endocrina, aumentando los niveles en suero de FSH y LH, y disminuyendo la producción de testosterona (Terzioglu *et al.*, 2001).

Finalmente, otros estudios relacionan el consumo de tabaco durante el embarazo con efectos adversos irreversibles en la calidad seminal en los descendientes varones de primera generación (Ramlau-Hansen *et al.*, 2007b).

Sin embargo, en la literatura también hay estudios que no encuentran una asociación entre los efectos del tabaco y la calidad espermática (Vogt *et al.*, 1986), o la fragmentación del ADN (Pasqualotto *et al.*, 2006). Lo cierto es que el humo del cigarrillo contiene más de 4.000 productos químicos (American Lung Association, en web) y se asocia claramente con riesgos para la salud general y es muy probable que también se asocie con la salud reproductiva.

1.2.1.3. Alcohol

El consumo de alcohol se asocia a problemas de salud reproductiva como son la impotencia, la atrofia testicular, la disminución de la libido y la disminución de la concentración espermática (Muthusami *et al.*, 2005, Donnelly *et al.*, 1999, Olsen *et al.*, 1997, Pajarinen *et al.*, 1996). Está descrito que la espermatogénesis puede deteriorarse

progresivamente a medida que se incrementa el consumo de alcohol (Pajarinen *et al.*, 1996). Y un consumo crónico puede afectar directamente las hormonas reproductivas masculinas y también la calidad seminal (Muthusami *et al.*, 2005). Un estudio caso-control desarrollado en Japón demuestra que la ingesta de alcohol es significativamente más frecuente en hombres infértiles que en los controles (Tsujimura *et al.*, 2004). También se demostró que el riesgo de aneuploidías en espermatozoides aumenta en consumidores de alcohol respecto a los no consumidores de alcohol (Robbins *et al.*, 2005).

Un meta análisis que incluye 57 estudios y 29.914 individuos detectó una asociación entre alcohol y volumen seminal (Li *et al.*, 2011). Muy pocos hombres considerados como alcohólicos son normozoospermicos, y la mayoría presentan teratozoospermia (Gaur *et al.*, 2010).

Queda por determinar si todos los tipos de bebidas alcohólicas tienen el mismo efecto sobre la calidad seminal, y cuál sería la cantidad de alcohol recomendada como límite de seguridad para la salud reproductiva del hombre (Mendiola *et al.*, 2009), así como el posible efecto sinérgico en la concurrencia de hábitos tóxicos en la infertilidad masculina. Se han descrito efectos sinérgicos entre el alcohol y el tabaco, pero falta saber qué pasa con otros tipos de interrelaciones como con la exposición a la contaminación atmosférica o la actividad ocupacional.

1.2.1.4. Cafeína

La cafeína es una sustancia que se consume de forma habitual en nuestra sociedad a través del café, té, bebidas de cola y chocolates. Está presente en las hojas, semillas y frutos de más de 63 especies vegetales. Los efectos de la cafeína se relacionan con la estimulación del sistema nervioso central, el incremento del ritmo cardíaco, la relajación de la musculatura lisa y el incremento de la secreción de catecolaminas (Sadeu *et al.*, 2010), pero hay pocos estudios que relacionen el consumo de cafeína con la calidad seminal. Sí está más estudiada su relación con la salud reproductiva a nivel general, asociándose con un incremento del tiempo de embarazo por encima de 9,5 meses (Sharma *et al.*, 2013), mayor tasa de aborto e incluso mayor muerte fetal (Sharma *et al.*, 2013).

En un trabajo realizado por Jensen *et al.* (Jensen *et al.*, 2010), donde se relaciona la cafeína con la calidad seminal en más de 2.500 jóvenes de Dinamarca, concluyen que el consumo moderado de cafeína (hasta 800 mg/día) no se relaciona con una disminución de la

calidad seminal. Sólo aquellos individuos con un consumo muy elevado de café (> 800 mg/día, equivalente a unas 7 tazas de café) y cola (> 1 L/día) presentaban una disminución de los parámetros seminales, seguramente relacionada con otros hábitos de vida asociados, como la dieta, alcohol, tabaco, etc.

1.2.1.5. Otras drogas

La marihuana es una de las drogas más utilizada en el mundo (du Plessis *et al.*, 2015, Battista *et al.*, 2008). La marihuana contiene canabinoides que reducen la producción de testosterona desde las células de Leydig, modula la apoptosis de las células de Sertoli y disminuye tanto la espermatogénesis como la movilidad espermática, la capacitación espermática y la reacción acrosómica (Battista *et al.*, 2008). Un consumo crónico de marihuana se relaciona también con una disminución de la morfología espermática, reduciendo el tamaño del núcleo, incrementando la condensación de la cromatina y aumentando la ausencia de acrosoma (Sadeu *et al.*, 2010).

Otra de las drogas más habituales es la cocaína, un estimulante del sistema nervioso central y del periférico que causa vasoconstricción y efectos anestésicos. Un uso prolongado puede asociarse a una disminución de la estimulación sexual, problemas para lograr y mantener la erección, así como para eyacular (Gold *et al.*, 1997). Se ha observado, con su uso, un aumento de prolactina en suero lo que afecta adversamente a la espermatogénesis, al igual que se relaciona con una disminución de la testosterona (George *et al.*, 1996, Ragni *et al.*, 1988).

No cabe duda que los hábitos de vida tienen un impacto directo en la fertilidad, que es importante tener presente que determinadas conductas pueden beneficiar o perjudicar los resultados reproductivos y que tanto los pacientes como el clínico deben ser conscientes de ello. Una modificación activa de los hábitos más perjudiciales antes de un tratamiento de reproducción asistida, tanto en hombres como en mujeres, puede significar un mayor control de su potencial de fertilidad.

Se ha realizado una revisión bibliográfica para determinar el efecto de los hábitos de vida más frecuentes respecto a la calidad seminal, y en la tabla 2 se resumen sus principales efectos sobre los parámetros seminales. Se debe tener en cuenta que los efectos serán en muchos casos dependientes de las dosis de consumo, sobre todo a nivel de tabaco, alcohol, cafeína y drogas, y que la sinergia de varios hábitos a la vez podría afectar más aún a la

calidad seminal. La importancia de profundizar en la repercusión para la salud que pueden tener los diferentes hábitos, radica en que se pueden modificar, y de esta manera, mejorar nuestras expectativas reproductivas.

	Concentración	Movilidad	Morfología	Nivel de testosterona
Ejercicio físico moderado	↑	↑	↑	
Ejercicio físico intenso	↓	↓	↓	
Estrés	↓	↓	↓	
Tabaco	↓/=	↓/=	↓/=	↓
Alcohol	↓	↓	↓	↓
Cafeína	↓/=	↓/=	↓/=	↑
Marihuana	↓	↓	↓	↓
Cocaína				↓

Tabla 2. Efectos de los hábitos de vida en la calidad seminal según la bibliografía revisada (Lafuente *et al.*, 2017)

1.2.2. Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica ha evolucionado en las últimas décadas. En Europa, la contaminación del aire asociada a fuentes industriales está mayoritariamente controlada y la fuente principal es el tráfico automotriz. Aunque las concentraciones de contaminantes atmosféricos son más bajas que hace unas décadas, estudios epidemiológicos como el de las "seis ciudades" en Estados Unidos demostraron que aún concentraciones muy bajas estaban asociadas con un aumento de la mortalidad total y cardiovascular. Desde entonces no se ha podido demostrar un nivel por debajo del cual no haya efectos en la salud. Actualmente los contaminantes atmosféricos principales son los provenientes del tráfico como el dióxido de nitrógeno (NO₂) o el material particulado en suspensión (PM). Se estima que una gran proporción de los habitantes de la población urbana en Europa está expuesta a niveles por encima de los valores recomendados por la unión Europea (23 a 45% para PM₁₀ > 20µg/m³ ó 25% para NO₂ > 40µg/m³). La contaminación atmosférica es un problema de salud pública que concierne a una gran parte de la población (European Environment Agency, 2007). Las partículas gruesas (PM₁₀ con un diámetro aerodinámico inferior o igual a 10 µm) penetran hasta los bronquiolos. Las partículas finas penetran hasta los alvéolos (PM_{2.5}) y las partículas ultrafinas (PM_{0.1}) penetran hasta el torrente sanguíneo. Los gases reaccionan a

cualquier nivel del tracto respiratorio. Todos estos contaminantes provocan a nivel local inflamación y estrés oxidativo y nitrosativo, pero también estos mecanismos de los contaminantes se han demostrado a nivel sistémico, pudiendo provocar efectos nocivos en la salud en diversos sistemas y órganos incluyendo el sistema reproductivo.

Uno de los desafíos actuales de la epidemiología ambiental en general es la mejora de la estimación de la exposición a nivel individual, y la contaminación atmosférica no es excepción a la regla. Hasta hace poco, para evaluar la exposición a la contaminación atmosférica, se utilizaban medias de concentraciones medidas por monitores fijos, obteniendo una media para áreas geográficas muy amplias como una ciudad por ejemplo. Pero este método tiene grandes limitaciones ya que se ha visto, que los contaminantes provenientes del tráfico, sobre todo el NO_2 o los $\text{PM}_{2.5}$, tienen una variabilidad espacial muy alta, siendo mayor dentro de una ciudad que entre diferentes ciudades. El uso de captadores individuales no es factible para un gran número de personas o por periodos prolongados de tiempo. Gracias al desarrollo de sistemas de información geográfica y de métodos estadísticos, es ahora posible modelizar la exposición a la contaminación de manera muy precisa (Jerrett *et al.*, 2005). Existen varios métodos, como los modelos de dispersión, basados sobre los datos de emisión tomando en cuenta los datos meteorológicos, los modelos de interpolación estadística entre estaciones fijas ("kriging") que puede mejorarse tomando en cuenta las características del terreno (densidad de población, altitud, etc... "co-kriging"); y los modelos de regresión ("Land use regression" o LUR) que predicen las concentraciones de un contaminante dado, en un sitio dado tomando en cuenta las características del terreno y del tráfico. El desarrollo de estos modelos está en plena evolución y su aplicación permite una mejor estimación de la exposición a la contaminación atmosférica para estudiar mejor sus efectos en la salud. En este contexto, aparece el proyecto ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects), un proyecto financiado por el séptimo programa marco de la Unión Europea, que tenía como objetivo estudiar los efectos de la exposición a largo plazo de la contaminación atmosférica. Utilizando métodos de LUR, se desarrollaron estimaciones de exposiciones a nivel individual en 36 ciudades/regiones Europeas, incluyendo Barcelona, para óxidos de nitrógeno (NO_x), dióxido de nitrógeno (NO_2), partículas con un diámetro inferior o igual a 10 micras (PM_{10}) y partículas con un diámetro inferior o igual a 2.5 micras ($\text{PM}_{2.5}$) y siempre de manera protocolizada y estandarizada (Beelen^a *et al.*, 2013 y Eeftens *et al.*, 2012). Este proyecto, innovador por su metodología y envergadura, ha puesto en evidencia asociaciones entre la

exposición a largo plazo a la contaminación atmosférica y diversos efectos adversos en la salud incluyendo la salud perinatal (Pedersen *et al.*, 2006).

Se considera que el aire limpio es un requisito básico de la salud y el bienestar para los humanos (Informe OMS, 2005). La contaminación del aire exterior puede tener un origen natural (efectos de volcanes, arena en suspensión, etc.) o antropogénico y es debido a agentes químicos, físicos o biológicos que modifican las características naturales de la atmósfera. Está formada principalmente por material particulado en suspensión (PM) y por diferentes tipos de gases.

1.2.2.1. Material particulado

Según el tamaño de las partículas en suspensión se pueden clasificar en:

PM_{0.1}: partículas ultrafinas, con un tamaño de 0.1 micras. Pueden penetrar directamente en el tejido pulmonar y pasar al torrente sanguíneo.

PM_{2.5}: partículas finas, con un tamaño inferior a 2.5 micras. Pueden penetrar hasta los alveolos.

MP_{2.5}:	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, media anual 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, media de 24 horas
MP₁₀:	20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, media anual 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, media de 24 horas

PM₁₀: partículas con un tamaño inferior a 10 micras

Las PM₁₀ se forman por medio de procesos mecánicos, como obras en construcción, la resuspensión del polvo en los caminos, el viento, etc. Las partículas más finas, con un tamaño inferior a 2.5 micras, provienen principalmente de fuentes de combustión.

Las partículas más gruesas (PM_{coarse}) se calcula como la diferencia entre las PM₁₀ y PM_{2.5}, y se midió la reflectancia de los filtros PM_{2.5} y se transformó en absorbancia (PM_{absorbance}) (Eeftens *et al.*, 2012).

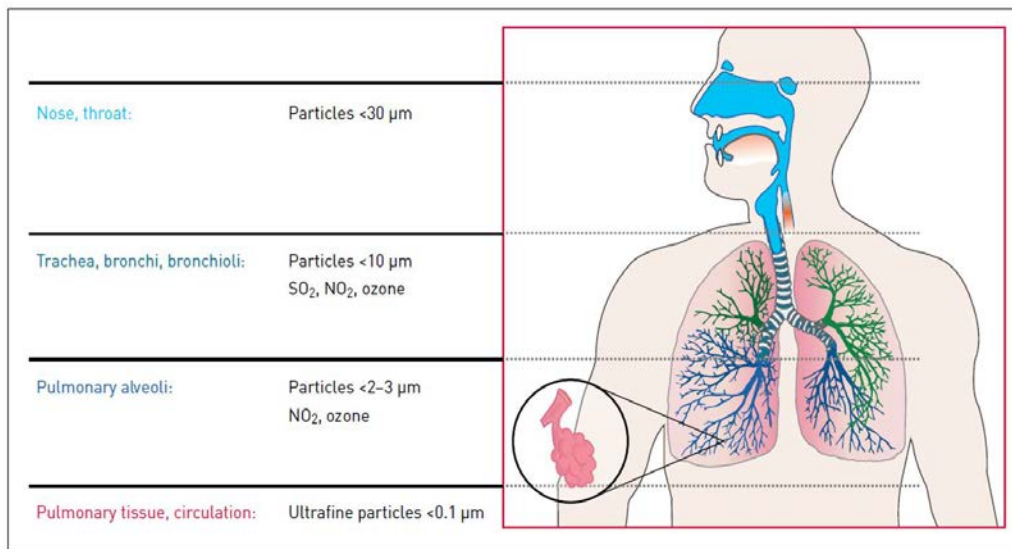


Figura 2. Nivel de penetración de las diferentes partículas en suspensión y de los gases presentes en la contaminación atmosférica en el aparato respiratorio (Jacquemin *et al.* 2015)

1.2.2.2. Gases (valores normales según la OMS)

Ozono (O_3 : $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, media de ocho horas)

En estudios epidemiológicos de series temporales se ha conseguido un volumen considerable de nuevas pruebas sobre los efectos del ozono en la salud. Estos estudios considerados en conjunto han puesto de manifiesto que hay asociaciones positivas, pequeñas pero convincentes, entre la mortalidad diaria y los niveles de ozono, que son independientes de los efectos del material particulado.

El ozono se forma en la atmósfera mediante reacciones fotoquímicas en presencia de luz solar y contaminantes precursores, como los óxidos de nitrógeno (NO_x) y diversos compuestos orgánicos volátiles (COV).

	Media máxima diaria de ocho horas ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Fundamento del nivel elegido
Niveles altos	240	Efectos significativos en la salud; proporción sustancial de la población vulnerable afectada.
Objetivo intermedio-1 (OI-1)	160	Efectos importantes en la salud; no proporciona una protección adecuada de la salud pública. La exposición a este nivel está asociada con: <ul style="list-style-type: none"> • efectos fisiológicos e inflamatorios en los pulmones de adultos jóvenes sanos que hacen ejercicio expuestos durante periodos de 6,6 horas; • efectos en la salud de los niños (basados en diversos estudios de campamentos de verano en los que los niños estuvieron expuestos a niveles ambientales de ozono); • aumento estimado de un 3-5% de la mortalidad diaria^a (basado en los resultados de estudios de series cronológicas diarias).
Guía de calidad del aire (GCA)	100	Proporciona una protección adecuada de la salud pública, aunque pueden producirse algunos efectos en la salud por debajo de este nivel. La exposición a este nivel de ozono está asociada con: <ul style="list-style-type: none"> • un aumento estimado de un 1-2% de la mortalidad diaria^a (basado en los resultados de estudios de series cronológicas diarias); • la extrapolación a partir de estudios de laboratorio y de campo, basada en la probabilidad de que la exposición en la vida real tienda a ser repetitiva y en que se excluyen de los estudios de laboratorio las personas muy sensibles o con problemas clínicos, así como los niños; • la probabilidad de que el ozono ambiental sea un marcador para los oxidantes relacionados con él.

Tabla 3. Guía de calidad del aire de la OMS y objetivo intermedio para el ozono: concentraciones de ocho horas (OMS, 2006).

^aMuertes atribuibles al ozono. Los estudios de series cronológicas indican un aumento de la mortalidad diaria del orden del 0,3-0,5% por cada incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en las concentraciones de ozono durante ocho horas por encima de un nivel de referencia estimado de $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Dióxido de nitrógeno (NO_2 : $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, media anual, $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, media de una hora)

Los estudios experimentales realizados con animales y con personas indican que el NO_2 , en concentraciones de corta duración superiores a $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, es un gas tóxico con efectos importantes en la salud. El NO_2 se ha utilizado en numerosos estudios epidemiológicos como marcador de la mezcla de contaminantes relacionados con la combustión, en particular los que emiten el tráfico por carretera o las fuentes de combustión en espacios cerrados. La mayor parte del NO_2 atmosférico se emite en forma de NO , que se oxida rápidamente a NO_2 por acción del ozono. El dióxido de nitrógeno es, en presencia de hidrocarburos y luz ultravioleta, la principal fuente de ozono troposférico y de aerosoles de nitratos, que constituyen una fracción importante de la masa de $\text{PM}_{2,5}$ del aire ambiente.

Dióxido de azufre (SO₂:20 µg/m³, media de 24 horas 500 µg/m³, media de 10 minutos)

Se trata de otro producto de la combustión de combustibles fósiles. Al igual que el NO₂, es un irritante respiratorio. Los estudios controlados realizados con asmáticos que hacían ejercicio indican que algunos de ellos experimentaron cambios en la función pulmonar y los síntomas respiratorios tras periodos de exposición al SO₂ de apenas 10 minutos. Tomando como base estas pruebas, se recomienda que no se supere una concentración de SO₂ de 500 µg/m³ durante periodos con una duración media de 10 minutos. El SO₂ es un contaminante asociado a actividad industrial y sus emisiones están muy controladas. Actualmente en Europa ya no es un contaminante de interés.

Monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂)

El CO es un gas incoloro e inodoro emitido por la combustión que proviene principalmente de fuentes móviles como vehículos a motor. El CO₂ es la principal causa del cambio climático y su producción es muy elevada por tantas actividades que hace que su producción se considere vital para muchas de las economías mundiales.

Efectos de los contaminantes atmosféricos en la calidad espermática

Después de repasar los principales contaminantes, se ha realizado una revisión sistemática para conocer con más exactitud el estado actual del conocimiento en relación a los efectos de los principales componentes tóxicos de la polución del aire (Lafuente *et al.*, 2016; ver anexo 1).

La contaminación ambiental se sospecha que pueden contribuir a la disminución paulatina de la calidad espermática (Nordkap *et al.*, 2012; Pacey *et al.*, 2010; Barazani *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014 and Jurewicz *et al.*, 2009). Sin embargo, la calidad seminal varía bastante entre diferentes tipologías de población, incluso entre distritos (Jørgensen *et al.*, 2001 y Swan *et al.*, 2003), la edad (Johnson *et al.*, 2015), o incluso la temperatura. En definitiva, la presencia de diferentes factores de confusión complica el análisis de los datos y es necesario realizar ajustes teniendo en cuenta todas las variables posibles (Yang *et al.*, 2015). Este es uno de los motivos para realizar un análisis de los posibles efectos tanto de la contaminación ambiental como de los hábitos de vida y la temperatura en una población de varones jóvenes y sanos, que acuden a un centro de reproducción asistida como candidatos a donantes de semen.

La contaminación atmosférica se ha asociado con una variedad de efectos en la salud bien conocidos, desde efectos subclínicos hasta la muerte (Chen *et al.*, 2008 y Hansen *et al.*, 2010). La mayoría de estudios se centran en resultados perinatales, pero hay una falta de conocimiento acerca de cómo afecta la contaminación atmosférica a la calidad seminal (Glinianaia *et al.*, 2004 y Hansen *et al.*, 2010), y de si el efecto es similar en varones fértiles o infértiles.

Para la revisión sistemática se han seguido las normas recomendadas por PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) para la presentación de resultados (Beller *et al.*, 2013). Los detalles del protocolo se han registrado en PROSPERO (International prospective register of systematic reviews, NHS) y se pueden consultar en el registro CRD42015007175.

Se ha realizado una búsqueda exhaustiva hasta el 30 de junio de 2016 en las siguientes bases de datos: PubMed, ISI Web of Knowledge, y Cochrane Library. En la búsqueda se han combinado términos referentes tanto a la contaminación atmosférica como a la calidad seminal. Concretamente se utilizaron las siguientes palabras clave combinándolas con indicación booleanas en las tres bases de datos consultadas: (contaminación del aire OR partículas OR diesel OR hollín OR carbono OR humo negro OR nube tóxica OR tráfico OR vehículos de motor OR dióxido/monóxido de carbono OR dióxido/óxido de nitrógeno OR ozono OR CFC OR COV OR actividad industrial OR amoniaco OR óxido/dióxido de azufre OR central eléctrica OR vertederos OR metano) AND (función del esperma OR recuento de espermatozoides OR motilidad espermática OR morfología espermática OR volumen de semen OR licuefacción OR fragmentación del ADN espermático). Estos términos se utilizaron como se muestra en las tres bases de datos consultadas y la búsqueda se restringió a "hombres" usando el filtro correspondiente en la base de datos.

Se han incluido estudios de cohorte y de casos control que analizaron el impacto de los contaminantes del aire exterior en la calidad del esperma en los seres humanos. También se identificó e incluyó varios estudios que utilizaron biomarcadores de contaminación del aire medidos en sangre y orina.

Para evaluar el riesgo de sesgo se ha utilizado la escala Newcastle-Ottawa (Wells *et al.*, 2016). Esta escala considera varios elementos que clasifican la posibilidad de sesgo en tres

categorías: selección, comparabilidad y resultado. Finalmente, se incluyeron 17 artículos, 13 que evaluaron exposición a la contaminación atmosférica y 6 artículos que evaluaban la exposición a la contaminación del aire utilizando biomarcadores (Fig. 3) (2 artículos evaluaron la exposición de las dos maneras).

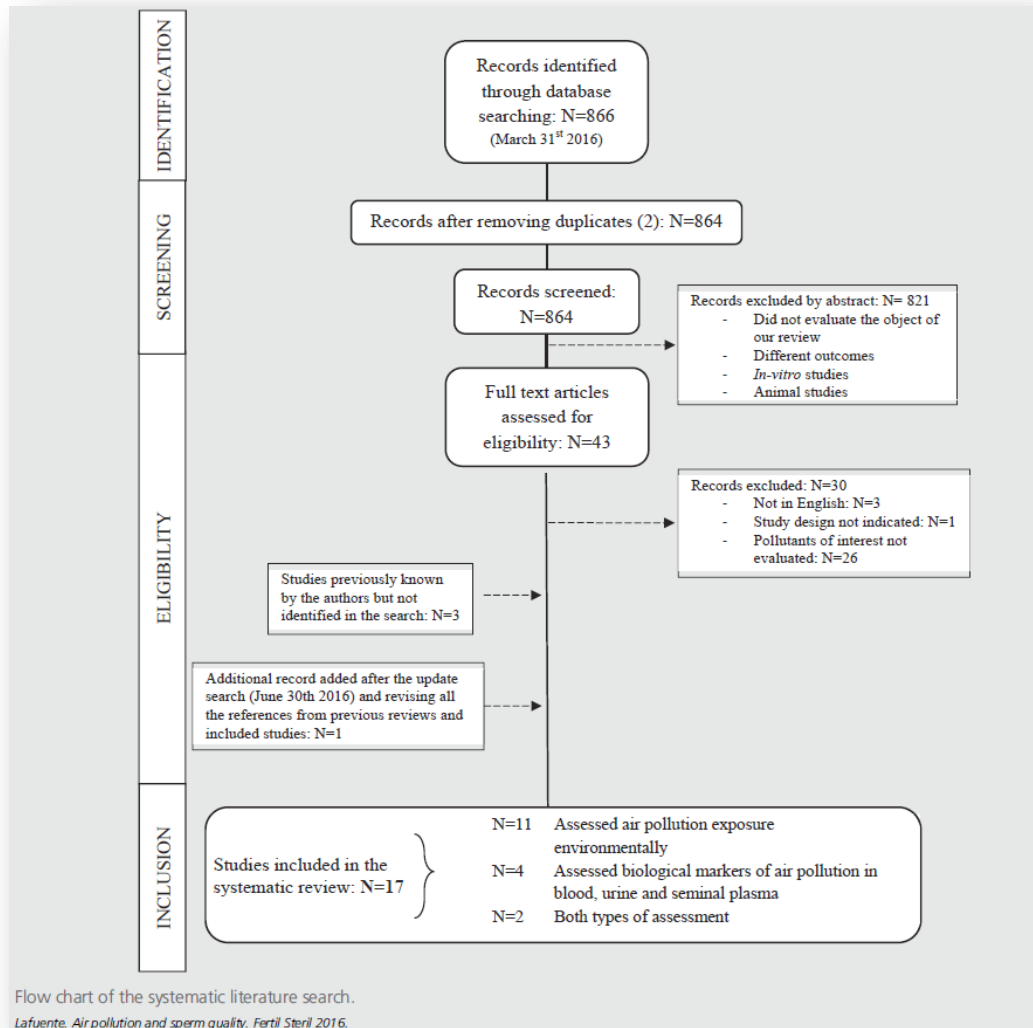


Figura 3. Diagrama de flujo de la revisión sistemática de bibliografía.

A continuación, se resumen los hallazgos por cada parámetro espermático de los 13 artículos que evaluaron la asociación con la contaminación atmosférica (tabla 3 en anexo 1), y luego se presentan los resultados por separado para los 6 artículos que evaluaron biomarcadores de la exposición a la contaminación del aire (tabla 4 en anexo 1).

Fragmentación del ADN. Seis artículos evaluaron la asociación contaminación atmosférica y la fragmentación del ADN, tres de los cuales encontraron que la exposición a la contaminación atmosférica estaba asociada con una mayor fragmentación del ADN. Rubes *et al.* (2005), con un estudio de cohorte que comparó múltiples muestras en 36 hombres sanos de la República Checa, y Selevan *et al.* (2000), con un estudio semi-individual, es decir, un estudio utilizando medidas individuales del resultado de parámetros espermáticos pero con valores agregados de la exposición a la contaminación del aire incluyó 272 hombres sanos de la República Checa, y ambos encontraron que una alta exposición a la contaminación atmosférica resulta un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides con ADN fragmentado que aquellos con baja exposición ($\beta = 0,19$; 95% [CI] 0,02 - 0,36; y $\beta = 0,30$; 95% [CI] 0,08-0,52, respectivamente). Calogero *et al.* (2011), realizó un estudio semi-individual en Nápoles en el que participaron 36 hombres sanos trabajadores de las cabinas de los peajes de autopista y los comparó con 32 participantes no expuestos, ajustando por edad, y también observó un aumento en la fragmentación del ADN (en un 4,8%) en los participantes con mayor exposición. De Rosa *et al.* (2003), realizó otro estudio semi-individual en Nápoles con la participación de 85 hombres sanos que trabajan en peajes y 85 participantes no expuestos, ajustando por edad. No encontraron diferencias en la fragmentación del ADN entre aquellos con alta y baja exposición. Otros estudios que no encontraron asociación entre la exposición a la contaminación atmosférica y el nivel de fragmentación del ADN fueron el de Hansen *et al.* (2010), que llevó a cabo un estudio de cohorte en EE.UU. y examinó los efectos de O_3 y $PM_{2,5}$ en 228 hombres; y Radwan *et al.* (2016), que realizó un estudio de cohortes de 327 hombres normozoospermicos en Polonia con estimaciones asignadas individualmente de PM_{10} , $PM_{2,5}$, SO_2 , NO_x y exposición al CO.

Movilidad espermática. Doce de los estudios incluidos evaluaron la motilidad espermática, seis de los cuales encontraron que los niveles de contaminación del aire se asociaron con la disminución de la movilidad de los espermatozoides. De Rosa *et al.* (2003), Calogero *et al.* (2011), Guven *et al.* (2008), realizaron un estudio semi-individual comparando 38 trabajadores de peajes de autopista en Duzce (Turquía), con 35 empleados de oficina de la misma empresa, y Boggia *et al.* (2009), quien llevó a cabo un estudio semi-individual en Nápoles con un diseño similar a la de Guven *et al.* (2008), pero con una muestra mayor (N = 307), encontró una clara disminución en la movilidad espermática asociada a una mayor exposición a la contaminación atmosférica. Hammoud

et al. (2010) realizó un estudio de cohorte que incluyó 1.699 muestras de semen de 1.465 hombres sanos en Salt Lake, y también encontró una disminución estadísticamente significativa del 3,4% en la movilidad espermática, asociada con un aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en $\text{PM}_{2.5}$. Wijesekara *et al.* (2015), realizó un estudio de cohorte de 300 hombres con exposición contaminación atmosférica, y encontró una disminución del 4% en la movilidad espermática en comparación con el grupo no expuesto, pero sólo en participantes normozoospermicos.

Los estudios de Selevan *et al.* (2000), Rubes *et al.* (2005), Radwan *et al.* (2016), Zhou *et al.* (2014) (una cohorte transversal de 1.346 sujetos que viven en zonas rurales o urbanas de China), Sokol *et al.* (2005) (una cohorte de 48 donantes de esperma de Los Angeles, que contribuyeron con al menos 10 muestras durante 2 años con estimaciones individuales de exposición a la contaminación), y Santi *et al.* (2016) (una cohorte retrospectiva de 406 pacientes del laboratorio de referencia de un hospital general en Módena, Italia) no encontraron ninguna asociación entre la exposición a la contaminación atmosférica y la movilidad del esperma.

Recuento de espermatozoides. Todos los artículos incluidos en esta revisión han estudiado el recuento total de espermatozoides, pero sólo siete encuentran una relación entre la contaminación del aire y la disminución del recuento de espermatozoides. Calogero *et al.* (2011) presenta una disminución significativa (-73,02%) en el recuento de espermatozoides entre los trabajadores de los peajes comparándolos con los no expuestos. Guven *et al.* (2008) y de Rosa *et al.* (2003) también observaron una disminución significativa en el recuento de espermatozoides entre los trabajadores de peaje en comparación con el personal de oficina (-37,0%). Sokol *et al.* (2005) reportan una disminución significativa en el recuento de espermatozoides asociado con O_3 (-3,9%) pero no con otros contaminantes estudiados, mientras que Santi *et al.* (2016) encuentra una disminución en el recuento de espermatozoides asociado con $\text{PM}_{2.5}$ pero no con PM_{10} . Zhou *et al.* (2014) solamente encontró una disminución significativa asociada con PM_{10} ($\beta = 0,07$; 95% CI 0,02-0,11), pero no con otros contaminantes. Wijesekara *et al.* (2015) encontró una disminución significativa del esperma concentración (-47,28%) en participantes patológicos expuestos ambiental u ocupacionalmente a la contaminación atmosférica pero no en participantes normozoospermicos. Rubes *et al.* (2005), Boggia *et al.* (2009), Hammound *et al.* (2010), Hansen *et al.* (2010), Selevan *et al.* (2000), y Radwan *et al.* (2016) no encontraron ninguna

asociación significativa entre la contaminación atmosférica y el recuento de espermatozoides.

Morfología espermática. Diez artículos estudiaron la asociación entre la contaminación del aire y la morfología del espermatozoides, siete de los cuales encontraron una asociación significativa. Guven *et al.* (2008) y Calogero *et al.* (2011), quienes compararon a los trabajadores de peajes con trabajadores no expuestos, encontraron una disminución significativa en las formas normales de los espermatozoides asociada con los contaminantes del aire. Selevan *et al.* (2000) y Wijesekara *et al.* (2015) también encontraron una disminución en la normalidad morfología espermática en individuos más expuestos. Zhou *et al.* (2014) y Radwan *et al.* (2016) estudiaron los efectos de PM_x, SO₂, NO_x y CO por separado, y reportaron alteraciones morfológicas asociados con todos los contaminantes del aire. Santi *et al.* (2016) encontraron una disminución de las formas normales del espermatozoides sólo con PM₁₀ pero no con PM_{2.5}. Rubes *et al.* (2005), Hansen *et al.* (2009), y Hammoud *et al.* (2010) no encontraron ninguna relación estadísticamente significativa.

Hubo en total seis trabajos que estudiaron biomarcadores de contaminación del aire y su relación con parámetros seminales. Dos estudios (De Rosa *et al.*, 2003 y Eibensteiner *et al.*, 2005) midieron plomo en sangre, otros dos estudios (Han *et al.*, 2011 y Jurewicz *et al.*, 2014) PAH en la orina, un estudio PAH en sangre (Song *et al.*, 2013) y el último estudio plomo y cadmio en el plasma seminal (Wijesekara *et al.*, 2015). Además, De Rosa *et al.* (2003) midió metahemoglobina (MHb) como marcador de NO₂, sulfohemoglobina para SO₂, carboxihemoglobina, y propofirina de zinc.

En trabajadores de peaje, De Rosa *et al.* (2003) encontró una disminución significativa de la integridad del ADN nuclear de los espermatozoides (determinada por naranja de acridina) y también de la movilidad espermática asociada con MHb, así como un descenso en el recuento de espermatozoides asociado con el plomo. En el grupo de trabajadores que no estaban en cabinas de peajes pero que tenían valores espermáticos por debajo del límite de la OMS, había una disminución en la movilidad espermática asociada con MHb y una disminución en el recuento de espermatozoides asociado con el plomo. Asombrosamente, también encontraron una disminución en la fragmentación del ADN asociada con MHb en este último grupo.

Eibensteiner *et al.* (2005), realizaron un estudio transversal de 18 policías en Perú, encontró una disminución en la movilidad espermática asociada con altos niveles de plomo en sangre, pero no con recuento de espermatozoides o la morfología. Han *et al.* (2011) realizó un estudio prospectivo de cohortes de 232 voluntarios sanos de China y encontró un aumento en la fragmentación del ADN espermático asociado con PAH medida en orina. Jurewicz *et al.* (2013), realizó un estudio prospectivo de cohortes de 277 pacientes de clínicas de fertilidad pero con una concentración normal de esperma o oligozoospermia leve, encontrando una disminución tanto en la movilidad del esperma, como en la morfología del espermatozoide asociada con PAH en la orina, pero no con la fragmentación del ADN o el recuento de espermatozoides. Song *et al.* (2013) realizaron un estudio prospectivo de cohortes de 232 pacientes sanos voluntarios en China y encontró una disminución en la concentración de esperma asociado con PAH en sangre, pero no con la movilidad espermática. Wijsekara *et al.* (2015) no encontró ninguna relación entre el recuento y la movilidad espermática, y el plomo o cadmio medidos en el plasma seminal.

1.2.3. Otros componentes tóxicos del medioambiente que podrían afectar la calidad seminal

1.2.3.1. Disruptores endocrinos

Los disruptores endocrinos son sustancias estrogénicas, androgénicas o antiandrogénicas que pueden perturbar e interferir con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo responsables del mantenimiento homeostático de la regulación de procesos vitales y del desarrollo (Mendiola *et al.*, 2017). En total se han identificado más de 1.500 sustancias capaces de alterar el sistema endocrino e incluyen sustancias como los plaguicidas y herbicidas, biocidas, retardantes del fuego, o contaminantes plásticos que se encuentran en componentes alimenticios, farmacéuticos y productos de uso diario (tabla 4). Estos compuestos exógenos pueden provenir de ámbitos domésticos e industriales o de vertidos urbanos y rurales. La población general está expuesta a disruptores endocrinos a través de la ingesta de comida contaminada, inhalación de aire y polvo contaminado y contacto con la piel, y algunas áreas están sujetas a un mayor riesgo debido a razones culturales y geográficas.

El bisfenol A es un producto químico industrial ampliamente utilizado como monómero clave de resinas epoxi y policarbonatos plásticos. Se produce masivamente ya que permite dar flexibilidad, durabilidad y longevidad a diversos tipos de productos de consumo: CD-ROM, filtros de cigarrillos, recibos térmicos, equipos médicos, suelos, selladores dentales, juguetes, recipientes para alimentos y bebidas, latas, botellas de plástico, etc. (Barbonetti *et al.*, 2016).

A altas temperaturas y con el uso repetido especialmente en recipientes de plástico, pueden desprenderse monómeros de bisfenol A, lo que hace posible su absorción por el cuerpo humano principalmente a través de la ingesta de comida (Vandenberg *et al.*, 2007 y Peretz *et al.*, 2014), aunque también se ha descrito vías de exposición a través de la inhalación de polvo o el contacto dérmico (Hormann *et al.*, 2014). La exposición continua a bisfenoles hace relativamente fácil su detección en orina, aunque también se ha podido detectar en suero, leche materna, líquido folicular, líquido amniótico (Vandenberg *et al.*, 2007 y Cantonwine *et al.*, 2013), plasma seminal (Inoue *et al.*, 2002), etc.

FAMILIA	SUSTANCIAS	USO	PRODUCTOS DE CONSUMO	ACTIVIDADES LABORALES AFECTADAS
CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES	PCBs	Prohibidos, aunque aún se encuentran en algunos transformadores y condensadores eléctricos, en los que se utilizaban como aceite dieléctrico, y en residuos de otros equipos eléctricos y materiales de construcción. También se forman como subproductos indeseados en varios procesos industriales y la incineración de residuos es una fuente importante.	Sellantes de juntas y equipos eléctricos de edificios antiguos. Contaminante de alimentos grasos.	Almacenamiento, transporte y gestión de equipos y materiales que contienen o están contaminados con PCBs: Sector eléctrico Metal/máquina Gestión de residuos
	DIOXINAS POLICLORADAS (PCDDs)	Subproducto residual formado durante la incineración de residuos y materiales con cloro, fabricación y recuperación de metales, fabricación de papel y pasta de papel, clorofenoles, herbicidas clorados y plantas de cloro con electrodos de grafito.	Contaminante de alimentos	Química Papel y pasta de papel Gestión de residuos Metal
	PBBs PBDE	Pirorretardantes bromados que se usan en plásticos y textiles de: - Circuitos y equipos eléctricos y electrónicos. - Cableado y tapicería de vehículos de motor, Tapicería de trenes. - Paneles, moquetas y suelos de aviones. - Aislantes térmicos de tejados, fachadas, suelos y conducciones. - Recubrimientos de construcción.	Tapicerías Equipos eléctricos y electrónicos. Materiales de construcción (aislantes) Espumas de asientos de coches Contaminante del polvo doméstico	Fabricación de materiales eléctricos y electrónicos Transporte de alambres y cables Construcción Fabricación y reparación de material de transporte
	PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS (DDT, HexaclorobenCenO, Clordanos, ClordeconA, Mirex, Toxafeno, Lindano, Linurón, Acetoclor y Alaclor)	Los usos comerciales de la mayoría han sido prohibidos. El DDT aún se utiliza para el control de la malaria. El hexaclorobenceno se forma como subproducto en procesos industriales en los que se utiliza cloro.	Contaminantes de alimentos	Industria química Gestión de residuos
	SUSTANCIAS PERFLUORADAS (PFos, pfoa)	Debido a sus propiedades como impermeabilizante y antiadherente han tenido y tienen numerosos usos: Antiadherentes de utensilios de cocina Espumas contra incendios Impermeabilizantes y antiadherentes de tejidos, papel y cuero; ceras, barnices, pinturas y productos de limpieza; superficies metálicas, moquetas Fabricación de semiconductores Fotolitografía Fluidos hidráulicos	Utensilios y papel de cocina antiadherentes Tejidos, moquetas, Hilo dental Asientos de coches Contaminante de alimentos	Química Fabricación y transformación de plásticos Textil Metal Impresión Sector eléctrico Gestión de residuos Bomberos Galvanizado
CONTAMINANTES DE VIDA CORTA PERO UBICUOS	FTALATOS (BBP, DBP, DEHP)	Plastificantes de PVC principalmente, aunque también de celulosa, acetato de polivinilo y poliuretano. Componente de recubrimientos; insecticidas y repelentes; perfumes, esmalte de uñas, laca de pelo y otros cosméticos. Agente lubricante en textiles.	Artículos fabricados con PVC: juguetes, textiles, moquetas, cortinas, suelos, mangueras, tuberías, ventanas, etc. Pinturas y cosméticos Juguetes de plástico blando, masillas Contaminante de alimentos Contaminante del polvo doméstico	Fabricación y transformación de plásticos Metal Limpieza Fabricación de cosméticos Industria textil
	BISFENOL-A	Su uso principal es como materia prima para la fabricación de pinturas y plásticos con resinas epoxy y policarbonatos. Además es un producto intermedio en la fabricación de fungicidas, antioxidantes, tintes, resinas fenoxi y de poliéster, pirorretardantes.	Puede liberarse de latas de conserva recubiertas de plástico, envases y utensilios de cocina elaborados con policarbonato Papel térmico de tickets de compra Selladores dentales Contaminante de alimentos Contaminante del polvo doméstico	Química: fabricación, utilización, transporte o envasado de bisfenol-A. Construcción Metal Plásticos

FAMILIA	SUSTANCIAS	USO	PRODUCTOS DE CONSUMO	ACTIVIDADES LABORALES AFECTADAS
	ALQUILFENOLES (nonilfenoletoxilato, octilfenoletoxilato y sus metabolitos nonilfenol y octilfenol)	Materia prima para la fabricación de detergentes; emulsificantes, humectantes y dispersantes de pinturas y funguicidas. Antioxidante y estabilizante de PVC. Aditivos de aceites lubricantes y espumas contraceptivas.	Detergentes Ropa Contaminante del polvo doméstico	Química Limpieza Agricultura Construcción Fabricación y Transformación de PVC
PRODUCTOS COSMÉTICOS Y DE HIGIENE	PARABENOS etilparabeno, butilparabeno, metilparabeno y propilparabeno	Conservantes utilizados en productos cosméticos, farmacéuticos y de higiene personal	Champús, acondicionadores, lociones, cremas, geles y otros productos de higiene personal	Química Peluquerías Belleza
	TRICLOSAN 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol	Agente antimicrobiano	Jabones y detergentes Desodorantes Pasta de dientes Cosméticos Tejidos y plásticos	Química Peluquerías Belleza
	ALMIZCLES xileno de almizcle (MX) cetona de almizcle (MK) galaxolide (HHCB) tonalide (AHTN)	Fragancia	Perfumes Colonias Cosméticos Productos de higiene Ambientadores Fragancias de artículos de consumo y juguetes	Química Comercio Peluquerías Belleza
	FILTROS UV benzofenona-2 (BP2) ben-zofenona-3 (BP-) 4-Metilbenzilideno camfor (4MBC) octil-methoxicinamato (OMC)	Cremas solares	Cremas solares	Agricultura Construcción Jardinería Mantenimiento Pesca
PLAGUICIDAS, BIOCIDAS Y HERBICIDAS	PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS (paration, malation, chlorpirifos, diazinon, diclorvos, etc.) CARBAMATOS PIRETRINAS Y PIRETROIDES HERBICIDAS GLIFOSATO, ATRAZINA, etc. FUNGICIDAS VINCLICIN Y OTROS	Fungicidas, insecticidas, moluscocidas, herbicidas, desinfectantes	Uso de plaguicidas Jardines y huertos Alimentos contaminados	Fabricación de agroquímicos Agricultura Forestal Jardinería Fumigación de edificios Limpieza Mantenimiento
	TRIBUTILESTAÑO	Moluscocida utilizado como agente antiincrustante en barcos, boyas, muelles, etc. Biocida en albañilería Desinfectante Biocida de sistemas de refrigeración, torres de refrigeración de plantas eléctricas, fábricas de papel y pasta, cerveceras, curtidos y fábricas textiles		Naval Pesquero Construcción Limpieza Limpieza y mantenimiento de torres de refrigeración
PRODUCTOS DE USO INDUSTRIAL	DISOLVENTES 1,2,4-triclorobenceno percloroetileno octacloroestireno	Los disolventes son sustancias que se utilizan en la industria, principalmente para quitar o disolver la grasa, aceite y suciedad, o también para diluir o portar otros materiales. Son componentes de multitud de productos: pinturas, barnices, colas, pegamentos, decapantes, tintas, lacas, insecticidas, herbicidas, productos de limpieza y limpieza en seco entre otros.	Pinturas, barnices, colas, pegamentos, decapantes, tintas, lacas, insecticidas, herbicidas, productos de limpieza y limpieza en seco	Química Metal Textil Calzado Limpieza Fabricación de materiales eléctricos y electrónicos
	RESORCINOL	Producción de adhesivos especiales y mejoradores de adhesivos de neumáticos y madera. Fabricación de tintes y productos farmacéuticos para la piel	Adhesivos	Madera Automoción Textil Farmacéutico

FAMILIA	SUSTANCIAS	USO	PRODUCTOS DE CONSUMO	ACTIVIDADES LABORALES AFECTADAS
	ESTIRENO	Uso principal en la fabricación de poliestireno y copolímeros de estireno. También se utiliza para la fabricación de pinturas, lacas y barnices; en la industria de papel, pasta de papel y tableros; y la industria de polímeros.	Pinturas, lacas y barnices Espumas de poliestireno	Fabricación de estireno y poliestireno Fabricación, transformación y aplicación de plásticos Mantenimiento y limpieza de industrias relacionadas
	PARAFINAS CLORADAS	Aceites de corte en la fabricación de metales Pirorretardantes y aditivos de caucho, pinturas, revestimientos y selladores Fluidos dieléctricos	Materiales de construcción	Metal Química Fabricación, transformación y aplicación de plásticos Construcción Eléctrico
METALES	PLOMO	En forma metálica se utiliza en barreras de sonido y de radiaciones, munición, pesas de ruedas y de pesca, cubiertas de tejados, componentes electrónicos. En aleaciones se utiliza en acabados metálicos y soldadura. En compuestos químicos se utiliza como componente de baterías eléctricas y acumuladores; PVC, caucho y resinas; pinturas, barnices, esmaltes y vidrio; etc.	Baterías Artículos de PVC duros: persianas Pinturas Pinturas de juguetes Bisutería Consumo de pescado y marisco y otros alimentos	Metal Fundiciones Química Gestión de residuos Fabricación de vidrio Construcción
	CADMIO	Fabricación de baterías de níquel-cadmio Recubrimiento en galvanoplastia Pigmentos (el sulfuro de cadmio se emplea como pigmento amarillo) Aleaciones de bajo punto de fusión Soldaduras Compuestos fosforescentes en televisores Semiconductores Estabilizantes de plásticos como el PVC Pigmento en la fabricación de pintura, como el acrílico, óleo, etc.	Baterías Artículos de PVC Pinturas Pinturas de juguetes Bisutería Consumo de pescado y marisco y otros alimentos	Metal
	NÍQUEL	Fabricación de acero inoxidable Aleaciones Baterías recargables Catálisis Acuñación de moneda Recubrimientos metálicos y fundición	Baterías Consumo de pescado y marisco y otros alimentos	Química Metal Gestión de residuos
	MERCURIO	Fabricación de cloro (clorocauísticas) Fabricación de cloruro de vinilo Baterías Amalgamas dentales Instrumentos de medición y control Alumbrado Instrumentos eléctricos	Amalgamas dentales Consumo de pescado y marisco	Química Metal Gestión de residuos
	COMPUESTOS ORGANOSTÁNICOS TRIBUTILESTAÑO (TBT)	Moluscocida utilizado como agente anti-incrustante en barcos, boyas, muelles, etc. Biocida en albañilería Desinfectante Biocida de sistemas de refrigeración, torres de refrigeración de plantas eléctricas, fábricas de papel y pasta, cerveceras, curtidos y fábricas textiles		Naval Pesquero Construcción Limpieza Limpieza y mantenimiento de torres de refrigeración
	METALOIDES	ARSÉNICO	Preservante de la madera Semiconductor Construcción de diodos láser y LED Aditivo en aleaciones de plomo y latones Insecticida (arseniato de plomo) Herbicidas (arsenito de sodio) Pigmento y en pirotecnia Decolorante en la fabricación del vidrio	Consumo de pescado y marisco y otros alimentos

Tabla 4. Usos de los disruptores endocrinos más conocidos y presencia en los productos de consumo y en el ámbito laboral (Romano, 2012).

Por estos motivos, la presencia de bisfenol A está siendo objeto de estudio a nivel mundial y se relaciona con trastornos reproductivos, metabólicos y cáncer (Jenkins *et al.*, 2011). Tiene actividad estrogénica y se le conoce como uno de los principales disruptores endocrinos presentes en el medioambiente (Alonso-Magdalena *et al.*, 2005).

Está claro que los disruptores endocrinos presentan características toxicológicas particulares:

- actúan a dosis muy bajas
- hay periodos del desarrollo que son especialmente vulnerables , provocando daños que pueden causar efectos sobre la salud a lo largo de toda la vida
- pueden actuar de manera combinada
- pueden producir efectos en varias generaciones
- pueden tener largos periodos de latencia

La exposición a disruptores endocrinos está relacionada con daños para la salud reproductiva en el hombre a nivel de una reducción de la calidad del semen, alteración en el desarrollo fetal resultando en malformaciones congénitas del tracto urogenital (criptorquidia, hipospadia, etc.) y aparición de tumores testiculares.

La criptorquidia es la malformación congénita más común en niños recién nacidos. Afecta entre el 2 y 4% de los niños, pero podría llegar hasta el 9% en algunos países. Se ha observado un incremento del riesgo de desarrollo de criptorquidia por exposición prenatal a DES, PCBs, bifenilos polibromados (PBDE), epóxido de heptacloro, hexaclorobenceno (HCB) y algunos plaguicidas, incluyendo DDT/DDE (Kortenkamp *et al.*, 2012).

Las hipospadias afectan entre el 0,2 y el 4% de los niños recién nacidos, que debido a una reducción de la cantidad de andrógenos, la apertura de la uretra aparece por debajo del pene e incluso cerca del escroto.

El cáncer de próstata es uno de los tumores más frecuentes entre hombres europeos, con una incidencia entre 24-114 casos por 100.000 habitantes. Se ha demostrado que niveles elevados de testosterona y su metabolito DHT en la próstata incrementan el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. La exposición a EDC, en particular plaguicidas organoclorados y organofosforados durante su fabricación y aplicación, así como a PCBs, cadmio y arsénico, está relacionada con su incidencia.

El cáncer de testículo es la neoplasia maligna más frecuente entre hombres de 15 a 34 años, con una incidencia en Europa de 12 casos por cada 100.000 habitantes. Entre los factores de riesgo se encuentra una reducción de la acción de los andrógenos durante la etapa fetal. Se han relacionado varios EDC organoclorados con el cáncer de testículos, incluyendo p,p'-DDT, PCBs y otros plaguicidas organoclorados (Kortenkamp *et al.*, 2012).

En la tabla 5 se detallan los diferentes grupos de disruptores endocrinos con efectos en la salud humana.

Sustancias	Investigados en relación a...												
	Efectos sobre la salud humana												
	Salud reproductiva masculina	Pubertad precoz femenina	Fecundidad femenina	Síndrome de ovarios poliquísticos	Fertilidad femenina	Endometriosis	Fibroides uterinos	Cáncer de mama	Cáncer de próstata	Cáncer de testículos	Cáncer de tiroides	Neurotoxicidad durante el desarrollo	Síndrome metabólico
PCBs, PCDDs, PCDFs*	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
Éteres polibromados (PBDEs)	●	●					●			●		●	●
Compuestos perfluorados (PFCs)			●									●	●
DDT/DDE	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●	●
Plaguicidas	●	●	●		●	●		●	●	●	●	●	●
Metales pesados	●	●	●		●			●	●			●	
Alquifenoles, bisfenol A, parabenos		●		●	●	●		●			●	●	●
Ftalatos	●	●			●	●	●			●		●	●
Farmacéuticos estrogénicos	●				●	●	●	●	●	●	●	●	●
Fitoestrógenos		●	●			●	●	●	●		●	●	
Organoestánicos												●	●

Tabla 5. Grupos de disruptores endocrinos con efectos en la salud humana (Romano, 2012).

*Bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas cloradas (PCDDs), furanos clorados (PCDFs)

1.2.3.2. La temperatura ambiental

Se trata de otro factor ambiental que se ha asociado a una disminución de la calidad seminal y que está relacionado con la contaminación atmosférica. Sabemos que la maduración del espermatozoide se realiza en el epidídimo, donde adquiere su funcionalidad completa a través de una diferenciación morfológica, y que es un proceso dependiente de la temperatura (Dun, 2012). Se sabe que los testículos son sensibles al calor y la temperatura

en el escroto es entre 2°C y 8°C inferior a la del resto del cuerpo. Un incremento de temperatura a este nivel puede acabar afectando a la espermatogénesis provocando un descenso de la concentración, de la viabilidad, de la morfología, de la motilidad, de la integridad del acrosoma y de la estabilidad de la cromatina. Esta situación podría conllevar periodos de subfertilidad de manera temporal o permanente (Maya-Soriano et al., 2015). Por este motivo es importante considerar este factor como posible factor extrínseco que podría alterar la calidad seminal.

Como conclusión, la calidad seminal es un tema de investigación de gran actualidad ya que tiene repercusión sobre la salud reproductiva. Numerosos estudios han demostrado que los factores ambientales podrían tener un efecto negativo sobre la calidad seminal, sin embargo pocos han estudiado los efectos de la contaminación atmosférica y los hábitos de vida. La mayoría de estos estudios muestran limitaciones, ya que pocos han estimado la exposición a nivel individual.

Este proyecto intenta tener una visión más clara de dichos efectos en dos poblaciones diferentes dentro del área geográfica de Catalunya, en diferentes ventanas de exposición y en el que se tienen en cuenta muestras repetidas para cada individuo. Para ello, se realizan estimaciones individuales aplicando los modelos de predicción más avanzados y recopilando información mediante elaborados cuestionarios que servirán como fuente de información importante para estudios sucesivos.

PARTE 2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

El objetivo principal del proyecto es evaluar si existe una asociación entre los factores ambientales y la calidad espermática. Dentro de los factores ambientales, se tendrán en cuenta los hábitos de vida y la exposición a la contaminación atmosférica.

2.1. En individuos sanos y jóvenes

Los objetivos específicos consisten en evaluar:

- la influencia de los hábitos de vida en los parámetros seminales,
- la correlación entre la exposición a diferentes contaminantes atmosféricos y los parámetros seminales,
- si existe un periodo de la espermatogénesis más susceptible a los efectos de los contaminantes atmosféricos,
- el efecto de la temperatura ambiental sobre los parámetros seminales y de qué manera los contaminantes atmosféricos pueden influir en dicho efecto.

2.2. En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

Los objetivos específicos son:

- caracterizar la población masculina que asiste a un centro de reproducción asistida
- describir los hábitos de vida de los pacientes
- evaluar el efecto de los hábitos de vida en los parámetros seminales,
- evaluar la asociación de la contaminación atmosférica con la calidad espermática en hombres que acuden a clínicas de infertilidad, incluyendo sujetos con gran variabilidad de calidad espermática.

2.3. Hipótesis

1. La exposición a la contaminación atmosférica está asociada a una disminución de la calidad espermática en hombres, lo que podría estar asociado a una disminución de la salud reproductiva.
2. La exposición a la contaminación atmosférica está asociada a una disminución de la concentración espermática y a un aumento de la fragmentación del DNA.

3. Los efectos de la contaminación difieren según el periodo de la espermatogénesis en el que el sujeto está expuesto.
4. Algunos contaminantes atmosféricos tendrán más impacto sobre la calidad espermática, como las partículas (PM).
5. Los hábitos de vida influyen en los parámetros seminales.

PARTE 3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño y poblaciones de estudio

3.1.1. Estudios en individuos sanos.

Se trata de un estudio retrospectivo incluyendo un total de 172 varones sanos residentes en Cataluña y que acudieron a un centro de reproducción asistida como candidatos a donantes de semen entre los años 2007 y 2012. Se ha tenido en cuenta el formulario de la entrevista personal realizada e historial médico (anexo 2). La información recopilada hace referencia a las características socio-demográficas, uso de medicación, alergias, hábitos de vida (tabaco, alcohol y/o drogas), historial médico familiar, dirección del domicilio, etc. La recopilación de la información fue llevada a cabo por dos observadores independientes quienes recogieron datos de manera paralela de más de un 20% de los individuos con sus respectivos seminogramas. Luego se comparó la información para validar la consistencia de los datos. Una vez comprobado que la información recogida por ambos observadores era consistente, se procedió a recoger el resto de datos de manera independiente.

Los parámetros recogidos de los seminogramas realizados son: volumen seminal, concentración espermática y movilidad progresiva.

Este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética del Parc Salut Mar, UAB, y los participantes firmaron un consentimiento para su participación en estudios de investigación de forma anónima

3.1.2. Estudio en pacientes de clínicas de Reproducción Asistida.

En este estudio prospectivo se ha propuesto a hombres de parejas que acuden a consulta de infertilidad entre el año 2014 y el primer semestre de 2016, si desean participar en este estudio, sin tener en cuenta los antecedentes de la pareja ni la causa de esterilidad. Así se ha conseguido un amplio espectro de variabilidad en los parámetros seminales. No obstante, se excluirán a los pacientes que presenten infección, tratamiento de quimioterapia o vasectomía.

El reclutamiento se realizó en el mismo centro informando al paciente del estudio durante alguna de las visitas que realizan al centro. Se ha encontrado pacientes que no deseaban participar y otros que aceptan el cuestionario para participar en el estudio. En ese

momento, se entrega un documento informativo sobre el proyecto (anexo 3), el consentimiento que debe firmar el paciente (anexo 4) y un cuestionario amplio de exposición ambiental que recoge información relacionada con los siguientes factores (anexo 5): datos socio-demográficos, ocupación, consumo de tabaco, alcohol y drogas, consumo y uso de agua, consumo de vitaminas, exposición a productos químicos, uso del móvil, actividad física y hábitos dietéticos.

Cada paciente se identifica con un código único numérico y en el momento de entregar una muestra de semen se completa un minicuestionario (anexo 6) de exposición reciente recogiendo información de los principales hábitos de vida durante las 24 horas antes de la eyaculación. En este cuestionario se recoge también información relativa al medio de transporte utilizado para acudir a la consulta, procesos febriles recientes, consumo de antioxidantes, consumo de medicación y uso de saunas de vapor.

Una vez entregada la documentación, hubo pacientes que no la devolvieron, o que no rellenaron correctamente el consentimiento y fueron descartados.

De los pacientes incluidos, se ha podido acceder a la historia clínica reproductiva de los pacientes para tener información acerca de: tipo y tiempo de infertilidad, consumo de medicación, diagnóstico de enfermedades o pruebas genéticas alteradas, hábitos, etc. También se ha podido acceder a los seminogramas realizados con anterioridad, y que por tanto no tienen el correspondiente minicuestionario.

Este estudio prospectivo fue aprobado por el Comité de Ética del Parc de Salut Mar, y cada paciente firmó el consentimiento correspondiente.

3.2. *Parámetros seminales*

3.2.1. *Parámetros clásicos de un seminograma*

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en el propio centro, utilizando contenedores estériles, con un intervalo de abstinencia sexual entre 2 y 5 días. Las muestras de semen se dejaron licuar un mínimo de 20 minutos a 37°C y no más de 45 minutos antes de ser procesadas. Los parámetros seminales que se han tenido en cuenta son: volumen del eyaculado (mL), concentración espermática (mill/mL) y movilidad progresiva (%). El volumen del eyaculado se calculó mediante un tubo cónico graduado, y se utilizó una alícuota para determinar la concentración y la movilidad utilizando un sistema digital de

análisis computerizado (CASA), una cámara de contaje Makler y un microscopio con la platina calefactada a 37°C. Se empleó el objetivo de 20x (anexo 7, procedimiento para la realización de un seminograma).

Se recogieron los siguientes datos del seminograma: volumen (mL), concentración espermática (mill/mL) y porcentaje de movilidad progresiva (ver anexo 7, procedimiento para la realización de un seminograma).

3.2.2. Determinación de la fragmentación del ADN

Esta valoración se realiza sólo con los pacientes que acuden a centros de Reproducción Asistida.

Se determinó también el porcentaje de fragmentación del ADN espermático mediante la técnica del SCSA (Evenson, 2016) utilizando citometría de flujo. Para ello se utilizó un citómetro MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec).



Brevemente, cada muestra de semen se diluyó con el bufer TNE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) hasta obtener una concentración final de 2×10^6 espermatozoides/mL en un volumen final de 200 μ L. Posteriormente, la muestra se trata con la solución ácida (150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, HCl 2N, pH 1.2) y a los 30 segundos se realiza la tinción con naranja de acridina (6 μ g/mL) durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se puede proceder a la adquisición con el citómetro de flujo, realizando un contaje de 5.000 espermatozoides (ver anexo 8, procedimiento para la determinación de la fragmentación del ADN espermático).

El porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado muestra un incremento en la fluorescencia roja, a diferencia de la población no fragmentada que muestra un nivel normal de fluorescencia de color rojo.

Los valores de normalidad para la fragmentación del ADN determinada por la técnica del SCSA son:

- Fragmentación normal: < 25 %
- Fragmentación moderada: entre el 25%-30%
- Fragmentación alterada: > 30%

3.3. Variables de exposición

3.3.1. Contaminación atmosférica

Con el fin de tener en cuenta la variabilidad de las estimaciones de las concentraciones de contaminación atmosférica dentro de la ciudad, hemos calculado a la dirección de cada participante la media de concentración de cada contaminante utilizando los modelos LUR desarrollados dentro del proyecto europeo ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects). ESCAPE es un estudio Europeo que con protocolos estandarizados desarrollo LUR en 36 áreas de estudio en Europa incluyendo Barcelona (figura 4).

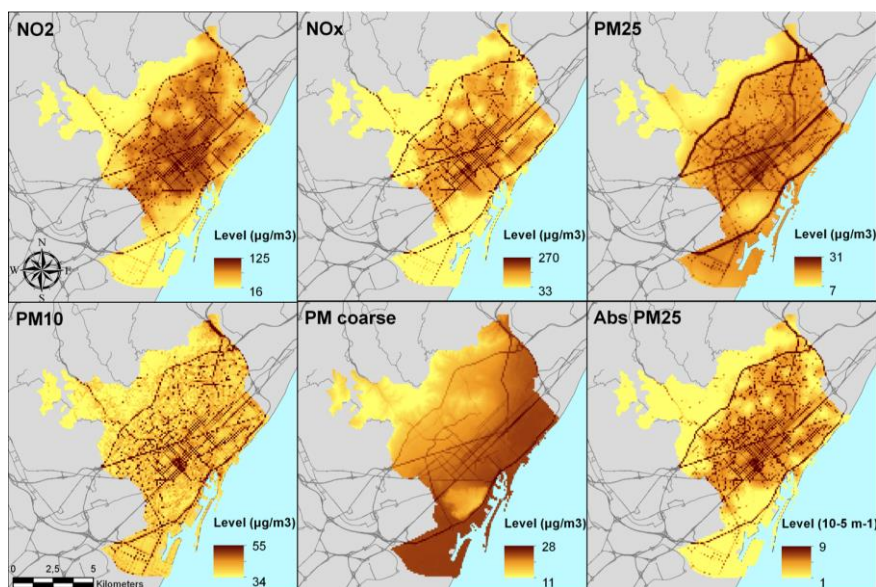


Figura 4. Distribución de los niveles de contaminación atmosférica en Barcelona modelizado mediante modelos de regresión del uso del terreno (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2014)

Existen modelos LUR desarrollados en el proyecto ESCAPE específicos para los principales contaminantes del aire: NO₂ y NO_x (Beelen *et al.*, 2013 y Cyrus *et al.*, 2012) y para las partículas en suspensión (PM) (Eeftens *et al.*, 2012). Para poder desarrollar cada uno de estos modelos se realizó una campaña de monitorización de las medias anuales de cada contaminante. Concretamente en Barcelona, se realizaron en diferentes puntos de la ciudad, 3 campañas de mediciones durante 15 días en un año. Siguiendo el protocolo establecido en ESCAPE (www.escapeproject.eu), en Barcelona se establecieron 20 puntos de medida para las partículas en suspensión (PM) y 40 puntos de medida para el NO₂ y NO_x. Este método utiliza ecuaciones de regresión logística para predecir las concentraciones en

exterior en cualquier punto de la zona de modelado, en función de características urbanas a microescala como la intensidad del tráfico y la densidad de población. Se empleó un sistema de información geográfica (GIS) para almacenar y mapear información sobre las ubicaciones, redes viales, densidad y composición del tráfico, densidad de población, altura y variables meteorológicas.

En la población de individuos jóvenes y sanos se aplicarán los modelos LUR generados y los métodos de regresión logística para examinar la relación entre las diversas estimaciones de contaminación atmosférica por ventana de exposición (media de los 9 días anteriores a la muestra, de los 10-14 días anteriores, de los 70-90 días anteriores y de los 90 días previos) y los diferentes parámetros de calidad espermática. De esta manera se podrá saber si el efecto de la contaminación del aire influye concretamente en alguna fase de la espermatogénesis. El factor de ajuste temporal basado en los datos de monitorización de rutina se realizó siguiendo las pautas marcadas en el proyecto ESCAPE.

3.3.2. Temperatura ambiental

En la población de individuos jóvenes y sanos, se estimó la temperatura ambiental media, mínima y máxima para cada muestra de semen en los períodos entre 0-9 días, 10-14 días, 70-90 días y 0-90 días previos a la eyaculación. Para obtener estas variables hicimos la media diaria de temperatura y humedad para Barcelona utilizando los datos de las 4 estaciones que existen (Zoo, Raval, Zona Universitaria y Observatori Fabra) y los datos de las 3 estaciones para la zona del Vallès (Sabadell, Cerdanyola y Vacarisses). Le asignamos a cada participante las medias ajustadas para la zona 1 (Barcelona) o para la zona 2 (Vallès) dependiendo de su geocódigo.

3.3.3. Hábitos de vida y otros factores sociodemográficos

Se ha realizado una valoración de los principales hábitos de vida en las dos poblaciones estudiadas. A continuación, se describen los hábitos considerados en cada grupo de estudio.

Individuos jóvenes y sanos	
Tabaco	
Alcohol	
Cannabis	
Pacientes de centros de Reproducción Asistida	
Edad, nivel de estudios y jornada laboral	Tabaco
IMC	Alcohol
Exposición ocupacionales	Consumo de agua
Consumo de antioxidantes	Actividad física
Dieta	

Tabla 6. Hábitos de vida y factores sociodemográficos considerados para cada una de las poblaciones de estudio

3.3.3.1. Edad, nivel de estudios y jornada laboral

En individuos jóvenes y sanos

La edad se ha recogido del historial clínico de cada donante (anexo 2), donde también se recoge el nivel de estudios y el estado laboral.

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

En el caso de los pacientes, la información relativa a edad, se recoge en el cuestionario de exposición ambiental (anexo 5) y el nivel socioeconómico se ha establecido a nivel contextual en la sección censal de residencia, utilizando el índice de privación MEDEA (Nolasco *et al.*, 2015).

La edad se ha dividido en percentiles, resultando las siguientes categorías: menores de 35 años, entre 35 y 40 años, y mayores de 40 años.

A través del cuestionario de exposición ambiental (anexo 5) se recoge información relativa al nivel más alto de estudios completado, clasificándose para este estudio en primarios, secundarios o superiores. Además, se recoge información de la situación laboral en función si trabaja a tiempo completo, a tiempo parcial o está en paro.

3.3.3.2. Índice de masa corporal (IMC)

El índice de masa corporal (IMC) asocia la masa y la altura del individuo, y se calcula mediante la siguiente operación:

$$IMC = \frac{kg}{m^2}$$

Se ha calculado el IMC a partir del peso y la altura de cada participante con la intención de valorar el estado nutricional y su relación con la calidad seminal. Según la OMS, se considera un IMC adecuado entre 18,5 y 24,9; sobrepeso entre 25,0 y 29,9, y obesidad cuando es mayor de 30,0.

3.3.3.3. Exposiciones ocupacionales (químicos, gases y temperatura) y uso del móvil

En el cuestionario general de exposición ambiental (anexo 5) se ha tenido en cuenta los tipos de trabajo realizados por el individuo y las posibles exposiciones a sustancias químicas (herbicidas, pesticidas, etc.) y también a temperaturas extremas. Se clasificarán a los pacientes en función de la exposición a: gases, químicos, gases y químicos, y a temperatura.

También se valora la utilización de telefonía móvil, donde se recoge información sobre cómo se usa el móvil (manos libres, etc.) y el lugar donde transporta el móvil cuando no se está utilizando.

3.3.3.4. Tabaco

En individuos jóvenes y sanos

Los hábitos tabáquicos de los individuos jóvenes y sanos aparecen en el cuestionario empleado durante la entrevista personal realizada (anexo 2). En caso de que el individuo declarara que era fumador, se preguntaba el número de cigarrillos fumados al día. Se clasifica a la población en función de si es o no fumador.

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

Inicialmente se ha recogido información del consumo de tabaco en el minicuestionario entregado el mismo día de la eyaculación (anexo 6). En este minicuestionario aparece el número de cigarrillos que se han consumido 24 horas antes.

En el cuestionario general de exposición (anexo 5) también se recoge información mucho más detallada acerca de los hábitos tabáquicos, tipo de tabaco consumido, años de consumo, si es exfumador o fumador pasivo. Se ha contrastado la información declarada por el paciente en el cuestionario con la que aparece en el historial clínico del paciente.

Para cuantificar la exposición al tabaco se ha calculado el consumo por pack-year, como medida estándar de exposición al tabaco. Se calcula multiplicando el número de paquetes de cigarrillos consumidos en un día por el número de años que el individuo lleva fumando.

$\begin{aligned} 1 \text{ pack-year} &= (1 \text{ paquete/día}) \times 1 \text{ año} = (1 \text{ paquete/día}) \times 365.24 \text{ días} = \\ &= 365.24 \text{ paquetes} = 7,305 \text{ cigarrillos} \end{aligned}$
--

3.3.3.5. Alcohol

En individuos jóvenes y sanos

Al igual que en el caso del tabaco, se pregunta al individuo si consume alcohol y la frecuencia de consumo. No se ha tenido en cuenta el tipo de bebida alcohólica y se clasifica a la población en función de si consume o no alcohol.

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

El consumo de alcohol se recoge en el cuestionario general de exposición ambiental (anexo 5) y se consideran las bebidas alcohólicas más habituales: cerveza, vino o cava, licores, coñac, whisky, ginebra, ron y vodka. Se diferencia el consumo entre semana, durante el fin de semana, y el consumo total al mes.

Para unificar la cantidad de alcohol consumido según el tipo de bebida, se han calculado los gramos de alcohol consumidos de la siguiente manera:

$\text{Gramos de alcohol} = ((\text{cantidad en mililitros} \times \text{graduación alcohólica})/100) \times 0.8$

Se considera que la graduación alcohólica para las diferentes bebidas es:

- Cerveza: 5°
- Vino: 12°
- Licores: 30°
- Whisky: 42°
- Ginebra/Ron: 40°

3.3.3.6. Café/Té

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

El consumo de café o té se recoge en el minicuestionario de exposición reciente 24 horas antes del eyaculado (anexo 6). Básicamente se apunta el número de cafés/tés consumidos recientemente con el objetivo de valorar si hay algún efecto asociado al consumo de café 24 horas antes del eyaculado.

3.3.3.7. Cannabis

En individuos jóvenes y sanos

Durante la entrevista realizada a cada individuo se hace referencia al consumo de drogas. En caso afirmativo se anotaba el tipo de sustancia y la frecuencia de uso. Se ha comparado las poblaciones en función del consumo de cannabis.

También se recoge información referente al consumo de medicamentos.

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

Tanto en el minicuestionario como en el cuestionario general se recoge información acerca del consumo de cannabis o cualquier otra sustancia como hachís, cocaína, anfetaminas, etc. Esta información se utilizará para el análisis descriptivo de la población que acude a centros de Reproducción Asistida.

3.3.3.8. Consumo y uso de agua

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

En el cuestionario general (anexo 5) se recoge información relativa al tipo de vivienda, altura en la que reside, tamaño de la vivienda, número de personas que residen en la vivienda, uso de aire acondicionado/calefacción. También se ha considerado la cantidad de agua consumida al día, la procedencia del agua, la utilización de filtros específicos para el agua, la frecuencia que realiza duchas o baños, así como el uso de piscinas y saunas.

También se recoge información acerca del tipo de cocina utilizada (gas o eléctrica), hábitos de limpieza doméstica y productos de limpieza utilizados

3.3.3.9. Actividad física

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

En el cuestionario de exposición general (anexo 5) se ha definido la diferencia entre actividad vigorosa y actividad moderada, y se recoge información acerca del número de veces que se realiza la actividad a la semana y del tiempo dedicado.

Actividad física vigorosa: aquel ejercicio que requiere gran esfuerzo, provoca una respiración rápida y un incremento sustancial de la frecuencia cardíaca. Incluye squash, correr, hacer pesas, natación, ciclismo rápido, deportes de competición.

Actividad física moderada: aquel ejercicio que acelera de forma perceptible el ritmo cardíaco. Incluye carpintería, aerobio, jogging, natación (no de competición), básquet, tenis etc.

3.3.3.10. Hábitos dietéticos

En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

Por último, se ha aplicado un cuestionario general de hábitos dietéticos (anexo 5) para saber si se consume productos biológicos, antioxidantes y los hábitos alimenticios en los principales grupos de alimentos.

Para valorar los hábitos dietéticos, considerando el modelo de dieta Mediterráneo, se han considerado la puntuación de la tabla 7 (Martínez-González *et al.*, 2004). Se han establecido 2 categorías:

- Categoría 1: dieta menos saludable con una puntuación de 1 a 3 puntos
- Categoría 2: dieta más saludable con una puntuación de 4 a 6 puntos

	Puntos
Aceite de oliva (≥ 1 cucharada/día)	+1
Fruta (≥ 1 pieza/día)	+1
Vegetales o ensalada (≥ 1 ración/día)	+1
Fruta (≥ 1 pieza/día) y vegetales (≥ 1 ración/día) ^a	+1
Legumbres (≥ 2 raciones/semana)	+1
Pescado (≥ 3 raciones/semana)	+1
Carne (< 1 ración/día)	+1
Vino (≥ 1 vaso/día)	+1

Tabla 7. Hábitos dietéticos considerados en el cuestionario de exposición y puntuación asignada (Martínez-González *et al.*, 2004).

^aUn punto es añadido cuando se consumen una o más raciones al día tanto de frutas como de verduras .

3.4. Análisis estadístico

3.4.1. En individuos jóvenes y sanos

Se realiza un estudio descriptivo de la población y sus hábitos de vida, así como de la media de los contaminantes atmosféricos y la media de temperatura ambiental durante el período del estudio.

3.4.1.1. Hábitos de vida

Como los hábitos de vida sólo se miden una vez, en el registro clínico, se hace la media de todos los seminogramas de cada participante para cada parámetro seminal: volumen, concentración espermática y movilidad progresiva. Se mide la asociación entre cada parámetro seminal y los siguientes hábitos de vida: tabaco, alcohol, cannabis y medicación, con regresiones lineales.

3.4.1.2. Contaminantes atmosféricos y temperatura ambiental

Para evaluar la asociación entre cada contaminante del aire o la temperatura ambiental y los parámetros seminales, se utilizaron diferentes modelos según las características de cada parámetro. Para la concentración se utilizaron regresiones binomiales negativas, para el volumen se utilizó una regresión lineal logarítmica transformada y para la movilidad progresiva se utilizó una regresión Tobit censurada al tratarse de un porcentaje. Las estimaciones, derivadas de modelos mixtos para tener en cuenta las mediciones repetidas, se ajustaron por edad, tabaquismo y un indicador socioeconómico (SES).

Realizamos modelos independientes para cada contaminante y también para la temperatura media, para cada período de exposición. Posteriormente, se realizaron modelos que combinan cada contaminante y la temperatura para cada período de exposición, para evaluar si el efecto de la temperatura y de los contaminantes son independientes.

La asociación entre la temperatura y los parámetros seminales se evaluó mediante modelos mixtos para tomar en cuenta la repetitividad y se ajustó por edad, tabaco y nivel socio-económico a nivel contextual. En una evaluación posterior, se ajustó también por cada uno de los contaminantes.

3.4.2. En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

Se realiza un estudio descriptivo de la población, así como de sus hábitos de vida.

3.4.2.1. Hábitos de vida

A partir de la información recogida del minicuestionario (anexo 6), se ha realizado un estudio para valorar la asociación entre el consumo de tabaco, café y té en las 24 horas previas al análisis seminal respecto a los diferentes parámetros seminales. Para la comparación de medias de los diferentes parámetros seminales en función de los hábitos de vida como variables de dos categorías se utilizó el test de t-student.

Utilizando el cuestionario general de exposición ambiental (anexo 5) se ha considerado el efecto de diferentes factores relacionados con los hábitos de vida sobre los parámetros seminales. Para los parámetros seminales de los seminogramas aportados por cada paciente, se ha establecido la media (SD) para las variables continuas con distribución normal (volumen, movilidad y fragmentación) y la mediana (IQR) para las variables continuas sin

distribución normal (concentración y morfología). Luego se ha estudiado la asociación entre los diferentes hábitos y dichos parámetros, aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA para variables normales (volumen, movilidad progresiva y fragmentación del ADN), o un test Kruskal Wallis para variables no normales (concentración espermática y morfología). El análisis se ha realizado agrupando a la población en tres subgrupos: todos los pacientes, pacientes con concentraciones inferiores a 50 mill/mL y pacientes con factor masculino.

Finalmente, se ha realizado un análisis de regresión lineal multivariante para cada parámetro seminal y los diferentes factores ambientales. Dicho análisis se ha realizado agrupando a la población en tres subgrupos: todos los pacientes, pacientes con concentraciones inferiores a 50 mill/mL y pacientes con factor masculino.

Para los análisis estadísticos se ha empleado el paquete estadístico Stata, ver 14.2.

3.4.2.2. Contaminantes atmosféricos

A partir del año 2016, tras conseguir financiación a través de un FIS, se decidió ampliar el estudio aumentando el reclutamiento de pacientes y a partir de esa fecha, se extrae una muestra de sangre y otra de orina que es procesada y congelada para futuros estudios.

Por tanto, actualmente se está reclutando nuevos casos para intentar conseguir la participación de unos 300 pacientes, momento en el que se aplicarán los modelos LUR para establecer las concentraciones de contaminación del aire para cada individuo y de esa manera poder relacionarlo con los parámetros seminales.

Queda por tanto desarrollar esta última parte del proyecto y está previsto acabar la nueva fase de reclutamiento a finales del año 2017.

PARTE 4. RESULTADOS

4.1. Estudios en individuos jóvenes y sanos

4.1.1. Análisis descriptivo

La edad media de los 172 participantes era de $24,6 \pm 4,2$ años, y se han considerado un total de 597 seminogramas. Tanto las medias de los parámetros seminales de los participantes, como sus hábitos de vida aparecen en la Tabla 8.

Características de la población	Mean \pm SD
Edad (años)	24,4 \pm 4,1
Altura (m)	1,77 \pm 0,06
Peso (kg)	73,13 \pm 9,6
Parámetros seminales	
Volumen (mL)	3,5 \pm 1,7
Concentración espermática (mill/mL)	93,4 \pm 55,1
Movilidad progresiva (%)	52,4 \pm 16,0
Hábitos de vida	
Tabaco	58 (33,7)
Consumo alcohol	132 (76,3)
Consumo de cannabis	18 (10,5)
Uso de medicamentos	9 (5,3)

Tabla 8. Características y hábitos de vida de la población de estudio

Contaminante atmosférico	Media (SD)	Valores límite (OMS)
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	51.2 (16)	40
NO _x ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	87.2 (32.7)	-
PM ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	38.4 (6.2)	20
PM coarse ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	20.4 (3.2)	-
PM _{2.5} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	16.7 (3.5)	10
PM _{2.5} absorbance (1 unit)	2.7 (0.9)	-
Temperatura ambiental (°C)	16 (5)	-

Tabla 9. Descripción de los contaminantes atmosféricos modelizados a la dirección del participante sin extrapolación temporal y los valores de temperatura ambiental mostrados como medias de los tres meses anteriores a cada eyaculado.

Media (SD) en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ excepto para PM_{2.5}absorbance en $10^{-5} \cdot \text{m}^{-1}$. Temperatura ambiental expresada en °C.

En la Tabla 9 se presenta la media anual del año 2009 de contaminantes atmosféricos y temperatura ambiental modelizadas al domicilio de cada participante. Se observa que las medias superan los valores recomendados fijados por la Organización Mundial de la Salud.

4.1.2. Hábitos de vida

En la Tabla 10 se presentan los resultados de las regresiones lineales realizadas para cada parámetro seminal considerando cada uno de los hábitos de vida. Los coeficientes (β) muestran el cambio en la desviación estándar para cada parámetro seminal en relación al hábito de vida.

Los resultados obtenidos indican que el tabaco afecta a la movilidad progresiva de los espermatozoides, aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa ($\beta = -2,141$; $p = 0,352$). Se detecta un incremento significativo de la concentración espermática en aquellos individuos que consumen alcohol de forma moderada ($\beta = 1,348$; $p = 0,003$).

El consumo de cannabis produce un descenso estadísticamente significativo del volumen del eyaculado ($\beta = -0,277$; $p = 0,028$).

El uso de medicamentos también se asocia a una disminución del volumen del eyaculado y de la movilidad progresiva, aunque no es estadísticamente significativo.

	Volumen		Concentración espermática		Movilidad progresiva (%)	
	β (95% CI)	p value	IRR (95% CI)	p value	β (95% CI)	p value
Tabaco	0,050 (-0,113/0,213)	0,547	0,965 (0,817/1,139)	0,674	-2,141 (-6,650/2,369)	0,352
Alcohol	0,138 (-0,041/0,316)	0,130	1,348 (1,110/1,636)	0,003	-0,686 (-5,643/4,272)	0,786
Cannabis	-0,277 (-0,524/ -0,030)	0,028	0,936 (0,740/1,184)	0,583	-0,007 (-6,909/6,896)	0,998
Medicación	-0,048 (-0,399/0,303)	0,789	0,929 (0,638/1,352)	0,699	-2,443 (-12,092/7,206)	0,620

Tabla 10. Resultados de los efectos de los hábitos de vida sobre los parámetros seminales en individuos sanos. Se muestra en negrita estimaciones significativas con un $p < 0.05$

4.1.3. Contaminación atmosférica y temperatura ambiental

En las figuras 5, 6 y 7 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal multivariante según el parámetro seminal y considerando los intervalos de tiempo con ventanas de exposición entre 0-9, 10-14, 70-90 y 0-90 días antes del eyaculado, y ajustado por variables como: (A) la edad, el tabaco y el nivel socioeconómico; (B) la edad, el tabaco, el nivel socioeconómico y la temperatura; (C) se considera el efecto de la temperatura ajustado por la edad, el tabaco, el nivel socioeconómico y el contaminante atmosférico.

Volumen del eyaculado. Se detecta una disminución del volumen estadísticamente significativa para la exposición al NO₂ ($\beta = -0,016$ y $p = 0,035$), NO_x ($\beta = -0,013$ y $p = 0,018$) y PM_{2.5abs} ($\beta = -0,032$ y $p = 0,002$) siempre para el periodo de 10-14 días antes del eyaculado cuando se ajusta por edad, tabaco y nivel socioeconómico (Fig. 5A).

Por otro lado, también se detecta un aumento del volumen del eyaculado para la exposición a PM₁₀ ($\beta = 0,068$ y $p = 0,041$), PM_{coarse} ($\beta = 0,012$ y $p = 0,043$) y PM_{2.5} ($\beta = 0,079$ y $p = 0,025$) siempre en el intervalo de 0 a 90 días antes del eyaculado (Fig. 5A). Aunque la figura 5A y 5B son muy parecidas, hay que destacar que cuando se tiene en cuenta el factor temperatura, los valores de las betas disminuyen ligeramente. La figura 5C muestra el efecto de la temperatura en el volumen del eyaculado. El intervalo de 70-90 días antes de la eyaculación es el efecto más negativo detectado teniendo en cuenta la temperatura en cada uno de los contaminantes, aunque sin detectar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

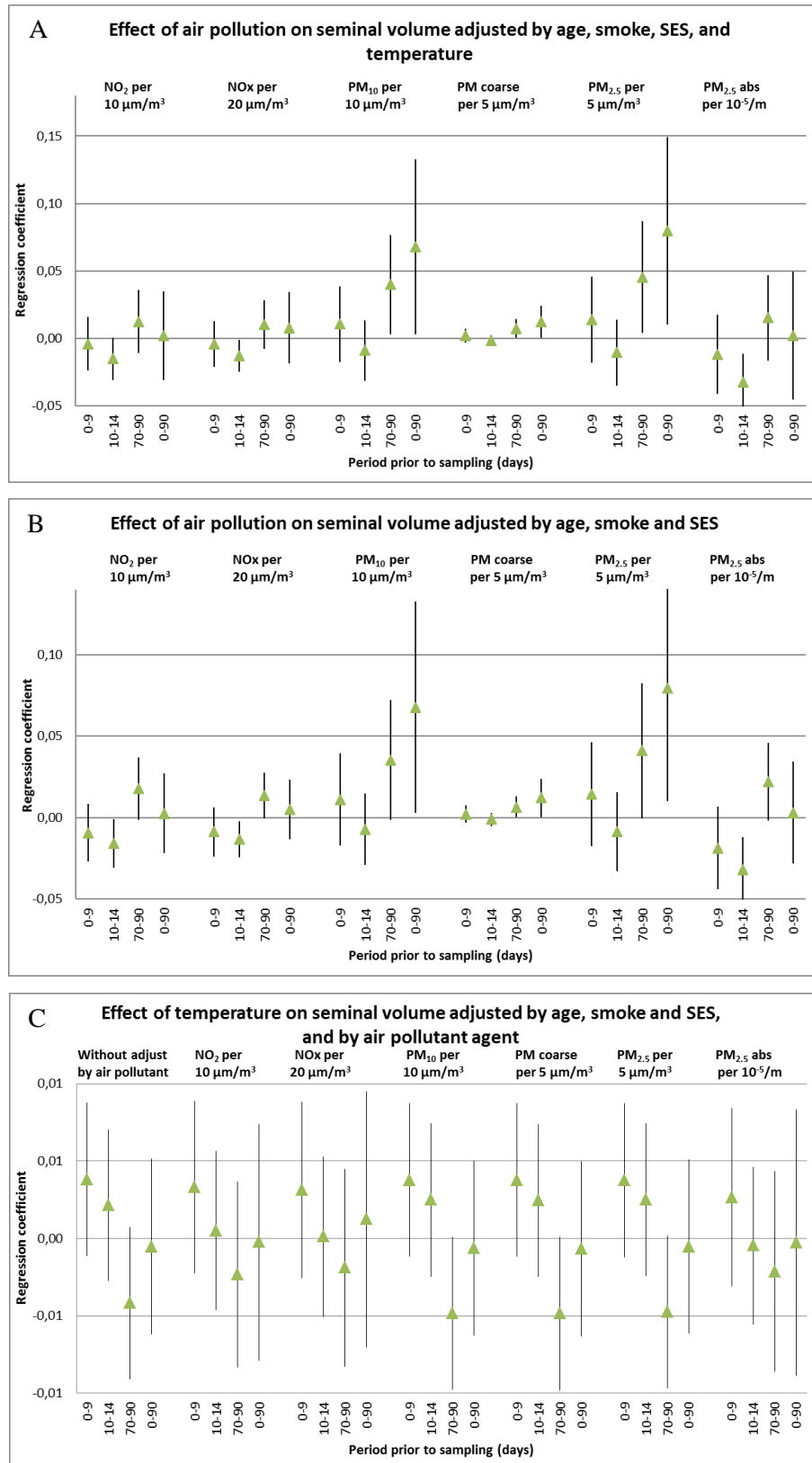


Figura 5. (A) Asociación entre el volumen seminal y los diferentes contaminantes a diferentes intervalos de tiempo y ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico (SES). (B) Ajustado también por temperatura ambiental. (C) Considerando sólo el efecto de la temperatura ambiental ajustado por los otros factores. Coeficientes (95% CI).

Concentración espermática. No se detecta que la exposición a los contaminantes ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico afecte a la concentración de espermatozoides excepto para la exposición al NO_x (0-90 días: $\beta= 1,027$ y $p= 0,038$), con un aumento estadísticamente significativo (Fig. 6A). Sin embargo, al ajustar también por temperatura (Fig. 6B), desaparece el efecto de la exposición detectado con el NO_x (0-90 días) y no se detecta ningún efecto significativo.

Es cuando tenemos en cuenta sólo la temperatura ajustado por los demás factores cuando se detecta una disminución de la concentración estadísticamente significativa prácticamente para todas las ventanas de exposición, excepto para NO₂ (0-9 días) y NO_x (0-9 días) y NO_x (70-90 días) (Fig. 6C).

Movilidad progresiva. Cuando se ajusta por edad, tabaco y nivel socioeconómico, se detecta un incremento de la movilidad progresiva para las siguientes contaminantes y ventanas de exposiciones: NO₂ (70-90 días: $\beta=1,07$ y $p= 0,007$; 0-90 días: $\beta= 1,294$ y $p= 0,007$), NO_x (70-90 días: $\beta=1,002$ y $p= 0,001$; 0-90 días: $\beta= 1,101$ y $p= 0,004$) y PM_{2.5}absorbance (70-90 días: $\beta=1,83$ y $p= 0,000$; 0-90 días: $\beta= 2,064$ y $p= 0,002$) (Fig. 7A). Al igual que con el volumen, cuando se ajusta el modelo por temperatura (Fig. 7B), los coeficientes de regresión disminuyen en la mayoría de los casos y no aparece ningún aumento ni descenso estadísticamente significativo.

Al considerar sólo el efecto de la temperatura (Fig. 7C), se detecta un descenso global de la movilidad progresiva, después de ajustar por cada uno de los contaminantes y para todas las ventanas de exposición ($p<0.05$).

Todos estos datos se analizaron incluyendo sólo con aquellos participantes que residían en Barcelona ciudad, donde los modelos de contaminación son más exactos, o solo incluyendo los participantes con geocodificación de alta precisión, o con solo incluyendo los no fumadores, y en ninguno de los casos se modificaban estos resultados (datos no mostrados).

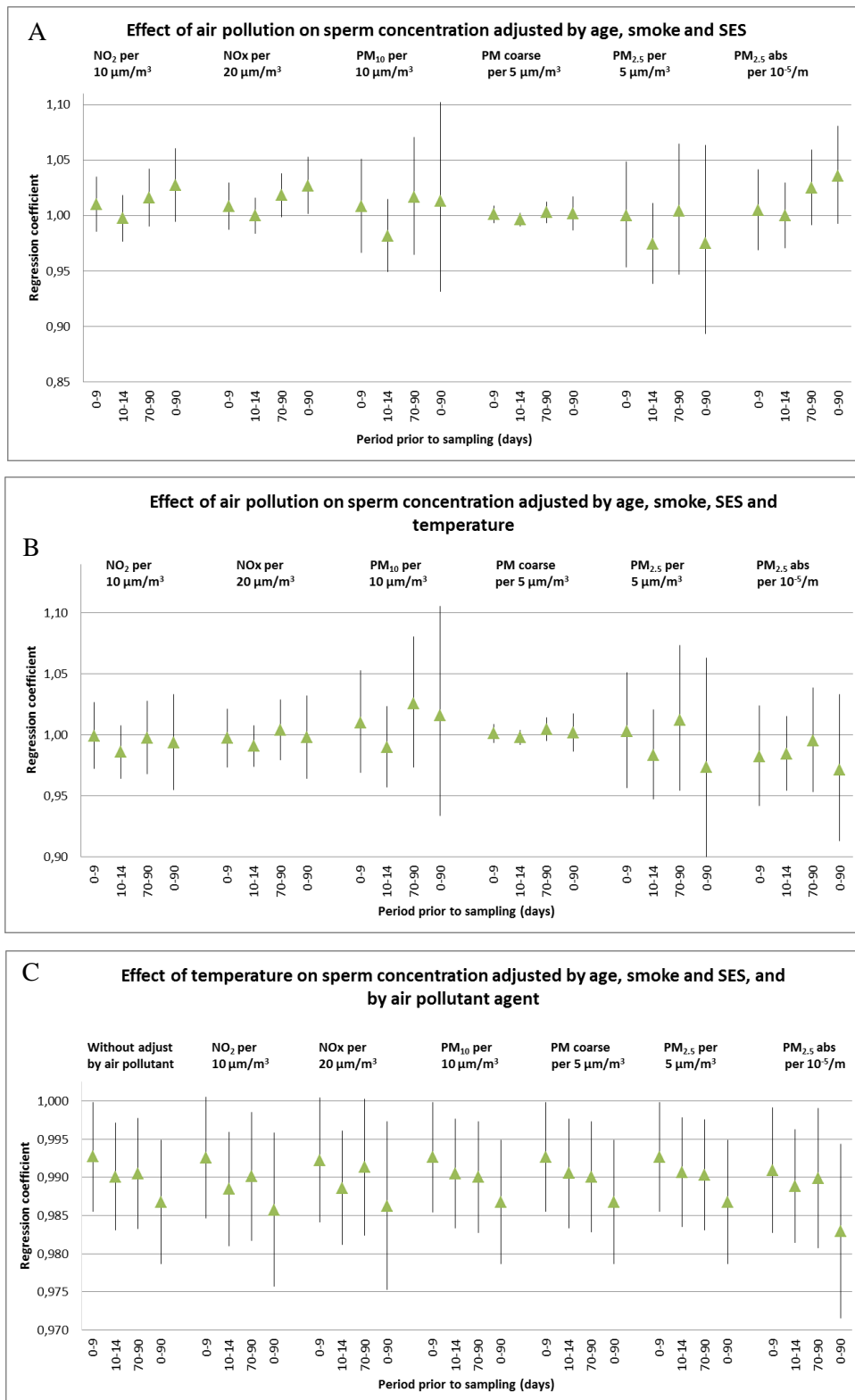


Figura 6. (A) Asociación entre la concentración espermática y los diferentes contaminantes a diferentes intervalos de tiempo y ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico (SES). (B) Ajustado también por temperatura ambiental. (C) Considerando sólo el efecto de la temperatura ambiental ajustado por los otros factores. Coeficientes (95% CI).

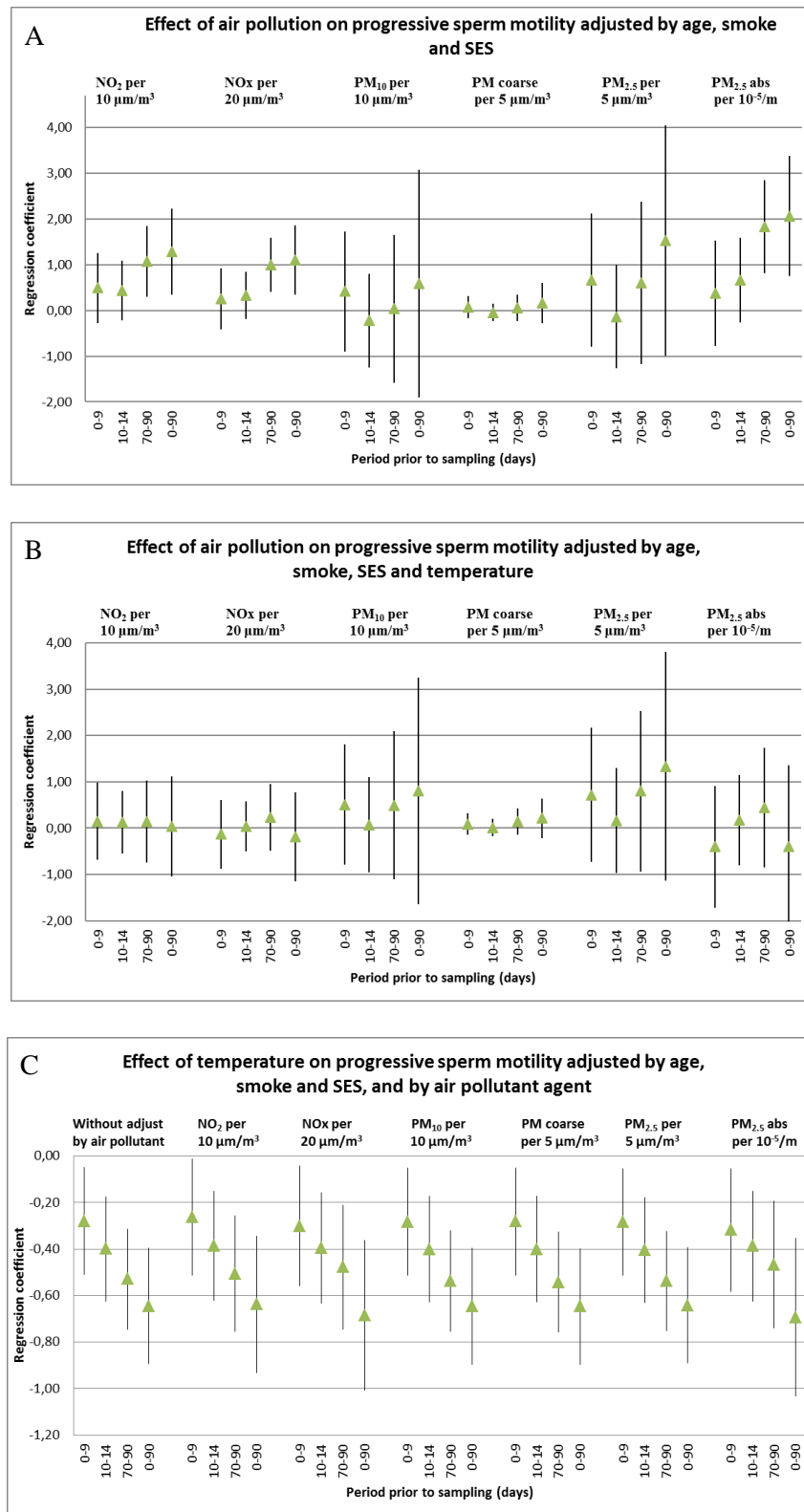


Figura 7. (A) Asociación entre la movilidad progresiva y los diferentes contaminantes a diferentes intervalos de tiempo y ajustado por edad, tabaco y nivel socioeconómico (SES). (B) Ajustado también por temperatura ambiental. (C) Considerando sólo el efecto de la temperatura ambiental ajustado por los otros factores. Coeficientes (95% CI).

4.2. Estudios en pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

4.2.1. Análisis descriptivo

En la primera fase de reclutamiento que comienza en enero de 2014 hasta junio de 2016 se contactó con 661 pacientes, seis de los cuales reusaron participar y rechazaron llevarse el cuestionario. Por tanto se han entregado un total de 655 cuestionarios de exposición ambiental, con un total de 1.314 seminogramas realizados. Se han podido recuperar rellenos 242 cuestionarios, que representa un 37,0% de los entregados. Lamentablemente, 12 pacientes que devolvieron el cuestionario, no firmaron el consentimiento y fueron excluidos. Finalmente se incluyen en el estudio 230 pacientes que aportan un total de 886 seminogramas.

Para evaluar el posible sesgo de selección, se ha podido acceder a la información básica de los seminogramas de aquellos pacientes que recibieron el cuestionario pero que no lo rellenaron. Se utiliza la información disponible en el laboratorio, sin realizar ninguna consultar directamente en su historial clínico (tabla 11). La media de edad del grupo de pacientes que no devuelven el cuestionario es de 38,7 años, mientras que la media de edad del grupo de pacientes incluidos es de 37,6 años sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Después de realizar una comparación de medias (t-student) entre cada parámetro de cada uno de los dos grupos, encontramos que sólo hay diferencias estadísticamente significativas para la morfología espermática ($p=0,000$), que es mejor en el grupo de pacientes que no devuelven el cuestionario. La media de concentración también es más elevada en este grupo, y el hecho de tener unos parámetros altos quizás sea una explicación de la falta de motivación para participar en proyectos de investigación relacionados con la infertilidad masculina.

Parámetros seminales	Pacientes incluidos n=230					Pacientes que no devuelven el cuestionario n=425				p valor
	n	Media	SD	Min	Max	Media	SD	Min	Max	
Volumen (mL)	230	3,0	1,3	0,6	8,5	2,9	1,6	0,2	9,6	0,416
Concentración (Mill/mL)	230	83,1	80,7	0,2	516,9	98,5	117,8	0,2	974,4	0,077
Movilidad progresiva (% A+B)	230	39,6	17,2	0,0	86,4	39,6	20,1	0,4	95,0	1,000
Formas normales (%)	123	3,6	1,9	1,0	10,0	4,0	1,0	3,0	5,0	0,000
Fragmentación ADN (%)	226	22,9	10,0	4,0	61,3	23,2	11,2	3,7	72,8	0,734

Tabla 11. Comparación de los parámetros seminales entre los pacientes incluidos en el estudio y los pacientes que no devolvieron el cuestionario.

En la tabla 12 se hace un análisis descriptivo de los principales parámetros seminales considerados para los 230 individuos incluidos. Se muestra la media de todos los seminogramas agrupados por pacientes, con la desviación estándar, los valores mínimos y máximos, así como la mediana y el primer y tercer cuartil. La media de seminogramas realizados por paciente fue de 3,8.

Parámetros seminales*	n	Media	SD	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Volumen (mL)	230	3,0	1,3	0,6	2,0	2,8	3,9	8,5
Concentración (Mill/mL)	230	83,1	80,7	0,2	26,3	59,7	117,2	516,9
Movilidad progresiva (% A+B)	230	39,6	17,2	0,0	27,2	39,7	51,0	86,4
Formas normales (%)	123	3,6	1,9	1,0	2,5	3,0	4,0	10,0
Fragmentación ADN (%)	226	22,9	10,0	4,0	15,7	22,0	28,1	61,3

Tabla 12. Análisis descriptivo de los parámetros seminales del total de la población incluida en el estudio y que acude a un centro de Reproducción Asistida.

*El volumen, la movilidad y la fragmentación del ADN siguen una distribución normal

*La concentración y morfología siguen una distribución no normal

Con el fin de tener más información acerca de los individuos que acuden a un centro de Reproducción Asistida, en la tabla 13 se clasifican a los participantes en función de las alteraciones en los parámetros seminales tal y como se describe en el manual de la OMS,

2010 (Cooper, 2010). De forma más visual, puede verse dicha clasificación en la figura 8, donde el parámetro más alterado es la morfología, detectándose teratozoospermia en un 62,6% de los pacientes. La astenozoospermia afecta al 35,8% de los pacientes y la oligozoospermia al 14,4% de los pacientes. En total hay 44 pacientes (18,1%) que son normozoospermicos. Se detecta una fragmentación del ADN moderada o alta en el 34,1% de los pacientes.

Parámetros seminales	n (%)	Media	SD	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Concentración < 15 mill/mL	35 (14,4%)	5,7	4,5	0,2	1,0	4,1	9,5	14,9
Movilidad progresiva < 32,0%	87 (35,8%)	21,1	8,3	0	16,0	22,5	28,3	32,0
Formas normales < 4%	77 (62,6%)	2,5	0,73	1	2,0	3,0	3,0	3,5
Fragmentación ADN > 25%	77 (34,1%)	33,8	7,61	25,3	28,1	31,7	36,9	61,3

Tabla 13. Análisis de los parámetros seminales restringiendo la población en los que presentan alguna alteración en los principales parámetros seminales según OMS 2010.

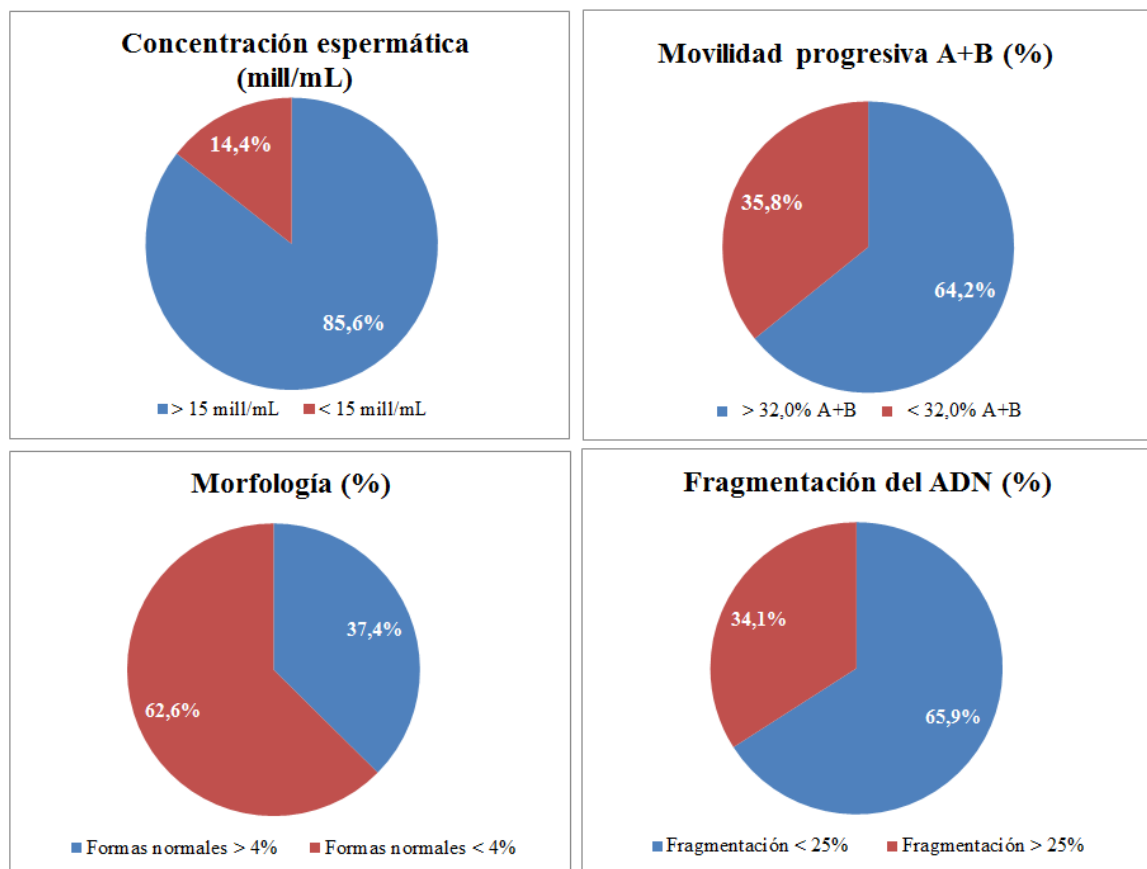


Figura 8. Alteraciones de los parámetros seminales estudiados en la población de individuos que acude a centros de Reproducción Asistida

Para poder valorar el efecto de los diferentes factores ambientales, se han considerado tres subgrupos dentro de la población:

- Pacientes totales (n=230)
- Pacientes con una concentración de menos de 50 mill/mL (n=101). No se considera concentraciones inferiores para intentar mantener un mínimo número de casos
- Pacientes con factor masculino descrito en la historia clínica (n=93)

4.2.2 Hábitos de vida

4.2.2.1. Asociación entre calidad seminal y hábitos de vida en las 24 horas previas al análisis seminal

A través del minicuestionario, se ha realizado una evaluación de la exposición reciente (24 horas antes del eyaculado) incluyendo un total de 209 pacientes, con una media de edad de 38.5 años, y que aportan un total de 245 seminogramas. Se ha evaluado hábitos de vida relacionados con el consumo de tabaco y café o té.

Hay un 22,4% de los pacientes que declaran ser fumadores y además, han fumado 24 horas antes de entregar la muestra (figura 8). El 70,2% de los pacientes son consumidores de café o té, y lo han consumido en las últimas 24 horas antes de la eyaculación.

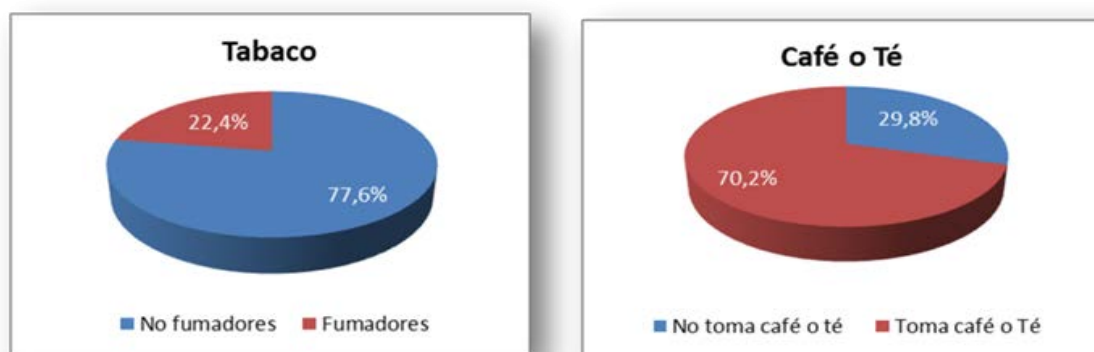


Figura 9. Proporción de pacientes que acuden a un centro de Reproducción Asistida que consume tabaco, café o té

En la tabla 14 se resumen los resultados obtenidos y se presentan las medias de cada uno de los parámetros. Se realiza una comparación de medias mediante el test t-student y sólo se detecta diferencias estadísticamente significativas con las medias de la fragmentación del ADN espermático en los pacientes que consumen café o té, existiendo una fragmentación del ADN espermático más bajo en los pacientes consumidores de café o té.

Medias n = 209	Edad	Volumen (mL)	Concentración (Mill/mL)	Movilidad progresiva A+B (%)	Fragmentación ADN (%)
No fumadores	38,2	3,1	118,4	41,5	24,1
Fumadores	39,1	3,0	72,6	36,7	22,3
No toman café/té	38,3	2,9	81,9	39,5	25,1
Toman café/té	38,1	3,0	103,0	41,7	21,9

Tabla 14. Medias de los parámetros seminales al evaluar hábitos de vida 24 horas previas al seminograma en pacientes. Se realiza una comparación de medias mediante el test t-student.

4.2.2.2. Asociación entre los factores ambientales y los parámetros seminales a través del cuestionario de exposición ambiental

El 71,6% de los pacientes son mayores de 35 años, el 55,6% tienen estudios superiores, el 92,4% trabaja a tiempo completo, 38,2% tienen sobrepeso y el 15,8% son obesos. Un 47,6% no fuman, y si lo hacen más de la mitad fuman menos de 10 paquete/año. Hasta el 89,2% declaran beber alcohol, aunque sólo el 23,5% supera 7g de alcohol/día. Está establecido como recomendación de la OMS no superar los 30g de alcohol al día (WHO, 2008). Respecto al consumo de agua, prácticamente la mitad bebe entre 1-2 L de agua, la mayoría embotellada (57,4%).

Un 20,1% de los individuos está expuesto a factores tóxicos: temperatura (4,5%), químicos y gases (8,0%) y sólo químicos (7,6%). Respecto a la actividad física, un 15,4% no realiza ningún tipo de actividad. Hay un consumo de antioxidantes por parte del 26,8% de los individuos y los que realizan una dieta más sana corresponde al 37,3% de los individuos.

En las tablas 15-19 se muestran los resultados de los análisis de varianzas entre los diferentes factores ambientales y cada uno de los parámetros seminales, considerando tres subpoblaciones diferentes: todos los pacientes, pacientes con una concentración menor de 50 mill/mL y pacientes con factor masculino.

De la misma manera, en las tablas 20-24 se muestran los resultados de los análisis de regresión lineal múltiple entre los diferentes factores ambientales y cada uno de los parámetros seminales, considerando tres subpoblaciones diferentes: todos los pacientes, pacientes con una concentración menor de 50 mill/mL y pacientes con factor masculino.

Edad, nivel de estudios, estado laboral e IMC

En el grupo de pacientes con una concentración menor de 50 mill/mL, tras realizar un análisis de la varianza, se detecta un aumento estadísticamente significativo de la fragmentación del ADN ($p=0,046$) con la edad. Se detectan medias de fragmentación moderadamente altas, con repercusión clínica en todos los pacientes mayores de 40 años (tabla 19).

Al realizar el análisis de regresión multivariante, a partir de los 40 años disminuye la concentración, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. La movilidad sí disminuye significativamente, tanto para el tramo de 35-40 años ($\beta= -5,59$; $p= 0,080$), como a partir de los 40 años ($\beta= -9,26$; $p= 0,006$) (tabla 22). Se observa también que los mayores de 40 años tienen más elevada la fragmentación del ADN ($\beta= 6,21$; $p= 0,002$).

Se observa que los pacientes con estudios superiores tienen mayor concentración espermática ($p=0,032$) y mayor movilidad progresiva ($p=0,049$) (tablas 16 y 17). Además, y aunque son pocos casos, los pacientes que están en paro son los que presentan mayor fragmentación del ADN espermático ($p=0,032$) (tabla 19).

A nivel del IMC, con el análisis de varianzas se detecta una mejoría en morfología espermática ($p=0,020$) con el aumento del IMC. Además, después de realizar el análisis de regresión lineal multivariante, el sobrepeso y la obesidad mejoran la movilidad ($\beta= 7,36$; $p= 0,010$ y $\beta= 10,38$; $p= 0,013$, respectivamente) y se detecta una mejora de la morfología tanto en pacientes con sobrepeso ($\beta= 1,21$; $p= 0,018$) como en obesos ($\beta= 2,00$; $p= 0,005$) (tablas 22 y 23).

Tabaco

Un 52,4% de los pacientes son fumadores o exfumadores y son los que presentan una menor concentración espermática, en comparación con los fumadores, aunque no es

significativo. A nivel de movilidad progresiva y fragmentación del ADN no se observan diferencias. Se detecta una mejora de la morfología en los pacientes exfumadores ($p=0,031$).

También se ha realizado una clasificación en función de la cantidad de tabaco consumido en paquete/año. Se observa que los pacientes que consumen más tabaco, con más de 15 paquete/año, tienen menor movilidad progresiva ($p>0,005$) y sobre todo peor fragmentación del ADN, con un efecto negativo a nivel clínico, ya que se alcanza una fragmentación del ADN moderado, en comparación con los pacientes que fuman poco (< 10 paquete/año). No obstante, tampoco se ha obtenido significancia estadística (tabla 19).

Tras realizar la regresión lineal multivariante se observa que el exfumador tiene una mejor morfología espermática ($\beta= 1,18$; $p=0,029$) que el fumador ($\beta= 1,04$; $p= 0,081$) (tabla 23).

Finalmente, no se ha considerado a los pacientes que declaran consumir cannabis u otro tipo de drogas, ya son muy pocos quienes lo reportan en el cuestionario.

Alcohol

Un 10,9% de los pacientes declaran que no beben alcohol, presentando una mediana de concentración espermática más elevada que el resto de pacientes que sí consumen alcohol, aunque no estadísticamente significativa. Para el grupo con factor masculino, también se asocia el alcohol con un aumento de la fragmentación del ADN ($p=0,007$) (tablas 16 y 19)

La regresión logística multivariante nos indica que el consumo de alcohol disminuye la concentración espermática tanto para todos los pacientes ($\beta= -43,85$; $p=0,044$) como para el grupo de pacientes con factor masculino ($\beta= -124,48$; $p=0,020$) (tabla 21).

Consumo de agua

No se encuentra ninguna asociación respecto al volumen de agua que se bebe al día, pero se detecta en el grupo de pacientes con factor masculino que la concentración disminuye y la fragmentación aumenta significativamente cuando se consume agua de grifo con filtro en comparación con los que consumen agua sin filtro ($p=0,014$ y $p=0,018$ respectivamente). La movilidad también se ve disminuida en el mismo grupo de pacientes con una significancia de $p=0,056$ (tablas 16, 17 y 19).

Tras la regresión multivariante se observa que, en el grupo con factor masculino, el consumo de agua embotellada aumenta el volumen del eyaculado ($\beta= 0,87$; $p= 0,029$), y disminuye la fragmentación del ADN casi significativamente ($\beta= -7,14$; $p= 0,054$). Por otro lado, el agua de grifo sin filtro se asocia a un aumento de la concentración espermática ($\beta= 62,88$; $p= 0,047$) (tablas 20, 21 y 24).

Exposiciones laborables

Se detecta un efecto significativo disminuyendo la concentración ($p=0,040$) y la movilidad espermática ($p=0,043$) cuando hay una exposición ocupacional, sobre todo a temperatura y químicos (tablas 16 y 17). El efecto en la movilidad se detecta en todos los subgrupos de pacientes de manera significativa.

El análisis de regresión multivariante asocia la exposición a químicos con una disminución de la concentración para el grupo de pacientes con menos de 50 millones de espermatozoides/mL ($\beta= -16,8$; $p= 0,050$), sin embargo, se detecta un efecto positivo sobre la movilidad en la exposición a químicos y gases cuando se considera a todos los individuos ($\beta= 10,09$; $p= 0,046$),

Exposición a ondas electromagnéticas

Más del 95% de los pacientes no utilizan manos libres cuando hablan por el móvil. Esto dificulta la posibilidad de estudiar las posibles influencias de las ondas electromagnéticas en los parámetros seminales. También se ha considerado el lugar donde se transporta el móvil cuando no se usa, y un 48,3% lo hace en el bolsillo delantero del pantalón. Los resultados de este factor no se han incluido finalmente en las tablas ya que no ha sido posible establecer grupos con un número suficiente de individuos,

Actividad física

Un 15,4% de los pacientes no realizan ninguna actividad física, un 25,5% realizan una actividad física moderada y hasta el 36,2% combinan una actividad moderada y vigorosa. Aunque los pacientes que no realizan ejercicio presentan una concentración espermática inferior, no se detectan diferencias significativas (tabla 16).

El análisis de regresión multivariante indica que un ejercicio vigoroso disminuye el volumen ($\beta= -0,71$; $p= 0,044$) (tabla 20), y también se ha encontrado que aumenta la fragmentación del ADN ($\beta= 8,16$; $p= 0,030$).

Consumo de antioxidantes

Hasta un 26,8% de los pacientes consumen algún tipo de antioxidantes. De forma global no se aprecia ninguna diferencia significativa a nivel de los parámetros seminales entre los que consumen o no antioxidantes, tampoco tras realizar el análisis de regresión multivariante.

Hábitos dietéticos

Respecto a la dieta, aunque la mayoría de parámetros mejoran en el grupo que puntúa más alto en el sistema de puntuación empleado para valorar la dieta mediterránea (categoría 2), no se observan diferencias estadísticamente significativas.

VOLUMEN EYACULADO	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Edad (años)												
< 35	65 (28,4%)	3,2	1,7	0,439	29 (28,7%)	3,1	1,0	0,577	19 (20,4%)	3,2	1,2	0,673
35-40	93 (40,6%)	2,9	1,2		41 (40,6%)	3,3	1,4		41 (44,1%)	3,0	1,3	
>40	71 (31%)	3,1	1,4		31 (30,7%)	3,0	1,4		33 (35,5%)	2,9	1,0	
Nivel de estudios												
Primarios	23 (10%)	2,9	1,0	0,575	11 (10,9%)	3,1	1,1	0,954	7 (7,5%)	2,6	1,0	0,286
Secundarios	79 (34,4%)	3,2	1,3		46 (45,5%)	3,1	1,3		36 (38,7%)	3,2	1,2	
Superiores	128 (55,6%)	3,0	1,3		44 (43,6%)	3,2	1,4		50 (53,8%)	2,9	1,2	
Estado laboral												
A tiempo completo	206 (92,4%)	3,1	1,3	0,072	92 (91,0%)	3,2	1,3	0,400	83 (91,2%)	3,1	1,2	0,135
A tiempo parcial	8 (3,6%)	3,5	1,4		3 (3,0%)	3,0	0,7		4 (4,4%)	2,7	0,7	
En paro	9 (4%)	2,1	0,8		6 (6,0%)	2,4	0,9		4 (4,4%)	1,8	0,4	
IMC												
Normal (18,5-24,9)	105 (46%)	3,0	1,3	0,995	46 (47,4%)	3,2	1,4	0,863	40 (43,5%)	2,9	1,1	0,599
Sobrepeso (25,5-29,9)	87 (38,2%)	3,0	1,3		36 (37,1%)	3,1	1,4		37 (40,2%)	3,2	1,4	
Obeso (>30)	36 (15,8%)	3,0	1,0		15 (15,5%)	3,0	1,0		15 (16,3%)	2,9	0,9	
Consumo Tabaco												
No fuma	109 (47,6%)	3,1	1,2	0,847	42 (42,0%)	3,0	1,4	0,617	40 (43,0%)	3,0	1,3	0,967
Exfumador	72 (31,4%)	2,9	1,2		36 (36,0%)	3,1	1,1		32 (34,4%)	3,0	1,1	
Fumador	48 (21%)	3,1	1,4		22 (22,0%)	3,4	1,5		21 (22,6%)	3,1	1,2	

VOLUMEN EYACULADO	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Cantidad Tabaco												
<10 pack-year	25 (53,2%)	3,1	1,3	0,954	13 (56,5%)	3,1	1,2	0,386	11 (55,0%)	3,2	1,4	0,595
10-15 pack-year	13 (27,7%)	3,0	1,9		6 (26,1%)	4,1	2,3		5 (25,0%)	2,5	1,2	
>15 pack-year	9 (19,1%)	2,9	1,0		4 (17,4%)	3,1	1,0		4 (20,0%)	3,1	1,0	
Consumo de Alcohol												
No bebe	25 (10,9%)	3,0	1,0	0,796	9 (8,9%)	2,9	1,1	0,600	7 (7,5%)	2,9	1,1	0,777
Sí bebe	205 (83,1%)	3,0	1,3		92 (91,1%)	3,2	1,3		86 (92,5%)	3,0	1,2	
Cantidad de Alcohol												
< 1 g alcohol/día	40 (25,3%)	3,2	1,1	0,811	15 (22,0%)	2,8	0,9	0,301	14 (21,5%)	3,2	1,0	0,533
Entre 1 g y 3 g por día	40 (25,3%)	3,0	1,2		19 (28,0%)	3,4	1,3		16 (24,6%)	3,3	1,1	
Entre 3 g y 7 g por día	41 (26%)	3,1	1,2		20 (22,4%)	2,8	1,2		20 (30,8%)	3,0	1,1	
> 7 g alcohol/día	37 (23,4%)	2,9	1,5		14 (20,6%)	3,4	1,7		15 (23,1%)	2,7	1,3	
Consumo de Agua												
< 1 L/día	31 (14,2%)	3,2	1,4	0,863	14 (14,6%)	3,7	1,4	0,350	12 (13,8%)	3,5	1,3	0,118
Entre 1 L/día y 2 L/día	107 (48,8%)	3,0	1,2		38 (39,6%)	3,1	1,3		41 (47,1%)	2,8	0,9	
> 2 L/día	81 (37%)	3,1	1,3		44 (45,8%)	3,2	1,3		34 (39,1%)	3,3	1,4	
Tipo Agua en casa												
Grifo + filtro	48 (22,4%)	2,9	1,2	0,403	22 (24,2%)	2,7	1,1	0,233	18 (21,2%)	2,9	1,1	0,068
Grifo sin filtro	43 (20,1%)	2,9	1,2		17 (18,7%)	3,2	1,3		16 (22,3%)	2,5	1,0	
Embotellada	123 (57,5%)	3,1	1,3		52 (57,1%)	3,3	1,4		48 (56,5%)	3,3	1,3	

VOLUMEN EYACULADO	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Exposiciones laborales												
Sin exposición	179 (79,9%)	3,0	1,3	0,930	74 (73,3%)	3,2	1,4	0,990	75 (81,5%)	3,0	1,3	0,876
Temperaturas	10 (4,5%)	3,0	1,3		8 (7,9%)	3,2	1,3		7 (7,6%)	2,7	1,0	
Químicos y Gases	18 (8,0%)	3,0	1,0		8 (7,9%)	3,0	0,8		4 (4,4%)	2,7	0,8	
Químicos	17 (7,6%)	2,8	1,2		11 (10,9%)	3,1	1,2		6 (6,5%)	2,8	1,0	
Actividad física												
Ninguna	35 (15,4%)	3,0	1,1	0,201	18 (18,0%)	3,1	0,9	0,375	17 (18,5%)	3,2	1,3	0,100
Moderada	58 (25,5%)	3,2	1,4		26 (26,0%)	3,5	1,4		25 (27,2%)	3,4	1,0	
Vigorosa	61 (26,9%)	2,7	1,1		29 (29,0%)	2,9	1,2		30 (32,6%)	2,4	0,9	
Moderada y vigorosa	73 (36,2%)	3,1	1,3		27 (27,0%)	3,2	1,5		20 (21,7%)	3,37	1,5	
Antioxidantes												
No consume	161 (73,2%)	3,0	1,3	0,793	69 (70,4%)	3,2	1,4	0,857	67 (76,1%)	3,0	1,3	0,668
Sí consume	59 (26,8%)	3,1	1,2		29 (29,6%)	3,1	1,3		21 (23,9%)	3,1	1,1	
Dieta												
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)	143 (62,7%)	3,1	1,2	0,472	65 (65,4%)	3,2	1,8	0,893	63 (68,5%)	3,1	1,1	0,491
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	85 (37,3%)	2,9	1,4		36 (35,6%)	3,1	1,6		29 (31,5%)	2,9	1,4	

Tabla 15. Asociación entre el volumen seminal y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor
Edad (años)												
< 35	65 (28,3%)	55,1	31,6-84,0	0,536	29 (28,7%)	30,0	6,8-39,7	0,652	19 (20,4%)	30,0	6,8-65,1	0,531
35-40	93 (40,7%)	61,9	26,9-125,1		41 (40,6%)	25,1	14,9-36,6		41 (44,1%)	38,9	20,0-89,3	
>40	71 (31,0%)	59,7	23,8-140,0		31 (30,7%)	19,4	9,1-36,7		33 (35,5%)	39,7	19,4-90,7	
Nivel de estudios												
Primarios	23 (10%)	50,9	25,1-113,6	0,032	11 (10,9%)	25,1	4,1-43,6	0,949	7 (7,5%)	42,8	4,1-48,9	0,102
Secundarios	79 (34,3%)	39,7	23,6-105,1		46 (45,5%)	24,5	9,2-36,7		36 (38,7%)	27,2	9,3-53,6	
Superiores	128 (55,7%)	70,6	37,8-125,9		44 (43,6%)	24,1	12,4-39,0		50 (53,8%)	47,4	23,7-97,1	
Estado laboral												
A tiempo completo	206 (92,4%)	56,4	28,6-113,6	0,356	92 (91,0%)	25,0	12,0-39,0	0,033	83 (91,2%)	38,9	19,4-83,3	0,720
A tiempo parcial	8 (3,6%)	92,4	18,8-139,6		3 (3,0%)	9,5	0,2-28,1		4 (4,4%)	18,8	4,8-152,1	
En paro	9 (4,0%)	13,0	4,1-151,2		6 (6,0%)	5,7	1,1-13,0		4 (4,4%)	76,1	1,0-168,0	
IMC												
Normal (18,5-24,9)	105 (46,3%)	54,6	26,3-129,7	0,933	46 (47,9%)	25,1	9,1-40,6	0,518	40 (43,5%)	41,6	15,8-112,7	0,769
Sobrepeso (25,5-29,9)	86 (37,8%)	59,7	26,9-105,1		36 (37,5%)	24,3	11,9-36,3		37 (40,2%)	36,7	23,7-73,5	
Obeso (>30)	36 (15,9%)	72,3	28,3-137,3		14 (14,6%)	14,1	2,4-39,7		15 (16,3%)	29,0	2,4-102,6	
Consumo Tabaco												
No fuma	109 (47,6%)	62,7	38,3-125,6	0,246	42 (42,0%)	27,6	9,6-39,7	0,421	40 (43,0%)	44,9	24,0-101,4	0,185
Exfumador	72 (31,4%)	49,4	19,7-111,1		36 (36,0%)	19,7	7,9-33,8		32 (34,4%)	27,5	11,8-52,6	
Fumador	48 (21,0%)	54,0	24,9-104,9		22 (22,0%)	24,2	10,9-29,4		21 (22,6%)	29,4	23,8-83,3	

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor
Cantidad Tabaco												
<10 pack-year	25 (53,2%)	42,8	23,7-98,4	0,881	13 (56,5%)	23,7	13,0-29,4	0,449	11 (55,0%)	29,4	23,7-125,1	0,930
10-15 pack-year	13 (27,6%)	61,9	25,1-96,8		6 (26,1%)	18,0	9,2-43,5		5 (25,0%)	43,5	9,25-78,9	
>15 pack-year	9 (19,2%)	56,0	29,0-71,1		4 (17,4%)	28,6	26,0-28,9		4 (20,0%)	28,6	26,0-38,9	
Consumo de Alcohol												
No bebe	25 (10,8%)	66,2	39,6-121,0	0,292	9 (8,9%)	38,3	17,5-39,6	0,470	7 (7,5%)	39,6	2,4-121,0	0,694
Sí bebe	205 (89,2%)	56,3	25,1-113,7		92 (91,1%)	24,3	9,3-36,7		86 (92,5%)	37,8	19,4-86,1	
Cantidad de Alcohol												
< 1g alcohol/día	40 (25,3%)	71,9	36,6-132,8	0,742	15 (22,0%)	24,4	10,8-39,7	0,726	14 (21,5%)	47,7	23,8-125,1	0,327
Entre 1 g y 3 g por día	40 (25,3%)	55,5	22,4-108,5		19 (28,0%)	21,2	9,6-31,6		16 (24,6%)	37,2	21,8-76,0	
Entre 3 g y 7 g por día	41 (25,9%)	51,1	25,9-130,8		20 (22,4%)	25,1	5,7-37,8		20 (30,8%)	26,3	5,7-47,0	
> 7 g alcohol/día	37 (23,5%)	65,1	33,9-118,8		14 (20,6%)	27,4	14,9-43,5		15 (23,1%)	43,5	16,7-83,3	
Consumo de Agua												
< 1 L/día	31 (14,2%)	56,0	25-97,5	0,177	14 (14,6%)	20,8	8,4-36,7	0,677	12 (13,8%)	34,1	9,0-54,9	0,727
Entre 1 L/día y 2 L/día	107 (48,8%)	70,8	33,9-125,1		38 (39,6%)	24,5	10,8-38,3		41 (47,1%)	38,9	23,6-93,2	
> 2 L/día	81 (36,9%)	46,7	24,4-113,7		44 (45,8%)	26,4	13,6-36,6		34 (39,1%)	41,2	20,0-73,5	
Tipo Agua en casa												
Grifo + filtro	48 (22,5%)	60,1	23,7-117,8	0,401	22 (24,2%)	21,5	10,9-33,7	0,227	18 (21,2%)	23,8	9,2-44,8	0,014
Grifo sin filtro	43 (20,1%)	84,8	36,6-127,6		17 (18,7%)	31,6	25,1-43,5		19 (22,4%)	86,1	31,6-151,2	
Embotellada	123 (57,4%)	55,1	28,1-112,4		52 (57,1%)	24,4	8,7-38,0		48 (56,4%)	36,6	16,6-78,4	

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor
Exposiciones laborales												
Sin exposición	179 (79,9%)	62,7	29,9-113,6	0,040	74 (73,3%)	25,4	9,6-39,0	0,254	75 (81,5%)	42,8	23,7-93,2	0,185
Temperaturas	10 (4,5%)	13,6	4,1-43,6		8 (7,9%)	7,0	3,2-22,6		7 (7,6%)	7,2	4,1-43,6	
Químicos y Gases	18 (8,0%)	55,8	30,0-142,4		8 (7,9%)	28,5	20,4-38,0		4 (4,4%)	38,0	26,8-53,6	
Químicos	17 (7,6%)	36,7	18,8-83,4		11 (10,9%)	21,2	16,7-36,7		6 (6,5%)	17,1	8,4-36,7	
Actividad física												
Ninguna	35 (16,6%)	46,9	23,6-127,6	0,672	18 (18,0%)	25,3	4,1-38,9	0,552	17 (16,7%)	29,0	14,1-46,0	0,637
Moderada	58 (25,5%)	55,6	28,1-151,2		26 (26,0%)	25,2	18,8-39,7		25 (24,5%)	36,6	21,0-73,5	
Vigorosa	61 (26,8%)	51,1	17,5-118,4		29 (29,0%)	17,3	8,4-36,7		30 (29,4%)	47,7	15,8-97,1	
Moderada y vigorosa	73 (32,1%)	67,4	31,6-113,7		27 (27,0%)	26,3	7,9-37,1		30 (29,4%)	29,9	16,1-70,0	
Antioxidantes												
No consume	161 (73,2%)	66,1	28,6-117,0	0,568	69 (70,4%)	24,4	9,5-36,0	0,466	67 (76,1%)	31,6	14,9-89,3	0,780
Sí consume	59 (26,8%)	53,8	24,6-117,2		29 (29,6%)	24,6	13,1-39,7		21 (23,9%)	42,8	24,2-47,9	
Dieta												
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)	143 (62,7%)	55,0	26,9-108,2	0,424	65 (65,4%)	25	13,1-36,7	0,493	63 (68,5%)	36,64	24,2-83,3	0,174
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	85 (37,3%)	66,2	25,9-130,8		36 (35,6%)	20,3	3,3-43,8		29 (31,5%)	23,6	2,9-89,3	

Tabla 16. Asociación entre la concentración espermática y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un test Kruskal Walis.

MOVILIDAD PROGRESIVA	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Edad (años)												
< 35	65 (28,4%)	41,9	16,8	0,216	29 (28,7%)	30,6	13,5	0,205	19 (20,4%)	34,2	16,3	0,782
35-40	93 (40,6%)	40,8	17,9		41 (40,6%)	27,5	13,0		41 (44,1%)	35,5	16,3	
>40	71 (31,0%)	37,0	16,9		31 (30,7%)	24,8	10,8		33 (35,5%)	32,8	16,2	
Nivel de estudios												
Primarios	23 (10,0%)	39,4	20,6	0,049	11 (10,9%)	23,4	14,5	0,378	7 (7,5%)	30,1	18,8	0,256
Secundarios	79 (34,4%)	36,3	17,1		46 (45,5%)	27,1	12,3		36 (38,7%)	31,5	15,6	
Superiores	128 (55,6%)	42,3	16,4		44 (43,6%)	29,2	12,5		50 (53,8%)	36,8	16,1	
Estado laboral												
A tiempo completo	206 (92,4%)	40,0	17,3	0,588	92 (91,0%)	27,7	12,5	0,391	83 (91,2%)	34,0	15,8	0,221
A tiempo parcial	8 (3,6%)	35,0	17,0		3 (3,0%)	18,1	15,8		4 (4,4%)	22,1	15,1	
En paro	9 (4,0%)	36,0	17,0		6 (6,0%)	29,9	13,7		4 (4,4%)	41,4	21,0	
IMC												
Normal (18,5-24,9)	105 (46,0%)	37,9	16,7	0,194	46 (47,4%)	27,0	12,8	0,136	40 (43,5%)	31,5	14,0	0,219
Sobrepeso (25,5-29,9)	87 (38,2%)	42,3	16,6		36 (37,1%)	30,6	12,5		37 (40,2%)	37,8	16,7	
Obeso (>30)	36 (15,8%)	41,0	19,8		15 (15,5%)	23,2	10,9		15 (16,3%)	32,6	19,8	
Consumo Tabaco												
No fuma	109 (47,6%)	40,3	16,3	0,970	42 (42,0%)	28,0	12,1	0,424	40 (43,0%)	36,2	13,5	0,228
Exfumador	72 (31,4%)	39,7	17,9		36 (36,0%)	26,4	12,0		32 (34,4%)	35,4	16,7	
Fumador	48 (21,0%)	39,9	18,9		22 (22,0%)	27,9	15,0		21 (22,6%)	28,9	19,2	

MOVILIDAD PROGRESIVA	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Cantidad Tabaco												
<10 pack-year	25 (53,2%)	40,2	20,6	0,445	13 (56,5%)	27,3	15,6	0,326	11 (55,0%)	28,3	18,8	0,649
10-15 pack-year	13 (27,6%)	39,7	15,3		6 (26,1%)	34,0	14,6		5 (25,0%)	28,5	15,3	
>15 pack-year	9 (19,15%)	31,3	14,6		4 (17,4%)	19,5	9,8		4 (20,0%)	19,5	9,8	
Consumo de Alcohol												
No bebe	25 (10,9%)	37,0	20,5	0,366	9 (8,9%)	19,2	10,2	0,036	7 (7,5%)	30,6	27,4	0,536
Sí bebe	205 (89,1%)	40,3	16,9		92 (91,1%)	28,4	12,6		86 (92,5%)	34,6	15,1	
Cantidad de Alcohol												
< 1 g alcohol/día	40 (25,3%)	38,9	17,9	0,805	15 (22,0%)	22,9	12,3	0,335	14 (21,5%)	34,2	19,1	0,929
Entre 1 g y 3 g por día	40 (25,3%)	38,9	17,0		19 (28,0%)	26,8	11,9		16 (24,6%)	35,5	11,3	
Entre 3 g y 7 g por día	41 (25,9%)	40,1	15,0		20 (22,4%)	28,8	11,4		20 (30,8%)	32,4	12,0	
> 7 g alcohol/día	37 (23,4%)	42,2	16,9		14 (20,6%)	31,1	14,7		15 (23,1%)	32,9	17,4	
Consumo de Agua												
< 1 L/día	31 (14,2%)	41,2	17,5	0,876	14 (14,6%)	29,5	13,9	0,368	12 (13,8%)	34,1	11,9	0,480
Entre 1 L/día y 2 L/día	107 (48,8%)	40,0	17,9		38 (39,6%)	25,2	15,0		41 (47,1%)	32,2	18,2	
> 2 L/día	81 (37%)	39,3	16,8		44 (45,8%)	28,8	10,0		34 (39,1%)	36,9	15,6	
Tipo Agua en casa												
Grifo + filtro	48 (22,4%)	40,7	18,4	0,995	22 (24,2%)	26,9	13,3	0,341	18 (21,2%)	28,2	12,2	0,056
Grifo sin filtro	43 (20,1%)	40,5	13,0		17 (18,7%)	32,0	11,1		16 (22,3%)	40,6	12,4	
Embotellada	123 (57,5%)	40,4	17,9		52 (57,1%)	27,3	11,9		48 (56,5%)	35,0	17,4	

MOVILIDAD PROGRESIVA	Para todos los pacientes n=230				Para concentraciones <50 mill/mL n=101				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Exposiciones laborales												
Sin exposición	179 (79,9%)	40,8	16,1	0,043	74 (73,3%)	29,5	11,9	0,025	75 (81,5%)	35,3	15,9	0,017
Temperaturas	10 (4,5%)	31,7	16,2		8 (7,9%)	26,5	13,3		7 (7,6%)	34,1	13,6	
Químicos y Gases	18 (8,0%)	41,7	20,9		8 (7,9%)	24,9	15,5		4 (4,4%)	39,3	13,4	
Químicos	17 (7,6%)	30,5	21,9		11 (10,9%)	17,5	10,8		6 (6,5%)	14,4	10,5	
Actividad física												
Ninguna	35 (15,4%)	38,1	19,2	0,475	18 (18,0%)	25,5	12,7	0,813	17 (18,5%)	33,8	19,4	0,976
Moderada	58 (25,5%)	40,0	15,4		26 (26,0%)	29,2	13,0		25 (27,2%)	35,3	15,9	
Vigorosa	61 (26,9%)	38,0	18,3		29 (29,0%)	27,9	12,9		30 (32,6%)	33,5	17,6	
Moderada y vigorosa	73 (36,2%)	42,3	17,0		27 (27,0%)	27,9	12,6		20 (21,7%)	34,2	11,7	
Antioxidantes												
No consume	161 (73,2%)	39,9	17,3	0,892	69 (70,4%)	27,8	13,0	0,903	67 (76,1%)	34,4	16,9	0,838
Sí consume	59 (26,8%)	39,6	17,7		29 (29,6%)	27,5	12,2		21 (23,9%)	33,6	13,8	
Dieta												
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)	143 (62,7%)	38,7	17,9	0,254	65 (65,4%)	27,7	13,0	0,649	63 (68,5%)	33,4	16,3	0,696
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	85 (37,3%)	41,4	15,8		36 (35,6%)	28,4	12,0		29 (31,5%)	34,7	14,2	

Tabla 17. Asociación entre la movilidad progresiva y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA

MORFOLOGÍA	Para todos los pacientes n=117				Para concentraciones <50 mill/mL n=59				Con factor masculino n=93			
	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor
Edad (años)												
< 35	32 (27,6%)	3,0	2,0-4,0	0,103	15 (25,4%)	3,0	2,5-4,0	0,995	11 (19,6%)	3,0	2,0-4,0	0,727
35-40	50 (43,1%)	3,0	2,0-4,0		29 (49,2%)	2,0	3,0-4,0		28 (50,0%)	3,0	2,0-4,0	
>40	34 (21,3%)	2,2	3,0-5,0		15 (25,4%)	3,0	2,0-3,0		17 (30,4%)	3,0	3,0-4,0	
Nivel de estudios												
Primarios	11 (9,4%)	3,5	2,0-5,0	0,835	7 (12,2%)	3,5	2,0-5,0	0,502	5 (8,9%)	4,0	3,5-5,0	0,415
Secundarios	41 (35,0%)	3,0	3,0-4,0		25 (43,9%)	3,0	3,0-3,5		17 (30,4%)	3,0	2,0-4,0	
Superiores	65 (55,6%)	3,0	2,5-4,0		25 (43,9%)	3,0	2,0-3,0		34 (60,7%)	3,0	2,0-4,0	
Estado laboral												
A tiempo completo	105 (92,1%)	3,0	2,5-4,0	0,637	55 (93,2%)	3,0	2,0-4,0	0,540	51 (92,7%)	3,0	2,0-4,0	0,815
A tiempo parcial	5 (4,4%)	3,0	3,0-4,0		2 (3,4%)	4,0	3,0-5,0		3 (5,5%)	3,0	3,0-5,0	
En paro	4 (3,5%)	3,0	2,7-3,0		2 (3,4%)	2,7	2,5-3,0		1 (1,8%)	3,0	3,0-3,0	
IMC												
Normal (18,5-24,9)	57 (48,7%)	3,0	2,0-4,0	0,020	33 (55,9%)	3,0	2,0-3,0	0,162	29 (51,8%)	3,0	2,0-3,5	0,065
Sobrepeso (25,5-29,9)	43 (36,8%)	3,0	3,0-5,0		20 (34,0%)	3,0	3,0-5,0		21 (37,5%)	3,0	3,0-5,0	
Obeso (>30)	17 (14,5%)	3,0	3,0-4,5		6 (10,2%)	3,0	2,6-3,0		6 (10,7%)	3,0	2,6-4,0	
Consumo Tabaco												
No fuma	52 (44,4%)	3,0	2,0-4,0	0,031	25 (42,4%)	3,0	2,0-3,0	0,388	24 (42,9%)	3,0	2,0-3,2	0,315
Exfumador	40 (34,2%)	3,2	3,0-5,0		22 (37,3%)	3,0	2,0-5,0		18 (32,1%)	3,0	2,0-4,0	
Fumador	25 (21,4%)	3,0	3,0-5,0		12 (20,3%)	3,0	2,7-3,7		14 (25,0%)	3,2	3,0-5,0	

MORFOLOGÍA	Para todos los pacientes n=117				Para concentraciones <50 mill/mL n=59				Con factor masculino n=56			
	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor
Cantidad Tabaco												
<10 pack-year	11 (45,8%)	3,0	2,5-6,0	0,859	5 (41,7%)	3,0	3,0-4,0	0,724	6 (46,1%)	3,5	3,0-4,0	0,545
10-15 pack-year	7 (29,2%)	3,0	3,0-6,0		4 (33,3%)	3,0	2,5-4,0		4 (30,8%)	4,0	2,5-5,0	
>15 pack-year	6 (25%)	3,2	3,0-8,0		3 (25,0%)	3,0	1,0-3,5		3 (23,1%)	3,0	1,0-3,5	
Consumo de Alcohol												
No bebe	14 (12,0%)	3,0	2,0-4,0	0,605	5 (93,2%)	3,0	3,0-3,5	0,586	3 (5,4%)	2,0	2,0-3,0	0,196
Sí bebe	103 (88,0%)	3,0	2,5-4,0		54 (6,8%)	3,0	2,0-4,0		53 (94,6%)	3,0	2,0-4,0	
Cantidad de Alcohol												
< 1g alcohol/día	19 (25,3%)	3,5	3,0-5,0	0,401	7 (18,9%)	3,0	3,0-5,0	0,438	7 (17,1%)	3,5	3,0-5,0	0,302
Entre 1 g y 3 g por día	19 (25,3%)	3,0	3,0-5,0		10 (27,1%)	3,5	3,0-5,0		13 (31,7%)	3,0	3,0-4,0	
Entre 3 g y 7 g por día	22 (29,4%)	3,0	2,0-5,0		13 (35,1%)	3,0	2,0-4,0		12 (29,3%)	3,0	2,0-4,5	
> 7 g alcohol/día	15 (20,0%)	3,0	2,0-4,0		7 (18,9%)	3,0	2,0-3,0		9 (21,9%)	2,0	2,0-4,0	
Consumo de Agua												
< 1 L/día	13 (11,9%)	3,0	3,0-5,0	0,870	5 (9,1%)	3,0	2,5-3,0	0,768	6 (11,8%)	3,0	2,0-3,0	0,575
Entre 1 L/día y 2 L/día	55 (50,5%)	3,0	2,5-4,0		24 (43,6%)	3,0	2,2-4,0		25 (49,0%)	3,0	3,0-4,0	
> 2 L/día	41 (37,6%)	3,0	2,0-4,0		26 (47,3%)	3,0	2,0-3,5		20 (39,2%)	3,0	2,0-4,0	
Tipo Agua en casa												
Grifo + filtro	19 (17,8%)	3,0	3,0-4,0	0,992	10 (18,5%)	3,0	2,6-3,0	0,944	10 (20,0%)	3,0	3,0-5,0	0,517
Grifo sin filtro	22 (20,6%)	3,0	2,0-4,5		8 (14,8%)	3,0	2,5-3,7		9 (18,0%)	3,0	2,0-3,0	
Embotellada	66 (61,7%)	3,0	2,5-4,0		36 (66,7%)	3,0	2,0-4,0		31 (62,0%)	3,0	2,0-4,0	

MORFOLOGÍA	Para todos los pacientes n=117				Para concentraciones <50 mill/mL n=59				Con factor masculino n=56			
	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor	n (%)	Mediana	IQR	p-valor
Exposiciones laborales												
Sin exposición	92 (80,7%)	3,0	2,5-4,0	0,433	44 (74,6%)	3,0	2,5-3,0	0,077	45 (82,2%)	2,0	2,6-4,0	0,110
Temperaturas	5 (4,4%)	5,0	4,0-5,0		5 (8,5%)	5,0	4,0-5,0		5 (9,1%)	5,0	4,0-5,0	
Químicos y Gases	8 (7,0%)	3,2	3,0-4,5		4 (6,8%)	3,2	3,0-4,2		1 (1,8%)	3,0	3,0-3,0	
Químicos	9 (7,9%)	3,0	1,0-4,0		6 (10,1%)	1,5	1,0-3,5		4 (7,3%)	1,5	1,0-2,7	
Actividad física												
Ninguna	18 (15,8%)	3,2	2,6-5,0	0,581	9 (15,5%)	3,0	2,0-3,5	0,907	10 (18,2%)	3,0	2,0-5,0	0,530
Moderada	37 (32,5%)	3,0	3,0-4,0		17 (29,3%)	3,0	2,5-3,0		18 (32,7%)	3,0	2,0-3,0	
Vigorosa	30 (26,3%)	3,0	2,0-4,0		17 (29,3%)	3,0	2,5-4,0		16 (29,1%)	3,0	2,5-4,0	
Moderada y vigorosa	29 (25,4%)	3,5	3,0-4,0		15 (25,9%)	3,0	2,0-4,0		11 (20,0%)	3,5	2,0-4,0	
Antioxidantes												
No consume	79 (72,5%)	3,0	2,5-5,0	0,552	38 (67,9%)	3,0	2,0-4,0	0,568	39 (76,5%)	3,0	2,0-4,0	0,213
Sí consume	30 (27,5%)	3,0	3,0-4,0		18 (32,1%)	3,0	2,5-3,0		12 (23,5%)	3,0	2,5-3,0	
Dieta												
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)	75 (65,2%)	3,0	2,0-4,0	0,404	37 (62,7%)	2,0	2,0-4,0	0,419	38 (69,1%)	3,0	2,0-4,0	0,956
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	40 (34,8%)	3,0	3,0-4,5		22 (37,3%)	3,0	3,0-3,5		17 (30,1%)	3,0	2,0-3,5	

Tabla 18. Asociación entre la morfología espermática y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un test Kruskal Wallis.

FRAGMENTACIÓN DEL ADN	Para todos los pacientes n=215				Para concentraciones <50 mill/mL n=92				Con factor masculino n=88			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Edad (años)												
< 35	59 (27,4%)	19,9	3,1	0,002	24 (26,1%)	23,7	6,4	0,046	17 (19,3%)	23,6	8,3	0,270
35-40	86 (40,0%)	22,1	9,8		37 (40,2%)	25,5	9,6		38 (43,2%)	24,6	11,2	
>40	70 (32,6%)	26,0	11,2		31 (33,7%)	29,8	10,6		33 (37,5%)	28,1	11,4	
Nivel de estudios												
Primarios	20 (9,3%)	20,4	8,2	0,450	8 (8,6%)	25,3	8,3	0,463	5 (5,7%)	28,4	9,4	0,819
Secundarios	74 (34,4%)	23,6	9,1		42 (45,7%)	25,3	7,5		34 (38,6%)	26,0	9,3	
Superiores	121 (56,3%)	22,6	11,0		42 (45,7%)	27,8	11,3		49 (55,7%)	25,3	12,0	
Estado laboral												
A tiempo completo	194 (93,3%)	22,9	10,1	0,032	84 (91,3%)	26,4	9,5	0,350	79 (91,9%)	26,0	10,9	0,183
A tiempo parcial	6 (2,9%)	14,0	5,4		2 (2,2%)	19,0	0,2		3 (3,5%)	16,2	4,9	
En paro	8 (2,8%)	28,2	9,1		6 (6,5%)	30,1	9,9		4 (4,6%)	31,3	10,2	
IMC												
Normal (18,5-24,9)	101 (47,4%)	22,7	9,4	0,792	45 (49,5%)	25,0	7,2	0,433	39 (44,8%)	25,2	8,9	0,916
Sobrepeso (25,5-29,9)	80 (37,6%)	23,0	10,7		34 (37,3%)	27,1	10,9		36 (41,3%)	26,2	12,4	
Obeso (>30)	32 (15,0%)	21,5	10,0		12 (13,2%)	28,3	10,6		12 (13,8%)	25,9	12,8	
Consumo Tabaco												
No fuma	104 (48,6%)	23,1	10,9	0,842	40 (43,9%)	26,9	11,0	0,665	40 (45,5%)	25,4	11,5	0,873
Exfumador	68 (31,8%)	22,7	9,0		34 (37,4%)	26,8	7,7		31 (35,2%)	25,4	9,2	
Fumador	42 (19,6%)	22,0	10,1		17 (18,7%)	24,5	9,3		17 (19,3%)	27,0	12,5	

FRAGMENTACIÓN DEL ADN	Para todos los pacientes n=215				Para concentraciones <50 mill/mL n=92				Con factor masculino n=88			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Cantidad Tabaco												
<10 pack-year	21 (51,2%)	20,5	9,0	0,391	9 (50,0%)	23,3	9,7	0,398	8 (50,0%)	23,6	12,8	0,381
10-15 pack-year	12 (29,3%)	24,6	10,8		6 (33,3%)	23,9	7,5		5 (31,3%)	32,8	11,7	
>15 pack-year	8 (19,5%)	25,3	11,9		3 (16,7%)	31,7	10,9		3 (18,7%)	31,7	10,9	
Consumo de Alcohol												
No bebe	22 (10,2%)	22,6	10,1	0,952	7 (7,6%)	30,8	8,6	0,219	5 (5,7%)	29,1	12,3	0,477
Sí bebe	193 (89,8%)	22,8	10,2		85 (92,4%)	26,1	9,5		83 (94,3%)	25,5	10,8	
Cantidad de Alcohol												
< 1g alcohol/día	38 (25,5%)	22,5	10,1	0,767	16 (23,5%)	24,9	7,3	0,150	14 (22,2%)	20,5	9,4	0,007
Entre 1 g y 3 g por día	36 (24,2%)	22,7	8,6		16 (23,5%)	25,1	9,2		16 (25,4%)	22,7	7,1	
Entre 3 g y 7 g por día	40 (26,8%)	24,3	13,3		20 (29,4%)	30,2	13,0		20 (31,8%)	32,4	13,6	
> 7 g alcohol/día	35 (23,5%)	22,2	8,1		12 (17,6%)	22,5	5,7		13 (20,6%)	25,7	8,9	
Consumo de Agua												
< 1 L/día	28 (13,6%)	21,4	9,1	0,541	12 (13,6%)	23,5	8,8	0,132	11 (13,2%)	25,0	9,8	0,794
Entre 1 L/día y 2 L/día	100 (48,8%)	23,5	11,5		35 (39,8%)	28,7	10,2		39 (47,0%)	26,6	11,9	
> 2 L/día	77 (37,6%)	22,2	8,6		41 (46,6%)	25,0	8,6		33 (39,8%)	24,9	10,4	
Tipo Agua en casa												
Grifo + filtro	47 (23,2%)	23,1	12,0	0,434	22 (25,9%)	29,2	10,5	0,204	18 (22,2%)	31,3	11,1	0,018
Grifo sin filtro	41 (20,3%)	24,1	10,0		16 (18,8%)	25,5	10,7		18 (22,2%)	25,7	10,8	
Embotellada	114 (56,4%)	21,9	9,1		47 (55,3%)	25,0	8,0		45 (55,6%)	23,0	9,6	

FRAGMENTACIÓN DEL ADN	Para todos los pacientes n=215				Para concentraciones <50 mill/mL n=92				Con factor masculino n=88			
	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor	n (%)	Media	SD	p-valor
Exposiciones laborales												
Sin exposición	168 (80,4%)	22,6	10,4	0,445	69 (75,0%)	26,3	9,7	0,634	71 (81,6%)	25,6	11,5	0,560
Temperaturas	9 (4,3%)	27,3	9,3		7 (7,1%)	29,8	8,7		7 (8,1%)	30,5	7,8	
Químicos y Gases	17 (8,1%)	21,2	6,2		7 (7,1%)	23,3	5,2		4 (4,6%)	21,0	5,2	
Químicos	15 (7,2%)	24,4	10,1		9 (9,8%)	27,6	11,2		5 (5,7%)	25,9	7,6	
Actividad física												
Ninguna	31 (14,6%)	22,3	8,5	0,922	15 (16,5%)	26,1	15	0,375	14 (16,1%)	24,2	8,1	0,316
Moderada	56 (26,4%)	22,6	9,5		25 (27,5%)	24,2	25		24 (27,6%)	25,9	10,5	
Vigorosa	57 (26,9%)	23,5	10,1		27 (29,5%)	26,1	27		29 (33,3%)	23,9	9,5	
Moderada y vigorosa	68 (32,1%)	22,4	11,4		24 (26,4%)	29,0	24		20 (23,0%)	29,5	14,2	
Antioxidantes												
No consume	148 (72,2%)	23,2	10,4	0,561	62 (69,7%)	27,4	9,9	0,246	62 (74,1%)	26,2	11,4	0,859
Sí consume	57 (27,8%)	22,3	9,7		27 (30,3%)	24,8	8,9		21 (25,3%)	25,7	9,5	
Dieta												
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)	133 (62,4%)	23,6	10,2	0,196	60 (65,2%)	26,6	9,8	0,832	60 (69,0%)	25,6	10,9	0,673
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	80 (37,6%)	21,7	9,8		32 (34,8%)	26,2	9,0		27 (31,0%)	26,6	10,7	

Tabla 19. Asociación entre la fragmentación del ADN y los diferentes factores ambientales, considerando tres subgrupos de pacientes y aplicando un análisis de la varianza one-way ANOVA

VOLUMEN	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p-valor	β	(95% CI)	p-valor	β	(95% CI)	p-valor
Edad (años)									
< 35									
35-40	-0,27	-0,78/0,24	0,303	0,36	-0,72/1,44	0,510	-0,09	-0,99/0,81	0,841
>40	-0,01	-0,55/0,53	0,968	0,12	-0,88/1,12	0,810	-0,13	-1,06/0,80	0,784
Nivel de estudios									
Primarios									
Secundarios	0,45	-0,37/1,26	0,280	0,87	-0,69/2,42	0,272	1,59	0,05/3,15	0,043
Superiores	0,04	-0,73/0,82	0,912	0,60	-0,94/2,13	0,440	0,93	-0,61/2,47	0,230
Estado laboral									
A tiempo completo									
A tiempo parcial	0,51	-0,56/1,57	0,350	-0,62	-3,07/1,84	0,616	-0,20	-1,78/1,38	0,800
En paro	-0,88	-1,97/0,21	0,113	-0,44	-2,11/1,23	0,602	-1,26	-2,85/0,32	0,116
IMC									
Normal (18,5-24,9)									
Sobrepeso (25,5-29,9)	-0,06	-0,51/0,40	0,803	-0,07	-0,92/0,78	0,868	0,09	-0,56/0,74	0,777
Obeso (>30)	-0,30	-0,97/0,37	0,381	-0,10	-1,49/1,30	0,888	-0,30	-1,35/0,76	0,575
Consumo Tabaco									
No fuma									
Exfumador	0,02	-0,46/0,50	0,931	0,34	-0,52/1,19	0,435	-0,25	-1,00/0,49	0,501
Fumador	0,02	-0,51/0,56	0,928	0,52	-0,53/1,59	0,326	-0,00	-0,78/0,77	0,996

VOLUMEN	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p-valor	β	(95% CI)	p-valor	β	(95% CI)	p-valor
Consumo de Alcohol									
No bebe									
Sí bebe	0,31	-0,40/1,02	0,392	0,29	-1,40/1,98	0,733	0,62	-0,92/2,15	0,426
Tipo Agua en casa									
Grifo + filtro									
Grifo sin filtro	0,11	-0,51/0,73	0,731	0,69	-0,46/1,84	0,235	-0,20	-1,11/0,72	0,671
Embotellada	0,36	-0,14/0,85	0,154	0,70	-0,20/1,60	0,123	0,87	0,09/1,64	0,029
Exposiciones laborales									
Sin exposición									
Temperaturas	0,04	-1,05/1,12	0,947	0,40	-1,21/2,02	0,618	-0,04	-1,53/1,45	0,960
Químicos y Gases	-0,16	-0,96/0,65	0,704	0,08	-1,57/1,72	0,925	-0,82	-2,65/0,10	0,369
Químicos	-0,15	-1,00/0,70	0,730	0,18	-1,25/1,60	0,805	0,27	-1,39/1,94	0,745
Actividad física									
Ninguna									
Moderada	-0,13	-0,80/0,55	0,710	0,27	-0,97/1,50	0,669	-0,37	-1,40/0,65	0,469
Vigorosa	-0,71	-1,39/-0,02	0,044	-0,31	-1,48/0,87	0,602	-1,52	-2,58/-0,46	0,006
Moderada y vigorosa	-0,18	-0,84/0,47	0,578	-0,04	-1,20/1,13	0,953	-0,21	-1,20/0,78	0,672

VOLUMEN	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p-valor	β	(95% CI)	p-valor	β	(95% CI)	p-valor
Antioxidantes									
No consume									
Sí consume	-0,04	-0,52/0,43	0,858	-0,27	-1,18/0,63	0,545	0,05	-0,69/0,80	0,887
Dieta									
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)									
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	-0,15	-0,59/0,28	0,490	0,22	-0,62/1,06	0,603	0,16	-0,54/0,86	0,640

Tabla 20. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre el volumen seminal y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Edad (años)									
< 35									
35-40	21,85	-8,88/52,58	0,162	-5,20	-16,55/6,15	0,363	-4,29	-65,36/56,78	0,889
>40	12,21	-20,05/44,47	0,456	-3,31	-13,76/7,14	0,529	-5,16	-68,31/57,98	0,870
Nivel de estudios									
Primarios									
Secundarios	-13,34	-62,24/35,57	0,591	-14,64	-30,96/1,68	0,078	-39,85	-144,63/64,92	0,449
Superiores	6,42	-40,40/53,23	0,787	-12,31	-28,36/3,73	0,130	-29,33	-133,79/75,13	0,576
Estado laboral									
A tiempo completo									
A tiempo parcial	29,83	-34,20/93,86	0,359	3,38	-22,32/29,08	0,794	31,39	-75,76/138,53	0,560
En paro	7,96	-57,45/73,38	0,810	-10,30	-27,81/7,21	0,244	62,82	-44,67/170,31	0,247
IMC									
Normal (18,5-24,9)									
Sobrepeso (25,5-29,9)	-6,36	-33,81/21,09	0,648	-0,62	-9,53/8,29	0,890	5,42	-38,72/49,56	0,807
Obeso (>30)	15,67	-24,50/55,85	0,442	-9,25	-23,85/5,36	0,210	14,45	-57,21/86,12	0,688
Consumo Tabaco									
No fuma									
Exfumador	-7,20	-36,04/21,64	0,623	-2,05	-11,02/6,92	0,649	-7,91	-58,56/42,73	0,755
Fumador	-17,18	-49,37/15,01	0,294	-2,88	-13,99/8,23	0,606	-3,63	-56,16/48,90	0,890

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Consumo de Alcohol									
No bebe									
Sí bebe	-43,85	-86,43/1,26	0,044	-6,81	-24,47/10,85	0,444	-124,48	-228,76/-20,19	0,020
Tipo Agua en casa									
Grifo + filtro									
Grifo sin filtro	1,42	-35,71/38,54	0,940	4,33	-7,69/16,36	0,474	62,88	0,79/124,97	0,047
Embotellada	-8,76	-38,43/20,90	0,561	0,78	-8,64/10,21	0,869	13,15	-39,41/65,71	0,618
Exposiciones laborales									
Sin exposición									
Temperaturas	-22,81	-87,89/42,28	0,490	-16,89	-33,80/0,01	0,050	-3,75	-104,74/97,23	0,941
Químicos y Gases	47,02	-1,54/95,59	0,058	4,69	-12,54/21,93	0,588	-5,48	-129,08/118,13	0,930
Químicos	19,46	-31,73/70,66	0,454	4,31	-10,60/19,22	0,566	-27,48	-140,45/85,48	0,628
Actividad física									
Ninguna									
Moderada	35,20	-5,51/75,92	0,090	3,82	-9,15/16,79	0,558	44,78	-24,81/114,36	0,203
Vigorosa	32,31	-8,93/73,54	0,124	-5,29	-17,59/6,99	0,392	62,53	-9,33/134,39	0,087
Moderada y vigorosa	25,63	-13,62/64,89	0,199	-2,16	-14,40/10,07	0,725	14,41	-52,97/81,80	0,670

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Antioxidantes									
No consume									
Sí consume	-6,49	-34,89/21,91	0,653	1,03	-8,44/10,50	0,829	-11,75	-62,06/38,55	0,642
Dieta									
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)									
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	15,23	-10,91/41,36	0,252	-5,98	-14,82/2,85	0,181	-16,72	-64,17/30,73	0,483

Tabla 21. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la concentración espermática y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.

MOVILIDAD PROGRESIVA	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Edad (años)									
< 35									
35-40	-5,59	-11,86/0,68	0,080	-7,13	-16,00/1,74	0,113	-4,53	-15,71/6,65	0,420
>40	-9,26	-15,84/-2,67	0,006	-9,97	-18,14/-1,80	0,018	-7,53	-19,10/4,03	0,197
Nivel de estudios									
Primarios									
Secundarios	-5,32	-15,30/4,66	0,294	1,16	-11,60/13,92	0,856	-12,55	-31,73/6,64	0,195
Superiores	3,56	-5,99/13,11	0,463	5,02	-7,52/17,57	0,426	-5,42	-24,55/13,71	0,572
Estado laboral									
A tiempo completo									
A tiempo parcial	-3,48	-16,55/9,58	0,599	-5,70	-25,79/14,39	0,573	-6,02	-25,64/13,60	0,541
En paro	0,35	-13,00/13,70	0,959	3,23	-10,46/16,92	0,639	10,10	-9,58/29,78	0,308
IMC									
Normal (18,5-24,9)									
Sobrepeso (25,5-29,9)	7,36	1,76/12,97	0,010	4,10	-2,87/11,07	0,244	7,65	-0,43/15,74	0,063
Obeso (>30)	10,38	2,18/18,58	0,013	-0,78	-12,19/10,64	0,892	2,38	-10,74/15,50	0,717
Consumo Tabaco									
No fuma									
Exfumador	0,00	-5,89/5,88	0,999	-0,14	-7,15/6,88	0,969	3,79	-5,49/ 13,06	0,417
Fumador	0,83	-5,74/7,40	0,803	2,79	-5,90/11,47	0,524	-5,74	-15,36/3,88	0,237

MOVILIDAD PROGRESIVA	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Consumo de Alcohol									
No bebe									
Sí bebe	2,83	-5,86/11,52	0,521	10,30	-3,51/24,10	0,141	-11,64	-30,74/7,45	0,227
Tipo Agua en casa									
Grifo + filtro									
Grifo sin filtro	-1,17	-8,74/6,41	0,761	2,67	-6,73/12,07	0,572	9,52	-1,85/20,89	0,099
Embotellada	0,48	-5,57/6,53	0,876	1,74	-5,62/9,11	0,638	4,84	-4,78/14,46	0,318
Exposiciones laborales									
Sin exposición									
Temperaturas	-6,31	-19,59/6,98	0,350	2,70	-10,52/15,91	0,685	3,95	-14,54/22,44	0,670
Químicos y Gases	10,09	0,18/20,00	0,046	5,62	-7,86/19,09	0,408	7,01	-15,62/29,65	0,537
Químicos	-3,08	-13,52/7,37	0,562	-7,16	-18,81/4,51	0,225	-9,48	-30,17/11,20	0,362
Actividad física									
Ninguna									
Moderada	4,70	-3,61/13,01	0,266	5,58	-4,56/15,72	0,276	8,24	-4,50/20,98	0,201
Vigorosa	5,82	-2,60/14,23	0,174	6,42	-3,19/16,02	0,187	6,95	-6,21/20,11	0,294
Moderada y vigorosa	6,73	-1,28/14,75	0,099	-0,30	-9,87/9,27	0,950	-0,57	-12,91/11,77	0,926

MOVILIDAD PROGRESIVA	Para todos los pacientes n=194			Para concentraciones <50 mill/mL n=85			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Antioxidantes									
No consume									
Sí consume	1,70	-4,09/7,50	0,562	-1,34	-8,74/6,07	0,720	-0,89	-10,11/8,32	0,847
Dieta									
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)									
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	3,63	-1,70/8,96	0,181	1,52	-5,39/8,42	0,662	-1,82	-10,51/6,87	0,677

Tabla 22. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la movilidad progresiva y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.

MORFOLOGÍA	Para todos los pacientes n=96			Para concentraciones <50 mill/mL n=50			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Edad (años)									
< 35									
35-40	-0,45	-1,55/0,66	0,421	-0,10	-1,91/1,72	0,915	-0,04	-1,52/1,44	0,960
>40	0,28	-0,90/1,45	0,643	0,01	-1,83/1,86	0,988	0,15	-1,40/1,70	0,843
Nivel de estudios									
Primarios									
Secundarios	0,03	-1,66/1,72	0,973	-0,86	-3,34/1,61	0,480	-3,59	-6,04/-1,15	0,006
Superiores	0,88	-0,77/2,53	0,292	0,13	-2,28/2,53	0,914	-2,25	-4,47/-0,03	0,047
Estado laboral									
A tiempo completo									
A tiempo parcial	-0,26	-2,10/1,58	0,777	0,39	-2,73/3,51	0,801	1,50	-0,64/3,64	0,161
En paro	-2,06	-4,39/0,27	0,082	-1,07	-5,47/3,33	0,623	-1,78	-5,16/1,60	0,288
IMC									
Normal (18,5-24,9)									
Sobrepeso (25,5-29,9)	1,21	0,21/2,21	0,018	0,86	-5,85/2,30	0,234	0,86	-0,20/1,93	0,108
Obeso (>30)	2,00	0,64/3,37	0,005	-0,70	-3,29/1,89	0,586	-2,15	-4,53/0,24	0,075
Consumo Tabaco									
No fuma									
Exfumador	1,18	0,13/2,24	0,029	1,32	-0,01/2,65	0,052	1,69	0,29/3,09	0,020
Fumador	1,04	-0,13/2,20	0,081	1,41	-0,63/3,44	0,168	1,30	-0,09/2,70	0,066

MORFOLOGÍA	Para todos los pacientes n=96			Para concentraciones <50 mill/mL n=50			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Consumo de Alcohol									
No bebe									
Sí bebe	0,63	-1,05/2,30	0,459	-1,24	-4,65/2,16	0,461	ND	ND	ND
Tipo Agua en casa									
Grifo + filtro									
Grifo sin filtro	1,11	-0,25/2,46	0,107	-0,48	-2,71/1,75	0,662	-0,43	-2,07/1,21	0,593
Embotellada	0,31	-0,78/1,40	0,577	-0,34	-1,78/1,11	0,634	-1,23	-2,50/0,03	0,055
Exposiciones laborales									
Sin exposición									
Temperaturas	0,65	-1,79/3,09	0,596	0,20	-2,28/2,68	0,869	-0,88	-3,14/1,38	0,428
Químicos y Gases	0,83	-0,82/2,47	0,321	0,85	-1,79/3,49	0,516	3,24	-0,50/6,98	0,086
Químicos	0,58	-0,98/2,14	0,458	-0,74	-2,76/1,28	0,460	-1,25	-3,70/1,21	0,304
Actividad física									
Ninguna									
Moderada	1,24	-0,24/2,71	0,098	1,29	-0,84/3,43	0,225	1,17	-0,50/2,84	0,161
Vigorosa	0,87	-0,59/2,32	0,240	1,05	-0,93/3,04	0,285	0,94	-0,95/2,83	0,313
Moderada y vigorosa	1,09	-0,26/2,44	0,113	1,02	-0,78/2,82	0,256	0,88	-0,75/2,52	0,275

MORFOLOGÍA	Para todos los pacientes n=96			Para concentraciones <50 mill/mL n=50			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Antioxidantes									
No consume									
Sí consume	-0,36	-1,33/0,61	0,467	-0,10	-1,60/1,40	0,892	-0,81	-2,08/0,46	0,201
Dieta									
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)									
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	0,55	-0,36/1,46	0,231	0,69	-0,66/2,03	0,305	-0,58	-1,82/0,66	0,340

Tabla 23. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la morfología y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.

ND, no hay datos para este parámetro y este subgrupo de población

FRAGMENTACIÓN	Para todos los pacientes n=183			Para concentraciones <50 mill/mL n=79			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Edad (años)									
< 35									
35-40	2,50	-1,31/6,30	0,197	2,45	-4,47/9,37	0,482	3,79	-4,77/12,35	0,378
>40	6,21	2,29/10,13	0,002	5,99	-0,29/12,26	0,061	6,89	-1,84/15,62	0,119
Nivel de estudios									
Primarios									
Secundarios	3,11	-2,97/9,20	0,314	3,46	-7,13/14,05	0,516	-1,20	-17,23/14,83	0,882
Superiores	1,25	-4,55/7,05	0,670	5,47	-5,09/16,03	0,304	-2,17	-18,31/13,98	0,789
Estado laboral									
A tiempo completo									
A tiempo parcial	-7,33	-15,59/0,92	0,081	-5,17	-20,69/10,35	0,507	-4,04	-18,59/10,51	0,580
En paro	2,18	-6,28/10,63	0,612	0,60	-9,92/11,12	0,910	2,27	-12,34/16,88	0,757
IMC									
Normal (18,5-24,9)									
Sobrepeso (25,5-29,9)	-1,09	-4,52/2,33	0,529	0,73	-4,82/6,29	0,793	-1,51	-7,51/4,49	0,617
Obeso (>30)	-3,79	-8,72/1,15	0,132	3,46	-5,97/12,88	0,466	-4,83	-14,95/5,30	0,343
Consumo Tabaco									
No fuma									
Exfumador	-0,69	-4,20/2,81	0,697	-0,37	-5,71/4,98	0,891	-0,80	-7,64/6,04	0,815
Fumador	-0,90	-4,97/3,17	0,662	0,33	-7,24/7,90	0,931	-0,07	-7,60/7,47	0,986

FRAGMENTACIÓN DEL ADN	Para todos los pacientes n=183			Para concentraciones <50 mill/mL n=79			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Consumo de Alcohol									
No bebe									
Sí bebe	-0,05	-5,52/5,41	0,984	-5,87	-17,18/5,45	0,303	-2,38	-19,16/14,39	0,776
Tipo Agua en casa									
Grifo + filtro									
Grifo sin filtro	2,02	-2,50/6,53	0,378	-0,80	-8,10/6,50	0,827	-3,23	-11,78/5,32	0,452
Embotellada	-1,44	-5,06/2,17	0,431	-2,94	-8,70/2,81	0,310	-7,14	-14,42/0,14	0,054
Exposiciones laborales									
Sin exposición									
Temperaturas	4,97	-3,15/13,09	0,228	4,44	-5,89/14,76	0,393	2,95	-11,41/17,31	0,682
Químicos y Gases	-3,93	-9,79/1,92	0,187	-4,36	-14,78/6,05	0,405	-4,60	-21,34/12,13	0,583
Químicos	0,86	-5,29/7,02	0,782	-0,42	-9,26/8,41	0,924	0,13	-15,29/15,54	0,987
Actividad física									
Ninguna									
Moderada	1,11	-4,15/6,38	0,677	0,96	-7,43/9,35	0,819	2,02	-8,12/12,16	0,691
Vigorosa	-0,17	-5,35/5,02	0,950	0,10	-7,52/7,71	0,980	-1,90	-12,18/8,39	0,713
Moderada y vigorosa	1,56	-3,43/6,55	0,538	8,16	0,82/15,51	0,030	8,62	-0,88/18,12	0,074

FRAGMENTACIÓN DEL ADN	Para todos los pacientes n=183			Para concentraciones <50 mill/mL n=79			Con factor masculino n=77		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Antioxidantes									
No consume									
Sí consume	-2,66	-6,09/0,77	0,127	-1,26	-7,00/4,48	0,662	-2,49	-9,30/4,31	0,465
Dieta									
Cat. 1 (de 1 a 3 puntos)									
Cat. 2 (de 4 a 6 puntos)	-2,07	-5,31/1,16	0,207	0,79	-4,79/6,38	0,777	-0,73	-7,46/6,01	0,829

Tabla 24. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple entre la fragmentación del ADN y los principales factores ambientales, para cada subgrupo de pacientes.

4.2.3. Contaminación atmosférica

A raíz de la ampliación de este proyecto tras la obtención de financiación a través de un FIS, se han reclutado hasta ahora 45 pacientes más, que han completado el cuestionario y han aportado una muestra de sangre y de orina que se mantienen congelada para estudios posteriores. Una vez finalizado el reclutamiento de pacientes, se procederá a aplicar las estimaciones de las exposiciones a los contaminantes atmosféricos según la residencia de cada uno de los participantes.

No obstante, se tratará en la discusión las conclusiones obtenidas de la revisión sistemática realizada y publicada (anexo 1) para establecer el estado actual del conocimiento, valorando los trabajos más importantes que relacionan la exposición a contaminantes atmosféricos con los parámetros de seminales.

PARTE 5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

5.1. Discusión

5.1.1. En individuos jóvenes y sanos

Los resultados de este estudio realizado en hombres jóvenes y sanos indican que los efectos de los diferentes contaminantes y de los hábitos de vida considerados no ejercen un efecto aparentemente perjudicial, tal y como cabría esperarse en un inicio. Sin embargo, cabe destacar la disminución del volumen del eyaculado tras el consumo de cannabis y el efecto ejercido por la temperatura ambiental tanto para la concentración de espermatozoides como para la movilidad progresiva, que provoca un descenso en dichos parámetros con significancia estadística.

5.1.1.1. Hábitos de vida

Para poder valorar con detalle los resultados obtenidos a nivel de hábitos de vida, debemos tener en cuenta el tipo de población considerada. Se trata de individuos con una media inferior a 25 años que presentan unos parámetros seminales cuya media supera ampliamente los valores normales considerados en el manual de la OMS de 2010.

Detectar variaciones estadísticamente significativas en estos individuos no es fácil, considerando que en la mayoría de los casos no se detectan unos hábitos de vida fuera de lo normal. No obstante, nos permite tener una idea inicial de la repercusión en los valores seminales de los principales hábitos que a priori pueden ser nocivos, pero de los que desconocemos su efecto real.

El consumo de tabaco de manera moderada lo realiza el 33,7% de los individuos jóvenes, y no modifica de manera significativa ninguno de los parámetros analizados, aunque hay una disminución considerable del porcentaje de movilidad progresiva. Hay muchos estudios que evalúan los efectos del tabaco sobre los parámetros seminales, y se describe en la literatura una disminución del volumen del eyaculado, descenso de la concentración espermática, del contaje total, disminución de la movilidad y de las formas normales (Lotti *et al.*, 2015, Harlev *et al.*, 2015, Sharma *et al.*, 2013, Sadeu *et al.*, 2010). Sin embargo, no se sabe si la magnitud de estos efectos es suficiente como para afectar a la

fertilidad masculina (Harlev *et al*, 2015, Hughes *et al*, 1996, Bolumar *et al*, 1996). Lo que sí está bien establecido es que el tabaco incrementa la presencia de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), aumentando el nivel de estrés oxidativo con efectos que se han descrito a nivel de vitalidad, morfología, o afectando la funcionalidad de la célula. Además, en general, los hombres fumadores tienen una actividad antioxidante más baja que los no fumadores (Pasqualotto *et al*, 2008). Seguramente, al ser una población joven, los efectos del estrés oxidativo aún no son tan evidentes, pero es posible que con el tiempo y los años de consumo de tabaco se acabe manifestando una disminución de los parámetros seminales. Por ahora es difícil de establecer los mecanismos exactos que expliquen cómo el tabaco disminuye la fertilidad masculina (Pfeifer *et al*, 2012), pero hay suficientes evidencias como para que así sea, teniendo en cuenta además, el efecto acumulativo que puede existir con otros hábitos de vida.

El consumo moderado de alcohol lo realizan el 76.3%, y no parece afectar a los parámetros seminales, aunque se sabe que dependiendo de la cantidad consumida, el etanol afecta en la producción de hormonas sexuales en el hombre (Sadeu *et al*, 2010). En nuestro estudio, incluso se detecta un aumento en la concentración espermática, que se asocia a que el consumo realizado se sitúa en general en valores bajos o moderados y de nuevo a la edad de los individuos, que seguramente metabolizan el alcohol de manera más eficiente que en personas de edad más avanzada. Además, no se ha distinguido el tipo ni la cantidad de bebida alcohólica, y se sabe que no todas las bebidas alcohólicas tienen el mismo efecto perjudicial. Por ejemplo, el consumo moderado de vino no parece tener un efecto tan perjudicial como el whisky o la cerveza (Ramlau-Hansen *et al*, 2010). La mayoría de estudios relacionan el consumo de alcohol con un aumento de la infertilidad masculina reduciendo el volumen del eyaculado, las formas normales e incluso causando leucocitosis. Parece que cuando se cesa el consumo de alcohol, se produce una recuperación parcial de estos parámetros (La Vignera *et al*, 2013). Se considera un consumo elevado de alcohol con más de 8 consumiciones a la semana que supongan > 40g de alcohol por día, se asocia a una disrupción de la espermatogénesis.

El consumo moderado de cannabis es declarado por el 10.5% de los participantes, y disminuye el volumen del eyaculado, y por tanto, muy probablemente también el contaje total de espermatozoides. Estos resultados se correlacionan con un trabajo clásico de Hembree *et al*. (1980), quien observó que el cannabis causa un descenso en el número de

espermatozoides sin un efecto evidente en otros parámetros como en la movilidad o en la morfología, aunque de nuevo, se pueden encontrar estudios con resultados contradictorios. Más recientemente, Gundersen *et al.* (2015) obtuvo exactamente los mismos resultados, pero observó que el cannabis combinado con otras sustancias como alcohol o tabaco incrementa los resultados negativos.

Algunos estudios describen que los espermatozoides disponen de receptores endógenos a cannabinoides que causan una disminución de la movilidad, y se inhibe la capacitación y la reacción acrosómica (Fronczak *et al.*, 2012). Parece además que bloquea el eje hipotálamo-hipofisario gonadal, causando una disminución de LH y por tanto disminuyendo la producción de testosterona en las células de Leydig. También aumenta la apoptosis de células de Sertoli causando disrupción de la espermatogénesis (Battista *et al.*, 2008).

También se ha tenido en cuenta la utilización de medicación, que afecta al 5.3% de los individuos sanos. El tipo de medicación utilizada en nuestra población son: antibióticos, antiinflamatorios, antihistamínicos, etc. No se ha detectado ninguna diferencia estadísticamente significativa en este grupo de individuos, pero se tratan de medicamentos muy diversos, de un grupo muy reducido y seguramente insuficiente como para poder observar diferencias. No obstante, está demostrado que algunos antibióticos como la nitrofurantoína, eritromicina, gentamicina, neomicina, etc., tienen un efecto negativo en los parámetros seminales (Hendrick *et al.*, 2000 y Schlegel *et al.*, 1991).

5.1.1.2. Contaminantes atmosféricos y temperatura ambiental

Aunque es evidente que los niveles de contaminación atmosférica, durante este intervalo de tiempo, superan claramente los límites establecidos por la OMS, los resultados no detectan, de forma general, efectos negativos estadísticamente significativos sobre la calidad seminal.

Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios (Rubes *et al.*, 2005, Selevan *et al.*, 2000 y Hansen *et al.*, 2010) donde tampoco se pudo demostrar efectos negativos de la polución en los parámetros seminales clásicos. No obstante, debe tenerse en cuenta que en este estudio los participantes son individuos menores de 30 años y sanos, la gran mayoría con una calidad seminal bastante superior a lo que se considera normal, y de alguna manera parece que este hecho contrarresta los efectos de la polución o incluso de los hábitos de vida.

En un estudio llevado a cabo en tres ciudades de EEUU, y acorde a los resultados que se han obtenido en este estudio, Hansen *et al.* (2010) evaluó la calidad espermática de 228 hombres fértiles con diferentes grados de exposición a contaminantes y no encontró ninguna asociación entre la exposición a PM_{2.5} y la concentración o contaje total de espermatozoides. De forma similar, Hammoud *et al.* (2010) no encontró asociación al considerar la concentración espermática en unos de los estudios realizados en la zona de Teplice.

Sin duda, la importancia de este estudio radica en que se ha tenido en cuenta un número considerable de individuos de diferentes partes del área metropolitana de Barcelona, con muestras repetidas, aportando una media de 3,5 seminogramas por participante. Evidentemente, saber cómo responde una representación de la población sana frente a la polución del aire o los hábitos de vida, nos pueden ayudar a entender lo que veremos más tarde con una población que se consideran pacientes, y sobre todo, para los que presentan alguna patología y/o tienen dificultades a nivel reproductivo.

Hay limitaciones de nuestro estudio, se trata de un estudio retrospectivo y se pueden intuir muchos factores de confusión. Por ejemplo, no se sabe el tiempo que pasa el individuo en su lugar de residencia, y seguramente hay más hábitos de vida que no se han considerado. Aunque sabemos que hay una estacionalidad anual en los niveles de contaminación (Rubes *et al.*, 2005), este factor se minimiza cuando se consideran medidas repetidas para cada individuo. Tampoco se han considerado otros parámetros potencialmente sensibles a la polución, como puede ser la fragmentación del ADN, el porcentaje de apoptosis celular, el nivel de estrés oxidativo, etc.

Hay muchos factores de confusión que pueden estar enmascarando los resultados, y estos resultados no deben descartar que se produzca un efecto continuo acumulativo en la espermatogénesis, sobre todo en exposiciones elevadas a contaminantes. En este sentido, cabe destacar el trabajo de Rubes *et al.* (2005), quien reporta una asociación entre la polución y un incremento de la fragmentación del ADN sin detectar otras variaciones en otros parámetros seminales. Por tanto, no sólo los parámetros clásicos son los que pueden ser alterados, sino que hay otros parámetros funcionales, quizás más importantes que también pueden causar una disfunción de la célula del espermatozoide.

Hay muchas incógnitas pendientes de resolver para entender exactamente los mecanismos de acción de la polución a nivel químico y su posible repercusión sobre la

fisiología reproductiva. Las consecuencias de estas exposiciones a nivel reproductivo no están nada claras y su relevancia clínica muchas veces es desconocida (Sadeu, 2010). Dichos efectos no se han detectado en este estudio, seguramente porque se trata de una población joven, sana y con parámetros seminales normales, y existen numerosos factores de confusión. Está claro, que este tipo de estudios deben ampliarse y es necesario diseñar otros, no sólo con individuos jóvenes y sanos, si no con pacientes infértiles. Este es el siguiente paso que se ha intentado abordar en la siguiente parte del proyecto.

No obstante, se ha encontrado una clara correlación entre la temperatura ambiental y los parámetros seminales, concretamente para la concentración de espermatozoides y para la movilidad progresiva. Se sabe que hay una correlación negativa entre la temperatura escrotal y la disminución de la concentración espermática y de la inhibina B, hormona considerada un marcador bioquímico de la producción espermática (Hjollund *et al*, 2002), y que los varones infértiles presentan una mayor temperatura escrotal que los varones fértiles. Pero hasta ahora, pocos estudios han relacionado el efecto de la temperatura ambiental en la calidad seminal de individuos normozoospermicos. Algunos estudios, se han centrado en los cambios estacionales, y parece haber una asociación relacionada con ritmos circadianos anuales (Levitas *et al*, 2013). Nuestros resultados muestran que la temperatura ambiental también tiene influencia negativa en los principales parámetros seminales, concentración y movilidad, aunque afecta de manera más intensamente a la movilidad progresiva, mostrando un mismo patrón de comportamiento para cada uno de los factores de ajuste, que aumenta en todos los casos a medida que los intervalos de tiempo considerados son más cercanos al día de la eyaculación (figura 7C). Estos efectos persisten después de ajustar por diversos contaminantes atmosféricos.

El intervalo de tiempo en el que se observa más efecto corresponde a 70-90 días antes de la eyaculación, momento que corresponde a las fases finales de maduración del espermatozoide. Este efecto es aún mayor cuando se considera el periodo global que incluye a todo el ciclo de espermatogénesis (0-90 días).

5.1.2. En pacientes de clínicas de Reproducción Asistida

Considerando a este grupo de pacientes, con una media de edad de 37,6 años, se observa que a nivel seminal se trata de una población bastante diferente al grupo de individuos jóvenes y sanos. Aunque estrictamente sólo hay un 18,1% de pacientes normozoospermicos,

sin considerar la teratozoospermia, tendríamos a un 49,8% de los individuos con parámetros de concentración y de movilidad normales. Nos encontramos con una población, que aunque a nivel de pareja tienen problemas reproductivos, la media de la concentración y movilidad espermática se encuentra bastante por encima a lo considerado normal, y en general, se reportan hábitos de vida saludables.

5.1.2.1. Hábitos de vida y factores sociodemográficos

5.1.2.1.1 Asociación entre calidad seminal y hábitos de vida en las 24 horas previas al análisis seminal

Se ha realizado un estudio para valorar el efecto de algunos hábitos de vida sobre la calidad seminal 24 horas antes de la eyaculación. En nuestra población el consumo de tabaco 24 horas antes de la eyaculación, ocurre en el 22,4% de los pacientes, y no se relaciona con una alteración estadísticamente significativa de la calidad seminal, aunque hay una disminución tanto de la concentración como de la movilidad. Seguramente es un problema de poder estadístico, ya que la concentración en fumadores es de 72,6 mill/mL vs 118,4 mill/mL en no fumadores. Pasa igual a nivel de movilidad progresiva.

Se observa que el consumo del tabaco durante las 24 horas antes del eyaculado no afecta a los parámetros seminales, esto nos hace pensar que el posible efecto del consumo de tabaco se produce antes de las 24 horas.

De todas maneras, está claro que no sólo es necesario saber si se fuma o no se fuma, la cantidad de cigarrillos consumidos es un elemento clave que en otros estudios ya se ha visto que tiene importancia, aunque hasta ahora no se había valorado durante las 24 horas previas a la eyaculación.

Un metaanálisis reciente considerando a 5.865 individuos concluye que el consumo de tabaco se asocia a una disminución de la concentración y movilidad espermática, sin un efecto tan evidente en la morfología (Sharma *et al.*, 2016). Este metaanálisis, en concordancia con nuestros resultados, detecta que la calidad del esperma se ve más comprometida en fumadores moderados y altos, y además los efectos son más evidentes en hombres infértiles que en el resto de la población. Aún no se sabe de manera cierta los mecanismos fisiopatológicos de cómo el tabaco puede afectar a la calidad seminal, pero se

sabe que componentes químicos del tabaco tienen un efecto nocivo en el desarrollo de las células germinales masculinas (Zenzes *et al.*, 2000).

En otro estudio con más de 7.000 parejas (Yang *et al.*, 2017) encuentran que los maridos que son fumadores se asocian con parejas infértiles, y hay una asociación dosis-respuesta, observando un incremento de efectos negativos a medida que se incrementan los años de tabaquismo, los cigarrillos por día, y el consumo total de cigarrillos. No obstante, existe controversia ya que también hay publicados estudios en el que el tabaco no parece tener efecto sobre la fertilidad o lo tiene muy poco.

En este estudio, el consumo de café/té parece tener un efecto beneficioso sobre la fragmentación que podría ser debido a su capacidad anti-oxidante. Evidentemente, depende de la cantidad de café que tome el individuo, y algunos estudios hablan que en consumos muy elevados (hasta 7 tazas/día) es cuando se perciben efectos en la calidad seminal son mucho más evidentes. En nuestro estudio, no se alcanzaba en ningún caso estos niveles de consumo de café.

Otros estudios relacionan el consumo de café en hombres de parejas que se someten a tratamientos de Reproducción Asistida con una menor probabilidad de conseguir nacimiento (Karmon *et al.*, 2017).

5.1.2.1.1. Asociación entre los factores ambientales y los parámetros seminales a través del cuestionario de exposición ambiental

Los resultados obtenidos en cuanto a la edad, apuntan a que existe una asociación negativa con la movilidad espermática y la fragmentación del ADN, resultados acordes al metaanálisis publicado por Johnson *et al.* (2015), con un total de 93.839 individuos y que concluye que la edad paterna afecta al volumen, movilidad progresiva y fragmentación del ADN. Tampoco observan que la concentración espermática disminuya con la edad. Lo que parece bien descrito es que los hombres mayores de 45 años tardan más tiempo para concebir, incluso 1 ó 2 años más en comparación con hombres menores de 25 años (Hassan *et al.*, 2003).

Se ha detectado que aquellos pacientes con un nivel de estudios superiores presentan una concentración y movilidad espermática más alta, seguramente debido a que estos individuos están menos en contacto con tóxicos ocupacionales y tienen una mejor higiene de vida.

En cuanto al efecto del IMC, se observa que hay una mejoría tanto de la movilidad como de las formas normales. Se sabe que el aumento de IMC está relacionado con alteraciones en los niveles hormonales, pero en este estudio, su efecto no se refleja claramente con una alteración de los parámetros seminales, aunque parece que podría incrementar la fragmentación del ADN. Un estudio realizado por Mormandi *et al.* (2013), llega a conclusiones similares, sin encontrar ninguna asociación entre el IMC y los parámetros seminales convencionales y más recientemente, Alshahrani *et al.* (2016), sólo encuentra una asociación significativa disminuyendo la concentración espermática. Por otro lado, parece que es necesario considerar a individuos con un IMC $>35 \text{ kg/m}^2$ para observar variaciones en la concentración espermática (Chavarro *et al.*, 2010).

Las asociaciones establecidas con diferentes factores relacionados con los hábitos de vida permiten observar tendencias que hacen sospechar sobre un efecto negativo en algunos de los parámetros seminales. No obstante, hay que considerar que debido a los múltiples factores de confusión, muchas de estas asociaciones son difíciles de detectar. La potencia de este estudio, y lo que lo diferencia de otros, es que se consideran numerosos seminogramas por individuo, lo que aumenta el poder del análisis y disminuye sesgos (Tielemans *et al.*, 2002).

Al analizar el efecto del tabaco en la población de pacientes, cabe destacar que en el grupo de exfumadores se encuentra una asociación positiva para la morfología espermática, y viceversa para los fumadores. Esto confirmaría la posibilidad de que los efectos del tabaco son reversibles y por ese motivo los exfumadores muestran esa mejoría. En este estudio se ha demostrado, que un consumo elevado de más de 15 paquetes al año, se asocia a una disminución de la movilidad, pero no se observa que las diferencias sean estadísticamente significativas.

Con el fin de unificar criterios a la hora de calcular el consumo de alcohol, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2008), estipuló su medida a través de la Unidad de Bebida Estándar (U.B.E.). Cada U.B.E. supone entre 8 y 13 gramos de alcohol puro. Con una U.B.E. se puede medir la cantidad de alcohol puro, no la cantidad de líquido que

se bebe. Un hígado sano puede metabolizar alrededor de una U.B.E cada hora u hora y media.

La recomendación de la OMS con respecto al consumo de bebidas alcohólicas sería la siguiente: no superar 30g/día para hombres. Para saber si una persona ha superado el límite y tiene mucha probabilidad de haberse convertido en alcohólica, se puede tomar como criterio la “ingesta excesiva” que define la OMS, que es de 60 gramos al día. Esta circunstancia no se ha dado en ninguno de los participantes de este estudio, aun así, se ha detectado que el alcohol disminuye la concentración y se asocia con un aumento de la fragmentación del ADN, sobre todo en el grupo de individuos con factor masculino.

Respecto al consumo del agua, se ha considerado interesante analizar este parámetro, ya que podría estar involucrado más de lo esperado. A raíz de los resultados de este estudio, parece que el uso de filtros en el agua de red no es beneficioso para la calidad seminal. Hay que tener en cuenta que existen diversos métodos para tratar el agua de red, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Desde descalcificadores, hasta filtros de carbono activo, ósmosis o catalizadores que pueden aumentar la calidad del agua en cuanto a la eliminación de sales, impurezas, nitratos, bacterias, pero también se ha descrito inconvenientes como que el agua sea demasiado pobre en minerales, o que una falta de mantenimiento adecuado del filtro contamine el agua con más bacterias de lo normal. Hay que tener en cuenta que estos filtros suelen eliminar el cloro que lleva el agua que la protege contra las bacterias. Es necesario poder estudiar este parámetro con más detalle para obtener conclusiones más fiables. Sin embargo, cabe destacar la asociación detectada entre el agua de red y un aumento de la concentración espermática.

Las exposiciones ocupacionales se han asociado claramente a una disminución de la concentración y de la movilidad espermática. Es uno de los factores en los que se ha podido observar más claramente esta asociación, que en la literatura ya está descrita con un incremento de la astenozoospermia, de la oligozoospermia y de la teratozoospermia. Hay muchos tipos químicos y de factores físicos que pueden alterar la calidad seminal, y en un futuro será necesario tratarlos de forma más individualizada teniendo en cuenta que en nuestro estudio hay una asociación tras el análisis de regresión multivariante no esperada entre la movilidad y los individuos expuestos a químicos y gases.

La actividad física vigorosa se asocia con una disminución del volumen del eyaculado y también con un aumento de la fragmentación del ADN. Seguramente nuestra población no es la ideal para identificar diferencias entre el nivel de intensidad del ejercicio físico, pero el resultado se ajusta a lo publicado que acaba concluyendo que la práctica de ejercicio intenso acaba afectando a los parámetros seminales, aunque una vida sedentaria tampoco beneficia la calidad seminal.

Cerca del 27% de los pacientes consumen antioxidantes, a veces prescrito por el médico, y otras por propia iniciativa del paciente. Hay una amplia variedad de complementos alimenticios que se presentan con propiedades antioxidantes, aunque el beneficio para el paciente no siempre es evidente. Aunque no parecen tener un efecto detectable a nivel de concentración o movilidad espermática, en algunos casos podría disminuir la fragmentación del ADN, pero seguramente dependerá del origen y del tipo de daño del ADN. En este estudio, los efectos de los antioxidantes en el grupo de pacientes no mejoran los parámetros seminales de manera estadísticamente significativa, y será necesario revisar si el consumo de estos complementos alimenticios beneficia o no la salud reproductiva del paciente.

Finalmente, después de hacer una categorización según los alimentos consumidos, identificando los pacientes con hábitos dietéticos más sanos, no se observan diferencias significativas, aunque en la mayoría de casos las medias de cada uno de los parámetros son mejores en los pacientes con hábitos dietéticos más sanos. Hay trabajos recientes (Oostingh *et al.*, 2017, Salas-Huetos *et al.*, 2017 y Karayiannis *et al.*, 2017) que concluyen que sí existe una asociación positiva entre los hábitos dietéticos y los parámetros seminales, pero sobre todo en aquellos individuos que son oligoastenoteratozoospermicos. Por este motivo, conviene valorar si es necesario un asesoramiento nutricional preconcepcional en estas parejas.

5.1.2.2. Contaminantes atmosféricos

Aunque dentro del proyecto está previsto realizar la asociación de la calidad seminal con los contaminantes atmosféricos en función de la dirección de residencia y de trabajo de cada participante, dado que se ha ampliado el estudio y se están reclutando más pacientes, dicha asociación se realizará en una fase posterior.

No obstante, se ha realizado una revisión sistemática (Lafuente *et al.*, 2016) que ha puesto de manifiesto que la contaminación del aire puede afectar a la calidad seminal. De los 17 estudios incluidos en la revisión, todos menos uno reportan alguna alteración significativa en alguno de los parámetros seminales analizados asociándolos con al menos uno de los contaminantes estudiados.

Fragmentación del ADN: la mitad de los estudios incluidos en la revisión sistemática detecta que hay un aumento significativo asociado a la exposición de contaminantes del aire (Rubes *et al.*, 2005, Selevan *et al.*, 2000 y Calogero *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque los estudios tenían una puntuación similar en la escala de Newcastle-Ottawa, ninguno de los tres estudios que encuentra relación realiza medidas individuales de la exposición y el número de participantes es relativamente bajo. Por tanto, la evidencia sobre el efecto de la polución del aire sobre la fragmentación del ADN es débil, pero sugiere un posible efecto negativo.

Sin embargo, hay posibles mecanismos conocidos que apoyarían la teoría de que los contaminantes del aire aumentan la fragmentación del ADN. Y es que la polución del aire se asocia a un aumento del estrés oxidativo, responsable de producir especies reactivas del oxígeno (ROS) o radicales libres que causan fragmentación del ADN, que ocurre en una de las etapas más avanzadas de la apoptosis de los espermatozoides. Se sabe que la fragmentación del ADN producirá una baja integridad de la cromatina espermática, indicador conocido como buen predictor para detectar esterilidad masculina (Evenson *et al.*, 2016), que aumenta el tiempo de la concepción, y el fallo para conseguir embarazo. En tratamientos de reproducción asistida se relaciona de manera más directa con el aumento de la tasa de abortos espontáneos (Lin *et al.*, 2008). Es evidente que cualquier causa que pueda hacer aumentar la fragmentación del ADN podría aumentar los problemas reproductivos, por lo que valorando el estado actual del conocimiento puede afirmarse que la polución del aire podría aumentar el daño en el ADN del espermatozoide.

Hay publicados un par de estudios que valoran el incremento de la fragmentación del ADN asociado a varios polimorfismos de genes metabólicos (Rubes *et al.*, 2007 y Rubes *et al.*, 2010). Rubes (2007) estudió hombres con polimorfismos en genes como el glutatión-S transferasa M1 (GSTM1), y otros genes reparadores (XRCC1, XPD6 y XPD23) y observó que estos individuos tenían disminuida la capacidad de detoxificar metabolitos reactivos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Pudo establecer una asociación entre estos polimorfismos y un daño medio o alto del ADN espermático.

Movilidad espermática: la mitad de los trabajos incluidos en la revisión detectan una disminución significativa en la movilidad espermática asociada a la polución del aire. Sin embargo, estos estudios tenían una puntuación más baja en la escala de Newcastle-Ottawa que el resto, por lo que la asociación de la exposición a la polución del aire con la movilidad espermática parece ser probablemente limitada, si es que realmente existe.

Recuento de espermatozoides: De los 13 estudios incluidos en la revisión, seis encuentran que el recuento de espermatozoides se ve afectado por la exposición a los contaminantes del aire detectando una disminución significativa. La validez científica de estos estudios medida en la escala de Newcastle-Ottawa era muy similar en los dos grupos, por lo que no es concluyente poder establecer un efecto de la exposición a la contaminación del aire sobre el recuento espermático.

Morfología del espermatozoide: de los 10 estudios que analizaban la morfología, hay 7 estudios que encontraron una relación entre la exposición a la polución del aire y una disminución de las formas normales del espermatozoide. La valoración de estos estudios mediante la escala de Newcastle-Ottawa parecida en ambos grupos por lo que el grado de evidencia del efecto negativo sobre la morfología es bastante evidente. Aunque el efecto de la morfología espermática sobre la fertilidad sólo parece que es relevante en técnicas *in vitro* (Coetzee *et al.*, 1998) y no en la concepción natural (Biljan *et al.*, 1994), resulta interesante explorar este parámetro cuando está afectado por la polución del aire para poder entender los mecanismos patológicos del mismo.

Biomarcadores de la polución del aire y parámetros seminales: cuando se analizan biomarcadores de polución del aire, tanto en orina, como en sangre e incluso en plasma seminal, los resultados son incluso menos consistentes que cuando se evalúa directamente la exposición ambiental a la polución del aire. Según la escala de Newcastle-Ottawa, estos estudios en general presentan sesgos, y existe controversia para usar biomarcadores ya que éstos no son del todo específicos (Zou *et al.*, 2009).

Mecanismos: De todos los parámetros, el recuento de espermatozoides parece ser el menos afectado. Zorn (2012) publicó que el recuento espermático se correlacionaba positivamente con los niveles de FSH, hormona que juega un papel importante en el desarrollo de las células germinales y regula la función testicular. La producción inicial de espermatozoides depende de la concentración de FSH, y no hay evidencias que la

concentración de FSH pueda estar afectada por la contaminación del aire (Calogero *et al.*, 2011), por lo que el efecto a la exposición de la contaminación del aire debe de afectar a la función del espermatozoide, pero en fases posteriores de la espermatogénesis.

Rubes (2005) describe un efecto de metabolitos derivados del PM₁₀ que pueden llegar al testículo e interactuar con el ADN. Este efecto tóxico ocurre en una fase avanzada de la espermatogénesis, cuando no hay mecanismos que puedan corregirlo y provocando un incremento de la fragmentación del ADN. Este proceso podría ocurrir sin alterar el recuento de espermatozoides, ya que no afecta a las fases iniciales de la espermatogénesis. Como se reporta en diferentes estudios, la fragmentación del ADN puede alterar tanto la morfología de la célula espermática como su movilidad (Zorn *et al.*, 2012 y Rubes *et al.*, 2005). Por tanto, estas evidencias apoyan los resultados de la revisión en la que la contaminación del aire afecta a fases finales de la espermatogénesis, y por eso se detecta una alteración en todos los parámetros excepto en el recuento espermático.

Hammound (2010) sugiere que PM_{2.5} podría actuar como un disruptor endocrino, lo cual podría explicar con un efecto tardío de la contaminación del aire sobre la movilidad espermática, afectando la síntesis de las proteínas necesarias para la movilidad espermática durante el paso de las células a través del tracto reproductivo masculino. Los resultados de la revisión apoyan esta teoría, y se observó que la exposición a PM_{2.5} no estaba asociada con la fragmentación del ADN, descenso del recuento espermático o con alteraciones de la morfología.

La combustión de diésel genera un conjunto de contaminantes incluyendo gas, partículas y metales pesados. En el modelo animal se ha comprobado que todas estas sustancias afectan a la producción espermática, a las espermátides y a las células de Sertoli (Watanabe *et al.*, 2005). Se observa edema intersticial, cambios degenerativos y necróticos y descamación del epitelio seminífero, que además es más evidente cuando se incrementa la dosis y exposición exhausta de diésel (Yoshida *et al.*, 1999). Estos efectos no se observan en humanos ya que no hay seguridad que se pueda extrapolar lo que ocurre en el modelo animal a dosis altas, pero hay sospechas de que efectivamente afecte al sistema reproductor masculino. De hecho, algunos de los trabajos revisados detectan una alteración de los parámetros seminales incluso con dosis de exposición relativamente bajas, y en niveles incluso por debajo de los que establece la legislación en EEUU (Boggia *et al.*, 2009).

Hay que considerar que estamos lejos de poder realizar estudios de exposición individuales, y esta es una de las principales limitaciones que tienen estos estudios. Se acaban usando modelos de aproximación, medias, o códigos postales que en definitiva, no son una medida real de cada uno de los individuos. Otros estudios no usan medidas repetidas de cada individuo y se sabe la alta variabilidad que hay en los parámetros seminales intraindividualmente.

Está claro que es necesario estandarizar tanto las determinaciones de los parámetros seminales como las medidas de exposición a la polución del aire, lo que ayudaría a facilitar comparaciones y conclusiones.

Hay muchos factores que se deben contemplar, y es que una exposición temprana con disruptores endocrinos durante el desarrollo fetal o neonatal, puede alterar la diferenciación sexual, la producción espermática y/o la función del epidídimo cuando sea adulto (Toppari *et al.*, 2010 y Kavlock *et al.*, 1996).

Como conclusión, tras la revisión se evidencia que existe un efecto de la polución del aire en la calidad seminal, particularmente en la fragmentación del ADN y en la morfología espermática, con un posible impacto negativo sobre la fertilidad masculina. Se necesitan nuevos estudios más estandarizados que permitan ser comparados y ayuden a entender el efecto de la contaminación del aire sobre la calidad seminal.

5.2. Implicaciones clínicas y de salud pública

Estamos expuestos de manera rutinaria a numerosos factores ambientales, que de un modo u otro varían de forma cualitativa y/o cuantitativamente. Y si resulta que tanto los factores ambientales como los genéticos pueden modificar los niveles de expresión de determinados genes, las implicaciones clínicas pueden ser enormes.

Se ha comprobado que simplemente por llevar estilos de vida diferentes como puede ser la rural o la urbana, donde la influencia de los factores ambientales es muy diferente, pueden existir diferentes respuestas del organismo. Lo que se trata es de identificar cuáles de esos factores pueden ser más perjudiciales.

La rutina diaria hace que no se les dé la importancia suficiente a algunos factores ambientales, muchas veces por falta de información o desconocimiento. Hay evidencias

robustas acerca de que muchos de estos factores ambientales contribuyen a una disminución del potencial de fertilidad en humanos. Los hábitos de vida, la contaminación atmosférica, la exposición ocupacional, factores clínicos y genéticos, todos tienen implicaciones clínicas y de salud pública muy importantes, y pueden tener connotaciones hasta ahora desconocidas que conviene conocer.

Desde un punto de vista puramente clínico, es importante tener presente cada uno de estos factores, realizar las preguntas necesarias a los pacientes, tanto al hombre como a la mujer, para poder detectar cuáles son esos hábitos de vida que quizás se pueden modificar, o cuál es su nivel de exposición a la contaminación atmosférica. En muchas ocasiones, se producen estados subfértiles que podrían ser la explicación a la infertilidad idiopática, y quizás no se debería descartar realizar determinaciones de contaminantes en sangre o en orina.

El estudio de estos factores en la pareja podría:

- ✓ Mejorar las expectativas de fertilidad de la pareja, procurando las condiciones óptimas para el embarazo.
- ✓ Aumentar el conocimiento por parte de los pacientes de los factores que pueden afectar a su propia fertilidad. La información a este nivel es primordial y la responsabilidad de abordarla recae sobre el clínico, y es evidente tal como ya se ha comentado, que el paciente tiene un conocimiento limitado en los diferentes factores ambientales que pueden afectar a su propia fertilidad (Daumler *et al.*, 2016).

A raíz de todas estas observaciones, hay recomendaciones que se podrían incorporar en la rutina diaria cuando se comienza el estudio de fertilidad de una pareja, en resumen:

- ✓ Considerar la edad en el varón como un factor que puede alterar la calidad seminal sobre todo a partir de los 40 años. Quizás se podría introducir el concepto de la preservación de la fertilidad masculina antes de los 40 años, congelando muestras de semen antes de esa edad.
- ✓ El tabaco se ha identificado como un factor claramente perjudicial, y el paciente fumador debe saber que los efectos parecen reversibles, por lo que se debería indicar dejar de fumar al hombre que acude a un centro de Reproducción Asistida

-
- ✓ Se recomienda un control en el consumo de alcohol
 - ✓ Es necesario explorar con más detalle el efecto de los filtros en el agua de red para corroborar los resultados de este estudio
 - ✓ Es importante identificar si existe alguna exposición ocupacional, parece que es más frecuente de lo que podemos pensar si tenemos en cuenta la exposición a cambios de temperatura, polvo, etc.
 - ✓ Incorporación de actividad física moderada en la rutina diaria de los pacientes, limitando la actividad vigorosa continuada. Eso ayudará también a reducir el estrés.
 - ✓ Aunque no hemos identificado una asociación significativa con la dieta, sí hay una mejoría de los parámetros cuando hay un consumo equilibrado de alimentos. Por tanto, se debe valorar controlar la dieta

Desde el laboratorio sabemos que es difícil introducir mejoras importantes que hagan aumentar las tasas de embarazo de forma significativa, la ciencia ya ha avanzado mucho en este sentido, y ahora toca apostar por pequeñas mejoras que poco a poco ayuden a mejorar los resultados, y no cabe duda que a nivel clínico los factores ambientales cada vez tienen más importancia.

5.3. Perspectivas de futuro

Hay diferentes cuestiones que deben considerarse:

- surge una necesidad de aclarar la importancia de los distintos hábitos de vida y de los contaminantes atmosféricos
- la legislación de la calidad del aire debería ajustarse a las consecuencias en salud de los niveles de contaminación y es necesario entender mejor los mecanismos fisiopatológicos que explican la actividad de los contaminantes sobre la salud
- hay que mejorar la capacidad de medición y seguimiento de la exposición a los contaminantes, e identificar las fuentes de emisión de manera más exacta
- a corto plazo proyecto tendrá continuidad en el tiempo, aumentando el número de pacientes y aportando nuevas variables para profundizar en el estudio, ya que se obtendrá

sangre y orina de cada uno de estos nuevos participantes para en una fase más avanzada poder detectar tóxicos a nivel de plasma sanguíneo y orina.

5.4. Conclusión

En esta tesis, hemos estudiado el impacto de exposiciones ambientales, en especial de la contaminación atmosférica y de hábitos de vida, en la calidad seminal de dos poblaciones de individuos. Una población normozoospermica en la que no hemos encontrado que los contaminantes atmosféricos ni los principales hábitos de vida ejerzan un efecto nocivo sobre los parámetros seminales. Sin embargo, hemos encontrado un claro efecto de la temperatura ambiental disminuyendo la concentración y la movilidad espermática. Para la población, hombres con problemas de fertilidad, se ha podido comprobar el efecto de la edad del hombre, sobre todo a partir de los 40 años, y de algunos otros factores ambientales como el tabaco que disminuye la movilidad espermática, o la exposición ocupacional que disminuye la concentración y la movilidad.

Los resultados que hemos encontrado de la temperatura son innovadores, ya que pocos estudios han valorado el efecto de la temperatura ambiental, a nivel individual y asignando diferentes ventanas de exposición. Además, estos resultados son independientes de la exposición a la contaminación atmosférica.

Esta tesis se basa en estimaciones de la exposición a diferentes contaminantes del aire, de forma individualizada y con diferentes ventanas de exposición. También se han tenido en cuenta diferentes tipos de población y con medidas repetidas en el tiempo. De esta manera, se trabaja con estimaciones más precisas, aunque todavía es necesario mejorar aspectos como el grado de exposición recibida en el lugar de trabajo o incorporar nuevos parámetros de calidad seminal que valoren la funcionalidad de la célula de forma más precisa.

Hemos visto que no es fácil asociar dichos factores con disfunciones a nivel reproductivo, pero, por otro lado, tampoco somos capaces de dar respuesta a esas parejas que tienen esterilidad de origen desconocido. La multitud de variables que interactúan entre sí, junto con los numerosos factores de confusión, hace que este tipo de estudios sea más complicado, pero intentan dar una explicación y dar sentido a numerosas evidencias que son detectadas de manera cotidiana.

En un futuro, será necesario continuar investigando, incorporando estimaciones más precisas y con estudios bien diseñados con muestras repetidas. Mientras, debemos tener en cuenta las evidencias que van apareciendo y tenerlas en cuenta en el manejo diario de nuestros pacientes.

Lista de referencias

- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S: What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 2006, 67:2–8.
- Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, *et al.* Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a non classical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans, *Environ. Health Perspect.* 2005;113:969–977.
- Alshahrani S, Ahmed AF, Gabr AH, Abalhassan M, Ahmad G. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia.* 2016 Dec;48(10):1125-1129
- American Lung Association: <http://www.lung.org/stop-smoking/aboutsmoking/facts-figures/whats-in-a-cigarette.html>.
- ASRM. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine: Smoking and infertility. *Fertil Steril* 2008, 90(5 Suppl):S254–S259
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;332:281–5.
- Augood C, Duckitt K, Templeton AA: Smoking and female infertility: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 1998, 13:1532–1539
- Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, *et al.* Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol Clin North Am.* 2014;41:55–66.
- Barbonetti A, Castellini C, Di Giammarco N, Santilli G, Francavilla S, Francavilla F. *In vitro* exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction. *Reprod Toxicol.* 2016;66:61-67.
- Battista N, Pasquariello N, Di Tommaso M, Maccarrone M: Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction. *J Neuroendocrinol* 2008, 20(Suppl 1):82–89.
- Beelen^a R, Hoek G, Vienneau D, *et al.* Development of NO₂ and NO_x land use regression models for estimating air pollution exposure in 36 study areas in Europe – the ESCAPE project. *Atmos Environ* 2013;72:10-23.
- Beelen^b R, Stafoggia M, Raaschou-Nielsen O, Andersen Z, Xun W, Katsouyanni K, *et al.* Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 2014;25:368–78.
- Beelen^c R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M, Andersen ZJ, Weinmayr G, Hoffmann B, *et al.* Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *Lancet.* 2014 Mar 1;383(9919):785-95.

-
- Beller EM, Glasziou PP, Altman DG, Hopewell S, Bastian H, Chalmers I, et al. PRISMA for Abstracts: reporting systematic reviews in journal and conference abstracts. *PLoS Med* 2013;10:e1001419.
- Biljan MM, Taylor CT, Manasse PR, Joughin EC, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. Evaluation of different sperm function tests as screening methods for male fertilization potential—the value of the sperm migration test. *Fertil Steril* 1994;62:591–8.
- Boggia B, Carbone U, Farinero E, Zarrilli S, Lombardi G, Colao A, et al. Effects of working posture and exposure to traffic pollutants on sperm quality. *J Endocrinol Invest* 2009;32:430–4.
- Bolumar F, Olsen J, Boldsen J. Smoking reduces fecundity: A European multicenter study on infertility and subfecundity. The European Study Group on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol*. 1996;143:578–587.
- Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. *Lancet* 2002;360:1233–42.
- Calogero A, Polosa R, Perdichizzi A, Guarino F, La Vignera S, Scarfia A, Fratantonio E, Condorelli R, Bonanno O, Barone N, et al: Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2009, 19:564–571.
- Calogero AE, La Vignera S, Condorelli RA, Perdichizzi A, Valenti D, Asero P, et al. Environmental car exhaust pollution damages human sperm chromatin and DNA. *J Endocrinol Invest* 2011;34:e139–43.
- Cantonwine DE, Hauserb R, Meekera JD. Bisphenol A and human reproductive health, *Expert Rev Obstet Gynecol*. 2013; 8(4):329-335
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;305:609–13.
- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2010 May 1;93(7):2222-31
- Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health*. 2008 23(4):243–297.
- Chen Q, Hong X, Song Y, Sun Q, Wang J. Effects of diesel exhaust particles on the quality of mouse sperm. *Chin J Androl* 2009;23:22–5.
- Chia VM, Li Y, Quraishi SM, Graubard BI, Figueroa JD, Weber JP, et al. Effect modification of endocrine disruptors and testicular germ cell tumour risk by hormonemetabolizing genes. *Int J Androl* 2010;33:588–96.
- Coetzee K, Kruge TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 1998;4:73–82.
-

- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16:231–45.
- Cyrus J, Eeftens M, Heinrich J, Ampe C, Armengaud A, Beelen R et al. Variation of NO₂ and NO_x concentrations between and within 36 European study areas: Results from the ESCAPE study. *Atmos Environ*. 2012;62:374-390
- Daumler D, Chan P, Lo KC, Takefman J, Zelkowitz P. Men's knowledge of their own fertility: a population-based survey examining the awareness of factors that are associated with male infertility. *Hum Reprod*. 2016 Dec;31(12):2781-2790.
- De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, et al. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 2003;18:1055–61.
- Deng Z, Chen F, Zhang M, Lan L, Qiao Z, Cui Y, et al. Association between air pollution and sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut* 2016;208(Pt B):663–9.
- Donnelly GP, McClure N, Kennedy MS, Lewis SE: Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. *Andrologia* 1999, 31:43–47.
- du Plessis SS, Agarwal A, Syriac A. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Nov;32(11):1575-88
- Dun MD, Aitken RJ, Nixon B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 2012 Jul;18(4):420-35.
- Eeftens M, Beelen R, de Hoogh K, et al. Development of land use regression models for PM_{2.5}, PM_{2.5}absorbance, PM₁₀ and PM_{coarse} in 20 European study areas; results of the ESCAPE project. *Environ Sci Technol*. 2012;46:11195-11205.
- Eibensteiner L, Del Carpio Sanz A, Frumkin H, Gonzales C, Gonzales GF. Lead exposure and semen quality among traffic police in Arequipa, Peru. *Int J Occup Environ Health* 2005;11:161–6.
- Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol* 2013;42:1–17.
- European Environment Agency (EEA). Europe's environment. The fourth assessment. Denmark. ISBN 978-92-9167-932-4. EEA, Copenhagen, 2007. P78
- Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016 Jun;169:56-75
- Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott Jr RT. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2008;90:97–103.

-
- Fronczak CM, Kim ED, Barqawi AB. The insults of illicit drug use on male fertility. *J Androl* 2012;33(4):515–28.
- 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.
- George VK, Li H, Teloken C, Grignon DJ, Lawrence WD, Dhabuwala CB: Effects of long-term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. *J Urol* 1996, 155:327–331
- Giwercman A, Giwercman YL. Environmental factors and testicular function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:391–402.
- Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pless-Mullooli T, Howel D. Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology.* 2004;15(1):36–45.
- Gold MS: Cocaine and crack: Clinical aspects. In *Substance Abuse: A Comprehensive Textbook: Third Edition.* Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; 1997:218–263.
- 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.
- Grant J, Hoorens S, Sivadasan S, Loo MV, Davanzo J, Hale L, Butz W. Trends in European fertility: should Europe try to increase its fertility rate...or just manage the consequences? *Int J Androl* 2006; 29:17–24.
- Güven A, Kayıkci A, Cam K, Arbak P, Balbay O, Cam M. Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? *Andrologia* 2008;40:346–51.
- Hammoud A, Carrell D, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Peterson C. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril* 2010;93:1875–9.
- Han X, Zhou N, Cui Z, Ma M, Li L, Cai M, et al. Association between urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and sperm DNA damage: a population study in Chongqing, China. *Environ Health Perspect* 2011; 119:652–7.
- Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, Perreault SD. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect.* 2010 Feb;118(2):203-9.
- Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, du Plessis SS. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health.* 2015 Dec;33(3):143-60. Review.
- Hassan MA, Killick SR. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl. 3):S1520–7.

- Hellstrom WJ, Overstreet JW, Sikka SC, Denne J, Ahuja S, Hoover AM, et al. Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older. *J Androl* 2006;27:421–8.
- Hembree WC, Nahas GG, Zeidenberg P, Huang HFS. (1980). Changes in human spermatozoa associated with high dose marijuana smoking. In: Nahas GG, Paton WDM, eds. *Marijuana: Biological Effects*. Oxford: Pergamon Press, 429.
- Hendrick V, Gitlin M, Altshuler L, Korenman S. Antidepressant medications, mood and male fertility. *Psychoneuroendocrinology* 2000;25(1):37–51.
- Hjollund NH, Storgaard L, Ernst E, Bonde JP and Olsen J. Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality. *Reprod.Toxicol.* 2002;16,215–221.
- Hormann AM, Vom Saal FS, Nagel SC, Stahlhut RW, Moyer CL, Ellersieck MR, et al., Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA), *PLoS One* 9 (2014) e110509.
- Hughes EG, Brennan BG. (1996). Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertil Steril* 66:679–89.
- Inoue K, Wada M, Higuchi T, Oshio S, Umeda T, Yoshimura Y, *et al.* Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen, *J. Chromatogr. B Analyt.Technol. Biomed. Life Sci.* 2002;773: 97–102.
- Jacquemin B and Sunyer J. Asthma and Air Pollution. Where are We? *BRN Rev.* 2015;1:78-91.
- Jenkins S, Wang J, Eltoum I, Desmond R, Lamartiniere CA. Chronic oral exposure to bisphenol A results in a non monotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice, *Environ.Health Perspect.* 2011;119:1604–1609.
- 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 Apr 15;171(8):883-91
- Jerrett M, Arain A, Kanaroglou P, et al. A review and evaluation of intraurban air pollution exposure models. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2005; 15(2):185-204.
- Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2015 Jan;19:22-33.
- Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2001;16:1012–1019.
- Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, Bonde JP. Environmental factors and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health.* 2009;22(4):305-29. Review.

-
- Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Brzezniński S, Ligocka D, Radwan P, et al. Association between a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health* 2013;26: 790–801.
- Jurewicz J (a), Radwan M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski L, Hawuła W, Ułańska A, Hanke W. Lifestyle factors and sperm aneuploidy. *Reprod Biol.* 2014 Sep;14(3):190-9
- Jurewicz J (b), 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 Feb;60(1):43-51.
- 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 Jan;32(1):215-222.
- Karmon AE, Toth TL, Chiu YH, Gaskins AJ, Tanrikut C, Wright DL, Hauser R, Chavarro JE; Earth Study Team. Male caffeine and alcohol intake in relation to semen parameters and in vitro fertilization outcomes among fertility patients. *Andrology.* 2017 Mar;5(2):354-361.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaatari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996;4(Suppl 4):715–40.
- Kortenkamp A, *et al.* State of the art assessment of endocrine disruptors. Final Report. Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3. Annex 1. Summary of the state of the science. Revised version. Brussels: European Commission, DG Environment, 29 January 2012.
- La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian J Androl* 2013;15(2):221–5.
- Lafuente R, García-Blázquez N, Jacquemin B, Checa MA. Outdoor air pollution and sperm quality. *Fertil Steril.* 2016 Sep 15;106(4):880-96.
- Lafuente R, Jacquemin B. Hábitos de vida: ejercicio físico, tabaco, alcohol, cafeína, y drogas en relación con la calidad seminal. En: Contaminación ambiental y manejo del estrés oxidativo en el factor masculino. Cuaderno de Andrología Clínica. ASEBIR-ASESA. 1ª Edición. Madrid 2017:42-46
- La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 2012;33:145–53.
- Lehtihet M, Hylander B. Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. *Andrologia* 2015;47:1103–8.

- 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 May;208(5):406.e1-6.
- Li Y, Lin H, Li Y, et al. Association between socio-psychobehavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril*. 2011;95:116–123.
- Li Y, Li Y, Zhou N, et al. Socio-psycho-behavioural factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in Chongqing. *J Fam Plan Reprod Health Care Fac Fam Plan Reprod Health Care*. 2013;39:102–110.
- Lin M, Kuo-Kuang Lee R, Li S, Lu C, Sun F, Hwu Y. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008;90: 352–9.
- Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol* 2013;14:1262–3.
- Lotti F, Corona G, Vitale P, Maseroli E, Rossi M, Fino MG, Maggi M. Current smoking is associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):590-602.
- Louis JF, Thoma ME, Sørensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, et al. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. *Andrology* 2013;1:741–8.
- MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010;16:293–311.
- Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr*. 2004 Nov;58(11):1550-2.
- Matorras R, Crisol L “Epidemiología de la infertilidad”. En Remohí J, Ballesteros A, Matorras R, Bellever J, Pellicer A. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos*. 4 ed. Editorial Panamericana, Madrid 2012
- Maya-Soriano MJ, Taberner E, Sabés-Alsina M, Ramon J, Rafel O, Tusell L, Piles M, López-Béjar M. Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. *Theriogenology*. 2015; 84(3):384-389.
- Mendiola J, Lázaro MJ. Disruptores endocrinos: fuentes y evidencias de sus efectos sobre la salud reproductiva masculina. En: *Contaminación ambiental y manejo del estrés oxidativo en el factor masculino*. Cuaderno de Andrología Clínica. ASEBIR-ASESA. 1ª Edición. Madrid 2017:10-19

- Mitra A, Chakraborty B, Mukhopadhyay D, Pal M, Mukherjee S, Banerjee S, Chaudhuri K: Effect of smoking on semen quality, FSH, testosterone level, and CAG repeat length in androgen receptor gene of infertile men in an indian city. *Syst Biol Reprod Med* 2012, 58:255–262.
- Mormandi EA, Otero P, Bertone AL, Calvo M, Astarita G, Kogovsek N, Levalle O. Body weight increase and quality of semen: a controversial association. *Endocrinol Nutr*. 2013 Jun-Jul;60(6):303-7
- Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* 2005;84:919–24.
- Nieschlag E, Lenzi A. The conventional management of male infertility. *Int J Gynaecol Obstet*. 2013 Dec;123 Suppl 2:S31-5. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.001.
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed. Heidelberg, Germany: Springer; 2010.
- Nieuwenhuijsen MJ, Basagaña X, Davvand P, Martinez D, Cirach M, Beelen R, Jacquemin B. Air pollution and human fertility rates. *Environ Int*. 2014 Sep;70:9-14
- Nolasco A, Moncho J, Quesada JA, Melchor I, Pereyra-Zamora P, Tamayo-Fonseca N, *et al*. Trends in socioeconomic inequalities in preventable mortality in urban areas of 33 Spanish cities, 1996-2007 (MEDEA project). *Int J Equity Health*. 2015 Apr 1;14:33.
- Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, *et al*. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;355:221–230.
- Oatley MJ, Racicot KE, Oatley JM. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol Reprod* 2011;84:639–45.
- Olsen J, Bolumar F, Boldsen J, Bisanti L: Does moderate alcohol intake reduce fecundability? A european multicenter study on infertility and subfecundity. european study group on infertility and subfecundity. *Alcohol Clin Exp Res* 1997, 21:206–212.
- 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 Apr;107(4):916-923.
- Organización Mundial de la Salud. Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. 2006.
- Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil Camb Engl*. 2010;13:189–193.
- Pajarinen J, Karhunen PJ, Savolainen V, Lalu K, Penttilä A, Laippala P. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20: 332-7.

- Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int* 2006; 97: 324-6.
- Pasqualotto FF, Umezu FM, Salvador M, Borges E Jr, Sobreiro BP, Pasqualotto EB. Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2008;90(2):278–83.
- Pedersen M, Giorgis-Allemand L, Bernard C, et al. Ambient air pollution and low birthweight: a European cohort study (ESCAPE). *Lancet Respir Med.* 2013;1(9):695-704.
- Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R, et al. Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007–2013, *Environ. Health Perspect.* 122 (2014) 775–786.
- Pfeifer S, Fritz M, Goldberg J, McClure RD, Thomas M, et al. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98(6):1400–6.
- Radwan M, Jurewicz J, Polanska K, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, et al. Exposure to ambient air pollution-does it affect semen quality and the level of reproductive hormones? *Ann Hum Biol* 2016;43:50–6.
- Ragni G, de Lauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Aro VGA: Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *Int J Androl* 1988, 11:93–100.
- Ramlau-Hansen CH (a), 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.
- Ramlau-Hansen CH (b), Thulstrup AM, Storgaard L, Toft G, Olsen J, Bonde JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1372-9
- Ramlau-Hansen CH, Toft G, Jensen MS, Strandberg-Larsen K, Hansen ML, Olsen J. Maternal alcohol consumption during pregnancy and semen quality in the male offspring: two decades of follow-up. *Hum Reprod* 2010;25(9):2340–5.
- Redman LM: Physical activity and its effects on reproduction. *Reprod Biomed Online* 2006, 12:579–586.
- Robbins WA, Elashoff DA, Xun L, et al. Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 371-7.
- Romano D. Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos. Fundación ISTAS. 2012
- Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2776–2783.

-
- Rubes J, 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(1-2):20-8.
- Rubes J, Rybar R, Prinosilova P, Veznik Z, Chvatalova I, Solansky I, et al. Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2010;683:9–15.
- Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol*. 2010 Aug;40(7):633-52.
- Said TM, Ranga G, Agarwal A. Relationship between semen quality and tobacco chewing in men undergoing infertility evaluation. *Fertil Steril* 2005; 84: 649-53.
- 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 Mar 10:1-19.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78: 491-9.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003, 79(Suppl 3):1597–1605.
- Santi D, Vezzani S, Granata AR, Roli L, De Santis MC, Ongaro C, et al. Sperm quality and environment: a retrospective, cohort study in a Northern province of Italy. *Environ Res* 2016;150:144–53.
- Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update* 2010;16:65–79.
- Sava F, Carlsten C. Respiratory health effects of ambient air pollution. *Clin Chest Med* 2012;33:759–69.
- Schlegel PN, Chang TS, Marshall FF. Antibiotics: potential hazards to male fertility. *Fertil Steril* 1991;55(2):235–42.
- Schweiger U, Deuschle M, Weber B, Körner A, Lammers C, Schmider J, Gotthardt U, Heuser I: Testosterone, gonadotropin, and cortisol secretion in male patients with major depression. *Psychosom Med* 1999, 61:292–296.
- Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudova Z, Rubes J, Evenson DP and Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect* . 2000;108,887–894.
- 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.
-

- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, et al., Obesity-Fertility Collaborative Group. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med.* 2012;172:440–442.
- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Jul 16;11:66.
- 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 Oct;70(4):635-645. Review.
- Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 417-21.
- Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson AM, Juul A, Carlsen E, Mortensen GK, Jensen TK, Toppari J. Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006; 29:2–11.
- Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol* 2005;161:816–23.
- Soares SR, Melo MA: Cigarette smoking and reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008, 20:281–291
- Sokol R, Kraft P, Fowler I, Mamet R, Kim E, Berhane K. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect* 2005;114:360–5.
- Song XF, Chen ZY, Zang ZJ, Zhang YN, Zeng F, Peng YP, et al. Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbon level in blood and semen quality for residents in Pearl River Delta Region in China. *Environ Int* 2013;60:97–105.
- Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2003;111:414–420.
- te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;8:141–54.
- Terzioglu F. Investigation into effectiveness of counseling on assisted reproductive techniques in turkey. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 2001, 22:133–141.
- Tielemans E, Burdorf A, te Velde E, Weber R, van Kooij R, Heederik D. Sources of bias in studies among infertility clients. *Am J Epidemiol.* 2002 Jul1;156(1):86-92.
- Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88:910–9.
- Tsujimura A, Matsumiya K, Takahashi T, at al. Effect of lifestyle factors on infertility in men. *Arch Androl* 2004;50: 15-7.
- Tvrda E, Agarwal A, Alkuhaimi N. Male reproductive cancers and infertility: a mutual relationship. *Int J Mol Sci* 2015;16:7230–60.

-
- Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, Garcia-Manso JM, Vaamonde-Lemos R, Swanson RJ, Oehninger SC: Response of semen parameters to three training modalities. *Fertil Steril* 2009, 92:1941–1946.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV, Human exposure to bisphenol A (BPA), *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 139–177.
- Viloria 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.
- Vogt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Fertil Steril* 1986; 45: 106-10.
- Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett* 2005;155:51–8.
- Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality if nonrandomized studies in meta-analyses. Available at: www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm. Accessed July 11, 2016.
- Wijesekara GU, Fernando DM, Wijerathna S, Bandara N. Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility. *Ceylon Med J* 2015;60:52–6.
- Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA: Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2011, 95:1025–1030.
- World Health Organization. Alcohol y atención primaria de la salud. Washington, 2008. In: www.who.int/substance_abuse/publications/alcohol_atencion_primaria.pdf
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth Edition. Geneva: WHO Press;2010
- Yang H, Chen Q, Zhou N, Sun L, Bao H, Tan L, Chen H, Zhang G, Ling X, Huang L, Li L, Ma M, Yang H, Wang X, Zou P, Peng K, Liu K, Liu T, Cui Z, Liu J, Ao L, Zhou Z, Cao J. Lifestyles Associated With Human Semen Quality: Results From MARHCS Cohort Study in Chongqing, China. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jul;94(28).
- Yang F, Li L, Chen JP, Liu XQ, Zhong CL, Yang Y, Ren YF, Yuan W, Liang H, Miao MH. Couple's infertility in relation to male smoking in a Chinese rural area. *Asian J Androl.* 2017 May-Jun;19(3):311-315.
- Yorifuji T, Kashima S, Higa Diez M, Kado Y, Sanada S, Doi H. Prenatal exposure to traffic-related air pollution and child behavioral development milestone delays in Japan. *Epidemiology* 2016;27:57–65.
- Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 1999;22:307–15.

- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S; International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology.; World Health Organization.. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1520-4.
- Zenzen MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000;6:122–31.
- Zhou N, Cui Z, Yang S, Han X, Chen G, Zhou Z, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ Pollut* 2014;187:145–52.
- Zhou N, Cui Z, Yang S, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2014;187C:145–152.
- Zorn B, Golob B, Ihan A, Kopitar A, Kolbezen M. Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:357–64.
- Zou B, Wilson JG, Zhan FB, Zeng Y. Air pollution exposure assessment methods utilized in epidemiological studies. *J Environ Monit* 2009;11: 475–90.

ANEXOS

Anexo 1. *Publicación Fertility and Sterility*

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION



Outdoor air pollution and sperm quality

Rafael Lafuente, B.Sc.,^{a,b} Núria García-Blázquez, M.D.,^{c,d} Bénédicte Jacquemin, M.D., Ph.D.,^{c,e,f,g,h,i,j} and Miguel Angel Checa, M.D., Ph.D.^{b,d,j,k}

^a Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Preventive Medicine, and Public Health, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ^b Centro de Infertilidad y Reproducción Humana, EUGIN, Barcelona, Spain; ^c Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ^d Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ^e VIMA: Aging and Chronic Diseases, Epidemiological and Public Health Approaches, U1168, Institut Médical de Santé et Recherche Médicale, Villejuif, France; ^f Unité mixte de recherche (UMR)-S1168, Université Versailles St-Quentin-en-Yvelines, Versailles, France; ^g ISGlobal (Barcelona Institute for Global Health)-Centre for Research in Environmental Epidemiology, Barcelona, Spain; ^h University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ⁱ Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Epidemiología y Salud Pública, Barcelona, Spain; ^j Barcelona Research Infertility Group, Barcelona, Spain; and ^k Department of Obstetrics and Gynecology, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

Exposure to air pollution has been clearly associated with a range of adverse health effects, including reproductive toxicity, but its effects on male semen quality are still unclear. We performed a systematic review (up to June 2016) to assess the impact of air pollutants on sperm quality. We included 17 semi-ecological, panel, and cohort studies, assessing outdoor air pollutants, such as PM_{2.5}, PM₁₀, NOx, SO₂, and O₃, and their effects on DNA fragmentation, sperm count, sperm motility, and sperm morphology. Thirteen studies assessed air pollution exposure measured environmentally, and six used biomarkers of air pollution exposure (two did both). We rated the studies using the Newcastle-Ottawa Scale and assessed with the exposure method. Taking into account these factors and the number of studies finding significant results (positive or negative), the evidence supporting an effect of air pollution on DNA fragmentation is weak but suggestive, on sperm motility is limited and probably inexistent, on lower sperm count is inconclusive, and on sperm morphology is very suggestive. Because of the diversity of air pollutants and sperm parameters, and the studies' designs, we were unable to perform a meta-analysis. In summary, most studies concluded that outdoor air pollution affects at least one of the four semen quality parameters included in the review. However, results lack consistency, and furthermore, studies were not comparable. Studies using standardized air pollution and semen measures are required to obtain more reliable conclusions.

PROSPERO Registration Number: CRD42015007175. (Fertil Steril® 2016;106:880–96. ©2016 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Air pollution, DNA fragmentation, male infertility, particulate matter, sperm quality

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <https://www.fertsterdialog.com/users/16110-fertility-and-sterility/posts/11209-outdoor-air-pollution-and-human-infertility-a-systematic-review>

The prevalence of infertility has increased notably in recent decades. Male factors contribute strongly to infertility, accounting for approximately 40% of all cases (1). A decline in semen quality has been observed generally over the past 70 years, including a decline in sperm count and ejaculate volume (2), as well

as alterations in sperm concentration and morphology, even in fertile men, and regardless of age (3). Over time the World Health Organization (WHO) (4) has lowered the accepted values for classic normal sperm parameters, including count, motility, and morphology, because in the last decades those parameters have consistently

decreased even in healthy men. Some authors have suggested that this decrease in sperm quality is associated with the observed decrease in fertility (5).

It is essential to understand the causes of this decrease in sperm quality (6). In addition to several specific chronic diseases (7–11), various lifestyle and environmental factors have been associated with decreased sperm quality (12, 13), such as smoking (14), drinking (15), obesity (16), social stress (17), exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or heavy metals, and air pollution (18), the latter of which is the focus of this review.

Air pollution is widely known to have adverse effects on human health (19), including cardiovascular (20) and respiratory diseases (21), adverse

Received April 29, 2016; revised and accepted August 9, 2016.

R.L. has nothing to disclose. N.G.-B. has nothing to disclose. B.J. has nothing to disclose. M.A.C. has nothing to disclose.

Supported by the P115/00636 and P113/00454 project, integrated in the Plan Estatal de I+D+i 2013–2016 and co-funded by the ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la investigación el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

This review was conducted within the framework of the Ph.D. in Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology from the Universitat Autònoma de Barcelona (R.L.).

B.J. and M.A.C. should be considered similar in author order.

Reprint requests: Miguel A. Checa, M.D., Ph.D., Parc de Salut Mar, Department of Obstetrics and Gynecology, Passeig Marítim 25-29, Barcelona E-08003, Spain (E-mail: macheca@parcdesalutmar.cat).

Fertility and Sterility® Vol. 106, No. 4, September 15, 2016 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2016 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.022>

perinatal outcomes, and even impaired neurodevelopment (22). It has also been classified as carcinogenic to humans (23) by the International Agency for Research on Cancer (the cancer investigation division of the WHO). Although many animal studies have shown a link between air pollution and fertility, particularly semen quality (24–27), the relationship in humans remains unclear. The aim of this review was to assess current evidence regarding the impact of air pollution on sperm quality in humans.

MATERIALS AND METHODS

This study did not require approval by the institutional review board because it is a systematic review. We adhered to the preferred reporting items recommended by the PRISMA statement (28) on reporting the results of systematic reviews. The details of our protocol for this systematic review have been registered on PROSPERO and can be accessed at CRD42015007175.

Search Strategy

We performed an exhaustive search of the three following electronic databases: PubMed, ISI Web of Knowledge, and Cochrane Library, updated to March 31, 2016, without restriction on the starting date. The search combined terms referring to outdoor air pollution and semen quality. We used the following key words, combining them with Boolean hints in the three databases queried: (air pollution OR particulate matter OR diesel OR soot OR carbon OR black smoke OR smog OR traffic OR motor vehicles OR carbon dioxide/monoxide OR nitrogen dioxide/oxide OR ozone OR CFCs OR VOCs OR industrial activity OR ammonia OR sulfur oxide/dioxide OR power plants OR landfills OR methane) AND (sperm function OR sperm count OR sperm motility OR sperm morphology OR semen volume OR liquefaction OR sperm DNA fragmentation). These terms were used as shown in the three databases queried and the search restricted to “males” using the database filter option.

After revision of the manuscript we updated the search on June 30, 2016 in PubMed, using the same terms and restricting the start date to March 1, 2016. We also hand-searched the reference list of all the included articles and reviews identified during the search to ensure we did not miss any further studies.

Eligibility Criteria

We included cohort and case-control studies that analyzed the impact of outdoor air pollutants on sperm quality in humans (Table 1). We excluded studies that analyzed the effects of air pollution on perinatal outcomes, as well as those assessing the effects of tobacco exposure or other nonenvironmental toxics (alcohols, drugs of abuse), in vitro studies, studies in animal models, and occupational exposure studies (except those in which the occupation implied exposure to the environmental toxins covered by our review). We also identified and included several studies that used measured biomarkers of air pollution exposure in blood and urine. We only included studies published in English.

TABLE 1

Study eligibility criteria.	
Target population	Males of fertile age
Intervention	Environmental air pollution PM _x Gases (NO _x , CO, SO ₂ , O ₃) General traffic air pollution Biological markers of air pollution (blood, urine and seminal plasma) PAH NO ₂ Pb, Cd
Outcome measures	Sperm quality parameters DNA fragmentation Sperm count Sperm motility Sperm morphology
Design	Cohort, cross-sectional, semi-individual studies, case-control studies

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

Outcomes

The outcomes of interest were DNA fragmentation and sperm count, motility, and morphology.

Exposure

We also obtained information about air pollution exposure, type of pollutant (e.g., PM₁₀, PM_{2.5}, NO₂), and the method used to measure exposure.

Data Extraction

The title and abstract of the articles identified by the search were reviewed by two independent authors, who determined their eligibility. Discrepancies were resolved by the intervention of a third independent author. In a following step, full text of the eligible articles was then reviewed by two independent authors to determine their inclusion. Data were extracted from the final selected articles. Data extracted were type of study, population characteristics, detailed outcomes and exposures, and main effects: β estimates or percent change from linear regression (from adjusted models when available). All this information was compiled in Excel tables (Microsoft, Redmond, WA) that included the following: authors, year of publication, type of study, characteristics of participants, number of cases, pollutants, outcomes included, and main effects, which we adapted for the present review (as merging author and year, or type study and characteristics of participants), and we also decided to add a comments column to state important information to better understand the study.

Assessment of Risk of Bias

We used the Newcastle-Ottawa Scale to assess the risk of biases of the studies included in the review (29). We only considered the scale applicable to cohort studies because no case-control studies met our inclusion criteria. This scale considers various items ranking the possibility of bias for three categories: Selection, Comparability, and Outcome. To

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

compare the studies among them we added the “stars” to make an overall score (scale 0–9).

Presentation of Results

For articles covering different time windows of exposure, we show results for the 90 days of exposure before semen sampling (30–36) because this period was covered by all studies, while also covering the entire process of spermatogenesis. The other articles considered the annual mean concentrations of air pollution in the study zone during the time of the study.

In the tables we show the β values (or the percent change) of the adjusted regression analysis assessing the association between the pollutant and the semen parameter. Where this value was not given in the article, we manually calculated the unadjusted percentage difference in each parameter between exposed and nonexposed participants.

RESULTS

In our initial search (up to March 31, 2016), a total of 866 studies were retrieved in the initial electronic search. Of these, 821 were excluded by title/abstract according to the exclusion criteria described above, leaving 43 articles for inclusion in our analysis.

Three of these studies were excluded because the full text was not available in English (Polish or French), and another article was excluded because it was a review. Of the remaining 39 articles we excluded 26 that did not assess outdoor air pollution exposure (mainly evaluated indoor pollutants or occupational exposure), bringing the total to 13 articles included. We also included three additional relevant articles (34, 37, 38) previously known to us that were not detected by our search strategy.

We updated the search to June 30, 2016, identifying one new study just published (36). The screening of the references of the included articles and reviews did not add any additional studies.

Finally, we included 17 articles, 13 that assessed environmentally measured exposure to air pollution and 6 articles that assessed air pollution exposure measured using biomarkers (Fig. 1) (2 articles used both measurement approaches).

The assessment of the biases is presented in Table 2. According to the four items of the Newcastle-Ottawa Scale, most of the articles presented few selection biases, scoring all but two above 3 out of 4; the ones that only scored 2 were because they included a small and selected population. Conversely, in the comparability biases, only seven studies controlled their analyses by a full set of confounders (e.g., age, smoking, body mass index, socioeconomic position, alcohol intake, caffeine intake), and six studies did not control their results for any confounder, scoring 0 out of 2; the others only controlled by basic variables (mainly age). Regarding the outcome, although all studies were based on a measured and therefore reliable outcome, only two were considered to have a real follow-up—that is those with repeated measurements. However, we gave two stars to the five studies with 90-day exposure windows (although they did not have

“follow up” per se, the biological plausibility of the outcome is strong given the timeline of spermatogenesis). Overall the studies rated from 4 to 8 (maximum 9).

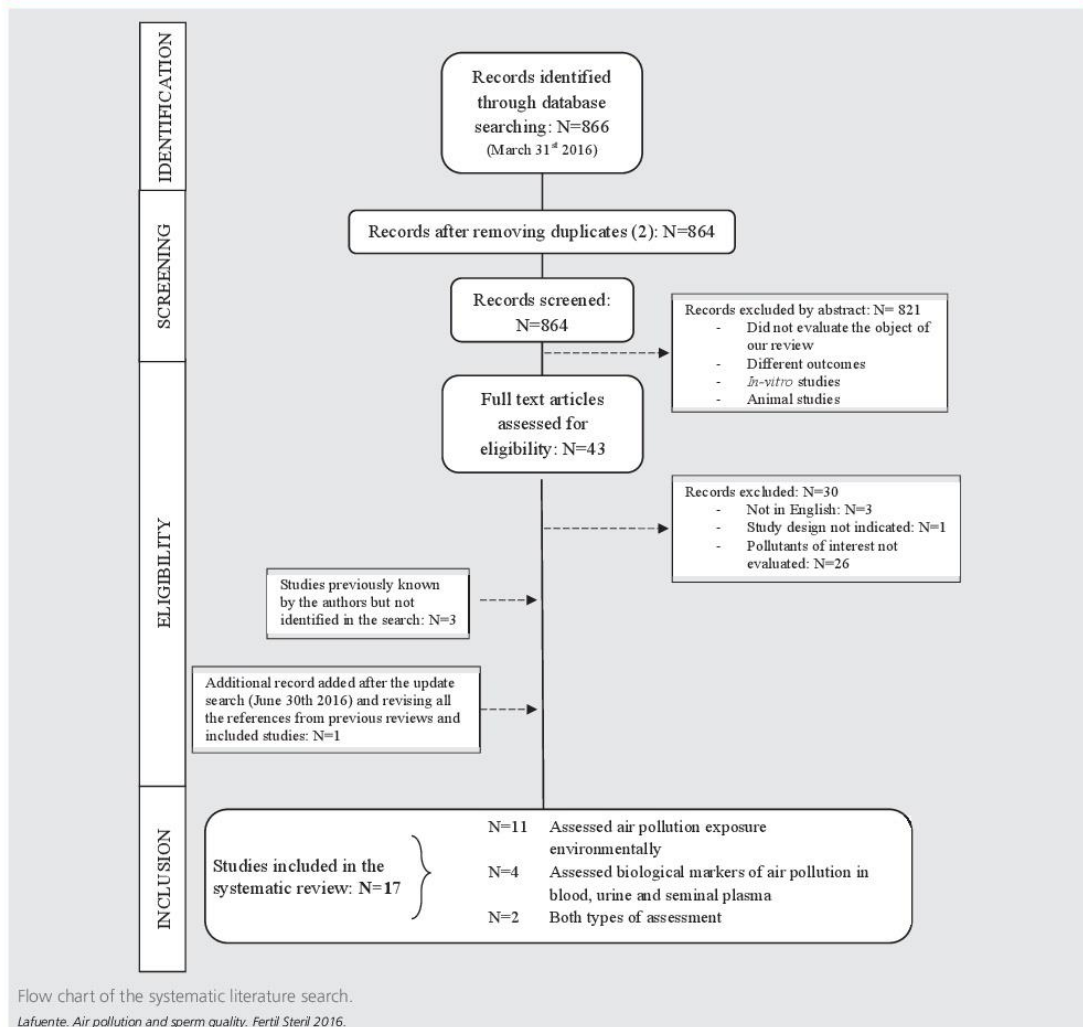
Next we summarize the findings by sperm parameter of the 13 articles that assessed the association between environmentally measured air pollution (Table 3); and then we present the results separately for the 6 articles that assessed biomarkers of air pollution exposure (Table 4).

Environmentally Measured Air Pollution and Sperm Quality Parameters

DNA fragmentation. Six articles evaluated the association between air pollution and DNA fragmentation, three of which found that air pollution exposure was significantly associated with increased DNA fragmentation. Rubes et al. (30), who conducted a cohort study that compared multiple samples from 36 healthy males in the Czech Republic, and Selevan et al. (31), who performed a semi-individual study i.e., a study using individual measures of the outcome (sperm parameters) but aggregated values of the exposure (air pollution) including 272 healthy men from the Czech Republic, found that participants with high exposure to air pollution had a significantly higher percentage of sperm with fragmented DNA than those with low exposure ($\beta = 0.19$, 95% confidence interval [CI] 0.02–0.36; and $\beta = 0.30$, 95% CI 0.08–0.52, respectively). Calogero et al. (39), who conducted a semi-individual study in Naples involving 36 healthy men working at toll gates and 32 nonexposed, age-matched participants, also observed an increase in DNA fragmentation (by 4.8%) in participants with higher exposure. De Rosa et al. (37), who conducted another semi-individual study in Naples involving 85 healthy men working at toll gates and 85 age-matched, nonexposed participants, did not find differences in DNA fragmentation between those with high and low exposure. Hansen et al. (32), who conducted a US cohort study that examined the effects of O_3 and $PM_{2.5}$ in 228 men who were the partners of pregnant women, and Radwan et al. (40), who performed a cohort study of 327 normozoospermic Polish men with individually assigned estimates of PM_{10} , $PM_{2.5}$, SO_2 , NO_x , and CO exposure, did not find any relation between air pollution exposure and DNA fragmentation.

Sperm motility. Twelve of the twelve studies included in our review assessed sperm motility, six of which found that higher levels of air pollution were associated with decreased sperm motility. De Rosa et al. (37), Calogero et al. (39), Guven et al. (41), who performed a semi-individual study comparing 38 toll gate workers in Duzce, Turkey with 35 office personnel from the same company, and Boggia et al. (42), who conducted a semi-individual study based in Naples with a similar design to that of Guven et al. (41) but with a larger sample ($N = 307$), found marked decreases in sperm motility associated with greater exposure to environmental exposure to air pollution. Hammoud et al. (33) performed a cohort study including 1,699 semen samples from 1,465 healthy men in Salt Lake City and also found a statistically significant decrease of 3.4% in sperm motility, associated with a $10 \mu g/m^3$ increase in $PM_{2.5}$. Wijesekara et al. (38), who performed a cross-sectional cohort of 300 males with occupational or

FIGURE 1



environmental exposure to air pollution, found a 4% decrease in sperm motility when compared with the nonexposed group, but only in normozoospermic participants.

Studies by Selevan et al. (31), Rubes et al. (30), Radwan et al. (40), Zhou et al. (34) (a cross-sectional cohort of 1,346 subjects living in rural or urban areas of China), Sokol et al. (35) (a cohort study of 48 sperm donors from Los Angeles contributing with at least 10 samples during 2 years with individual estimates of air pollution exposure), and Santi et al. (36) (a retrospective cohort of 406 patients from the reference laboratory from a general hospital in Modena Italy) did not finding any association between air pollution exposure and sperm motility.

Sperm count. All of the articles included in this review studied sperm count, but only seven found a significant

relationship between air pollution and decreased sperm count. Calogero et al. (39) reported a significant decrease (−73.02%) in sperm count among toll gate workers compared with nonexposed workers. Guven et al. (41) and de Rosa et al. (37) also observed a significant decrease in sperm count among toll gate workers compared with office personnel (−37.0%) and men living in the same area, respectively. Sokol et al. (35) reported a significant decrease in sperm count associated with O₃ (−3.9%) but not with other pollutants studied, whereas Santi et al. (36) found a decrease in sperm count associated with PM_{2.5} but not with PM₁₀. Zhou et al. (34) only found a significant decrease associated with PM₁₀ ($\beta = 0.07$, 95% CI 0.02–0.11) but not with other pollutants. Wijesekara et al. (38) found a significant decrease of sperm

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

TABLE 2

Newcastle-Ottawa Scale for assessing the quality of nonrandomized studies.

First author, year (reference)	Selection	Comparability	Outcome
Selevan, 2000 (31)	***	**	**
De Rosa, 2003 (37)	****	—	*
Rubes, 2005 (30)	***	**	***
Sokol, 2006 (35)	****	*	***
Guyen, 2008 (41)	****	—	*
Boggia, 2009 (42)	****	—	*
Hammoud, 2010 (33)	***	—	**
Hansen, 2010 (32)	****	**	**
Calogero, 2011 (39)	****	—	*
Zhou, 2013 (34)	***	**	**
Wijesekara, 2005 (38)	***	*	*
Radwan, 2016 (40)	****	**	*
Santi, 2016 (36)	****	—	**
Eibensteiner, 2005 (43)	**	*	*
Han, 2011 (44)	***	**	*
Jurewicz, 2013 (45)	****	**	*
Song, 2013 (46)	**	*	*

Note: Because of their design, we considered all the studies as cohorts to apply the scale. For the "Outcome," only studies with repeated measurements were considered as having a follow-up (Rubes and Sokol); therefore, for the others only one of the three items of the scale could be taken into account. Nevertheless, we consider studies with 90-day exposure windows as intermediate "follow-up," scoring them with two stars because the biological plausibility of the outcome is strong given the timeline of spermatogenesis. Maximum values: Selection: ****; Comparability: **; Outcome: ***.

Lafuente. Air pollution and sperm quality. *Fertil Steril* 2016.

concentration (−47.28%) in pathozoospermic participants environmentally or occupationally exposed to air pollution but not in normozoospermic participants.

Rubes et al. (30), Boggia et al. (42), Hammoud et al. (33), Hansen et al. (32), Selevan et al. (31), and Radwan et al. (40) did not find any significant association between air pollution and sperm count.

Sperm morphology. Ten articles studied the association between air pollution and sperm morphology, seven of which found a significant association. Guven et al. (41) and Calogero et al. (39), who compared toll gate workers with nonexposed workers, reported a significant decrease in normal sperm morphology associated with air pollutants. Selevan et al. (31) and Wijesekara et al. (38) also found a decrease in normal sperm morphology in more-exposed individuals. Zhou et al. (34) and Radwan et al. (40) studied the effects of PM_x, SO₂, NO_x, and CO separately and reported morphologic alterations associated with all air pollutants. Santi et al. (36) found a decrease in normal sperm morphology only with PM₁₀ but not with PM_{2.5}. Rubes et al. (30), Hansen et al. (32), and Hammoud et al. (33) did not find any statistically significant relationship.

Biomarkers of Air Pollution and Sperm Quality Parameters

In our bibliographic search the effects of biomarkers of air pollution exposure on semen characteristics were assessed by two of the previously included articles (37, 38) and four new articles. Two (37, 43) measured lead in the blood, two (44, 45) PAH in the urine, one PAH in the blood (46), and

one lead and cadmium in seminal plasma (38). Furthermore, De Rosa et al. (37) measured methemoglobin (Mhb) as a marker of NO₂, sulphhemoglobin for SO₂, carboxyhemoglobin, and zinc propophyrin.

In toll gate workers, De Rosa (37) et al. found a significant decrease in sperm nuclear DNA integrity (determined by acridine orange) and sperm motility associated with Mhb and a decrease in sperm count associated with lead. In non-toll gate workers but who had sperm values below the WHO limit, they found decrease in sperm motility associated with Mhb and a decrease in sperm count associated with lead. Surprisingly, they also found a decrease in DNA fragmentation associated with Mhb in this latter group.

Eibensteiner et al. (43), who performed a cross-sectional study of 18 police officers in Peru, found a decrease in sperm motility associated with high levels of lead in the blood, but not with sperm count or morphology. Han et al. (44) conducted a prospective cohort study of 232 healthy volunteers from China and found an increase in sperm DNA fragmentation associated with PAH measured in urine. Jurewicz et al. (45), who performed a prospective cohort study of 277 patients from fertility clinics but with normal sperm concentration or slight oligozoospermia, found a decrease in sperm motility and normal sperm morphology associated with urine PAH, but not with DNA fragmentation or sperm count. Song et al. (46) conducted a prospective cohort study of 232 healthy volunteers in China and found a decrease in sperm concentration associated with blood PAH, but not with motility. Wijesekara et al. (38) did not find any association between sperm motility or count and lead or cadmium measured in the seminal plasma.

DISCUSSION

This systematic review shows that air pollution may affect sperm quality. All but 1 of the 17 articles reviewed reported significant alterations in at least one of the outcomes studied in association with at least one of the pollutants studied. The individual semen parameters are summarized below.

DNA Fragmentation

Three of the six articles that studied DNA fragmentation found that it was significantly positively associated with air pollution exposure (30, 31, 39). These three studies rated from 5 to 8 on the Newcastle-Ottawa Scale, none of the studies had individual measures of air pollution exposure, and the number of participants was relatively low even if one had repeated measures of semen samples for the same participant. The other three studies that assessed air pollution effect on DNA fragmentation but did not find any significant association (32, 37, 40) had similar rates on the Newcastle-Ottawa Scale (from 5 to 8) but included more participants, and one of them assessed individual exposure to air pollution. Overall, taking into account these factors, the evidence supporting an effect of air pollution on DNA fragmentation is weak but suggests a possible effect.

Another issue to take into account is that in the six articles included in this review, different techniques were used to evaluate DNA fragmentation. Most of the studies used SCSA

TABLE 3

Characteristics and main results of the studies included in this systematic review (ordered by year) that assessed the association between environmentally measured air pollution and various parameters of sperm quality.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Pollutants (unit)	Range (minimum–maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^b	Normal sperm morphology	Comment
Selevan et al., 2000 (31)	Semi-individual (urban vs. rural district, and with samples collected in winter vs. summer); healthy young men	272	PM ₁₀ (µg/m ³) SO ₂ (µg/m ³) CO (mg/m ³) NOx (µg/m ³)	8.0–832.0 10.6–697.9 0.0–5.5 0.0–140.0	0.30 (0.08, 0.52) ^{c,*}	-3.02 (-8.99, 2.95)	0.04 (-0.08, 0.16)	-0.35 (-0.59, -0.11) [*]	The β correspond to the differences between samples obtained during winter in the urban district and those during summer in the urban district, or in any season in the rural district. To classify a sample as a "winter" or "summer" sample, the authors considered the 90 d before sampling. They compared pollutant concentrations at district level and between seasons to assign low, medium or high exposure. No individual estimates of exposure were assigned.
De Rosa et al., 2003 (37)	Semi-individual (healthy tollgate workers vs. healthy men from the general population living in the same area)	170	CO (mg/m ³) NO (mg/m ³) SO (µg/m ³) Atmospheric Pb (µg/m ³)	9.0–27.0 115.0–398.0 45.0–343.0 1.2–4.2	No association ^d	Decreased [*]	Decreased [*]	Not studied	The authors compared the sperm characteristics of toll gate workers to those of men of the general population living in the same area. They measured and compared air pollution at 8 toll gates and 8 general locations, but did not assign individual estimates of exposure.

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

TABLE 3

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Pollutants (unit)	Range (minimum-maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^b	Normal sperm morphology	Comment
Continued.									
Rubies et al., 2005 (30)	Prospective cohort of healthy young men from a highly polluted urban area	36 contributing up to seven semen samples	SO ₂ (µg/m ³) NOx (µg/m ³) PM ₁₀ (µg/m ³)	18.0-92.0 ^a 39.0-108.0 ^a 24.0-66.0 ^a	0.19 (0.02, 0.36)*	-0.04 (-0.11, 0.02)	-0.69 (-2.41, 1.19)	-0.01 (-0.03/0.01)	The β correspond to the differences between samples obtained during winter and summer in the urban district (greater pollution in winter). To classify a sample as a "winter" or "summer" sample, the authors considered the 90 d before sampling. They compared pollutant concentrations between seasons to assign low or high exposure, but did not assign individual estimates of exposure. Repeated measures were taken into account.
Sokol et al., 2006 (35)	Retrospective cohort of sperm donors	48 contributing at least 10 samples	NO ₂ (ppb) CO (ppm) PM ₁₀ (µg/m ³) O ₃ (ppb)	9.04-79.8 0.37-3.86 6.84-101.9 1.7-47.5	Not studied Not studied Not studied Not studied	No association No association No association No association	No association No association No association -3.9%*	Not studied Not studied Not studied Not studied	Air pollution data were available for grids (10 x 10 km) for each pollutant. Each donor was assigned the average value of the grid from his postcode. In this table we show the effects of the average value for the 90 d before semen sampling. Other air pollutants were also included (NO ₂ , CO and PM ₁₀), but none were significantly associated with sperm quality outcomes.

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

TABLE 3

Continued.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Pollutants (unit)	Range (minimum–maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^b	Normal sperm morphology	Comment
Gruen et al., 2008 (41)	Semi-individual (tollgate workers vs. office personnel)	73	Traffic air pollution (diesel)	Not available in the study	Not studied	–22.1%*	–37.0%*	–56.9%*	The authors compared the sperm characteristics of toll gate workers to those of members of the general population living in the same area. They measured and compared the air pollution at 8 toll gates, 8 motorways, and all other workplaces, but no individual estimates of exposure were assigned.
Boggia et al., 2009 (42)	Semi-individual (tollgate workers vs. office personnel)	307	Traffic air pollution, NO ₂ (µg/m ³)	58.0–347.0	Not studied	–38.6%*	–7.9%	Not studied	The authors compared the sperm characteristics of toll gate workers to those of office workers. No individual estimations of exposure were assigned.
Hammoud et al., 2010 (33)	Retrospective cohort, samples from patients from an andrology laboratory	1,465 contributing 1,699 semen samples	Daily levels of PM _{2.5} (µg/m ³)	6.0–24.0 ^g	Not studied	–3.4%*	No association	No association	The authors suggested an interaction between air pollution and sitting position. The authors did not use individual air pollution exposure, but rather the mean concentration of PM _{2.5} during the 90 d before sampling to assess the effect of PM _{2.5} on sperm characteristics. Percent change per 10 µg/m ³ of PM _{2.5} increase.

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

TABLE 3

Continued.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Pollutants (unit)	Range (minimum–maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^a	Normal sperm morphology	Comment
Hansen et al., 2010 (32)	Prospective cohort; healthy men (partners of pregnant women)	228	O ₃ (ppb) PM _{2.5} (µg/m ³)	2.0–83.2 2.1–62.7	–0.13 (–0.43, 0.17) ^c –0.77 (–1.55, 0.00) ^c	Not studied Not studied	–0.18 (–0.43, 0.07) 0.07 (–0.50, 0.64)	–0.15 (–0.98/0.68) 1.09 (–0.552, 7.73)	The authors did not use individual air pollution exposure; rather, participants were assigned the mean concentration of PM _{2.5} and O ₃ during the 90 d before sampling, of one of the three counties where they lived. Outcome biases are given per 15 ppb of O ₃ increase and 10 µg/m ³ of PM _{2.5} increase. The authors compared the sperm characteristics of toll gate workers to those of non-exposed workers. No individual estimations of exposure were assigned.
Calogero et al., 2011 (39)	Semi-individual (motorway tollgate workers vs. non-occupationally exposed)	68	Traffic air pollution (gas exhaust)	Not available in the study	4.8% ^{**}	–42.86%*	–73.02%*	–14.43%*	The authors did not use individual estimates of air pollution exposure estimates, but rather the mean concentration of each pollutant during the 90 d before sampling. The authors also compared sperm characteristics according to whether participants lived in urban or rural areas, and observed better sperm quality in participants living in the rural area. Outcome biases are given per 1 µg/m ³ of each pollutant increase.
Zhou et al., 2014 (34)	Cross-sectional cohort of healthy men	1,346	PM ₁₀ (µg/m ³) SO ₂ (µg/m ³) NO ₂ (µg/m ³)	66.0–160.5 31.0–101.0 19.5–53.5	Not studied Not studied Not studied	0.07 (0.01, 0.17) –0.03 (–0.06, 0.03) 0.04 (0.00, 0.11)	0.07 (0.02, 0.11) ^b * 0.032 (0.00, 0.06) ^b 0.072 (0.00, 0.22) ^b	–0.21 (–0.80/–0.00)* –0.38 (–0.91/–0.01)* –0.38 (–0.92/–0.01)*	The authors did not use individual estimates of air pollution exposure estimates, but rather the mean concentration of each pollutant during the 90 d before sampling. The authors also compared sperm characteristics according to whether participants lived in urban or rural areas, and observed better sperm quality in participants living in the rural area. Outcome biases are given per 1 µg/m ³ of each pollutant increase.

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

TABLE 3

Continued.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Pollutants (unit)	Range (minimum–maximum) in the study	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^b	Normal sperm morphology	Comment
Wijesekara et al., 2015 (38)	Cross-sectional cohort of male partners of individuals investigated in infertility clinics	99 pathozoosperms 201 normozoosperms	Traffic proximity and occupational exposure	Not available	Not studied	–0.54% –4.06%*	–47.28% ^b * –0.20% ^b	–6.54%* –4.86%*	The authors compared men who were occupationally or environmentally exposed to those who were not. Men living within 50 m of a main road were considered to be environmentally exposed, although the analysis did not separate occupationally from environmentally exposed men.
Radwan et al., 2016 (40)	Prospective cohort of patients from a fertility clinic who had normal sperm concentration	327	PM ₁₀ (µg/m ³) PM _{2.5} (µg/m ³) SO ₂ (µg/m ³) NOx (1 h, µg/m ³) CO (8 h, µg/m ³)	11.8–120.5 8.0–93.9 9.1–167.9 2.2–215.1 0.2–1.9	0.07 (–0.13, 0.27) ^c 0.05 (–0.26, 0.17) ^c –0.05 (–0.13, 0.04) ^c –0.03 (–0.15, 0.08) ^f 0.05 (–0.26, 0.16) ^f	–2.64 (–5.85, 0.57) –4.49 (–8.03, 1.96) –1.06 (–2.30, 0.18) –0.51 (–2.32, 1.29) –2.54 (–5.81, 0.72)	0.28 (–0.07, 0.63) ^b –0.06 (–0.45, 0.34) ^b –0.01 (–0.15, 0.12) ^b –0.05 (–0.14, 0.25) ^b –0.12 (–0.23, 0.48) ^b	32.60 (25.38/39.83) ^a 40.53 (32.72/48.33) ^a 6.60 (3.62/9.57) ^a 6.19 (1.88/10.50) ^a 24.86 (17.24/32.49) ^a	Each participant was assigned the average value of each pollutant for the 90 d before semen sampling from the closest monitoring station according to the residential postcode. Results for sperm morphology are for abnormal sperm morphology and not for normal as for the other studies. It was not specified in the manuscript, but we assume that outcome betas are given per 1 µg/m ³ of each pollutant increase.

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

TABLE 3

Continued.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Pollutants (unit)	Range (minimum–maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/ ^b concentration ^b	Normal sperm morphology	Comment
Santit et al., 2016 (36)	Retrospective cohort, samples from a patients from a reference laboratory in a general hospital	406	PM ₁₀ (µg/m ³) PM _{2.5} (µg/m ³)	4.0–155.0 1.0–101.0	Not studied Not studied	–0.086 –0.046	–1.386 –3.271*	–0.022* –0.018	It is not completely clear, but it seems that each participant was assigned the average value of each pollutant for the 2 or 3 mo before semen sampling from the closest monitoring station according to the residential address. Authors also find an association with temperature. It was not specified in the manuscript, but we assume that outcome bias are given per 1 µg/m ³ of each pollutant increase.

*P < .05.
^a The values are β values obtained from the articles, except for Sokol et al. (35), Guven et al. (41), Boggia et al. (42), Hammoud et al. (33), Calogero et al. (39), and Wijesekara et al. (38), where we calculated the percent change for each parameter between the exposed and the nonexposed, and for Santit et al. (36), where we calculated β from the coefficient correlation and the standard error of the outcome and the exposure.
^b DNA fragmentation determined by TUNEL assay.
^c DNA fragmentation determined by TUNEL assay.
^d Sperm nuclear DNA integrity determined by acridine orange.
^e Radwan et al. (40) showed the association between air pollution and abnormal sperm morphology in opposition of the other studies where the estimates are computed for normal sperm morphology.
^f Approximate values taken from figures of the study.
 Lafuente. Air pollution and sperm quality. *Fertil Steril* 2016.

TABLE 4

Detailed characteristics and main results of the studies included in the systematic review (ordered by year) assessing the association between biomarkers of air pollution measured in blood, urine, seminal plasma, and sperm parameters.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Biomarker of air pollution exposure	Range (minimum–maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^b	Normal sperm morphology	Comments
De Rosa et al., 2003 (37)	Cross-sectional, including healthy tollgate workers vs healthy men from the general population living in the same area	170	Methemoglobin (%) as a biological marker of NO ₂ in toll gate workers (85) Pb (mg/dL) in toll gate workers (85) Methemoglobin (%) in the general population with sperm values below WHO values (52)	0.6–1.2 10.0–32.0 0.5–0.9	9.04 (–31.25, 49.33) ^c Not studied –50.41 (–90.06, –20.88) ^{c*}	–66.92 (–106.91, –26.93) ^{c*} Not studied –74.00 (–105.42, –42.58) ^{c*}	Not studied (–1.65, –0.07) ^{c*} Not studied	Not studied Not studied Not studied	It is not clear whether the associations between sperm characteristics and Methemoglobin and Pb that are marked as not reported have truly not been studied or are simply not reported. The authors do not mention the other markers of exposure. The % values correspond to the differences between participants with blood lead concentrations ≤40 (μg/dL) and those with concentrations >40 (μg/dL). Assessing the four metabolites individually, all except 9-OHP were associated with at least one of the three parameters assessing DNA fragmentation; the highest effect found was that for 2-OHNa. Only samples from winter (when air pollution is higher) were considered. The authors also observed an effect on sperm apoptosis.
Ebensteiner et al., 2005 (43)	Cross-sectional, including traffic police officers	18	Pb (mg/dL) in the general population with sperm values below WHO values (52) Pb (μg/dL) in blood	1.3–16.5 20.0–65.0	Not studied Not studied	Not studied –37.70% ^{c*}	–1.33 (–1.65, –0.07) ^{c*} –35.80% (–1.65, –0.07) ^{c*}	Not studied 5.50%	
Han et al., 2011 (44)	Prospective cohort including healthy volunteers. Combination of four PAHs in urine	232	2-OHNa (μg/L) 9-OHPh (μg/L) 2-OHFlu (μg/L) 1-OHP (μg/L)	7.72 ^d 1.92 ^d 2.95 ^d 0.66 ^d	13.26 (7.97, 18.55) ^{e*} 3.32 (–1.97, 8.62) ^{e*} 5.04 (–0.99, 11.07) ^{e**} 5.32 (0.47, 10.17) ^{e*}	Not studied Not studied Not studied Not studied	Not studied Not studied Not studied Not studied	Not studied Not studied Not studied Not studied	

Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

TABLE 4

Continued.

Authors, year of publication (reference)	Type of study and participants' characteristics	N	Biomarker of air pollution exposure	Range (minimum-maximum)	DNA fragmentation	Sperm motility	Sperm count/concentration ^a	Normal sperm morphology	Comments
Jurewicz et al., 2013 (45)	Prospective cohort including patients from fertility clinics but with normal sperm concentration or slight oligozoospermia	277	PAHs in urine: 1-OHP (µg/L)	0.04-1.95	-0.04 (-0.16, 0.08) ^f	-8.33 (-5.07, -11.60)*	0.09 (-0.11, 0.28) ^g	2.12 (0.84, 3.40)*	Only significant for sperm neck abnormalities, but not for head and tail abnormalities.
Song et al., 2013 (46)	Prospective cohort including infertile patients	53	16 PAHs in blood (ng/g)	11.279 ^d	Not studied	-0.03	0.10 ^{b*}	Not studied	
Wijesekara et al., 2015 (38)	Cross-sectional cohort of the male partner of couples who attended an infertility clinic	300	Pb (µg/dL) in seminal plasma Cd (µg/dL) in seminal plasma	9.8-24.5 0.5-2.9	Not studied Not studied	No association No association	No association ^b No association ^b	No association No association	Lead was detected in only 38.3% of the population, and Cd in 23%.

*P < .05
**P < .01
***P < .001
^a The values are β values obtained from the articles, except for Ebenstener et al. (43) and Jurewicz et al. (45), where we calculated the percent change for each parameter between the exposed and the nonexposed, and for Song et al., where only the correlation coefficients are shown.
^b Sperm concentration (when both sperm count and concentration available we show the sperm count).
^c Sperm nuclear DNA integrity determined by acridine orange.
^d Geometric means of PAH metabolites.
^e DNA fragmentation determined by COMET (single cell gel electrophoresis assay).
^f DNA fragmentation determined by SCSA.
Lafuente. Air pollution and sperm quality. Fertil Steril 2016.

(sperm chromatin structure assay) (30–32, 37, 40), which measures the relative susceptibility of sperm nuclear DNA to denaturation, expressed as the COMP- α 1 variable (cellules outside the mean population), which values have been associated with spermatogenic disorders and infertility (47). Calogero et al. (39) used the TUNEL assay to measure sperm chromatin fragmentation. The TUNEL assay and SCSA have been found to be well correlated (48, 49), so we believe that results obtained with both methods would be comparable.

However, there are plausible mechanisms that could support air pollution effect on DNA fragmentation. Air pollution is associated with increased oxidative stress, which produces reactive oxygen species that cause DNA fragmentation, one of the most important markers of apoptosis. Deoxyribonucleic acid fragmentation is an important characteristic because poor sperm chromatin integrity is known to be a good predictor of male sterility (47), long time to conception, and failure to conceive; although it is not a predictor of failure in artificial methods such as IVF or intracytoplasmic sperm injection, the potential adverse effects of sperm DNA damage on clinical infertility and risk of spontaneous abortion should be a concern for everyone (50). Establishing the causes of DNA fragmentation may be key to understanding fertility problems, and from our review of current evidence, we conclude that air pollution could be a damaging factor for sperm DNA.

Sperm Motility

Sperm motility was studied in all but one of the articles we reviewed, with inconclusive results. Six (33, 37–39, 41, 42) of the 12 articles that studied sperm motility found that it was significantly positively associated with air pollution exposure; however, all those articles rated quite low on the Newcastle–Ottawa Scale (29), and the air pollution exposure presented notable limitation in most of them. The studies that did not find any association (30, 31, 34–36, 40) rated much better on the Newcastle Ottawa Scale (from 6 to 8), and three of them assessed exposure at a semi-individual level (35, 36, 40). Overall, the weight of the studies that did not show an association of air pollution exposure with sperm motility seems to be more important, suggesting that the effect of air pollution on this parameter is probably limited if it really exists at all. Sperm motility has a high clinical impact, with low sperm motility associated with infertility (51).

Sperm Count

Sperm count (or concentration) was studied in all of the articles we reviewed. Six (35–39, 41) of the 13 articles that studied sperm count found that it was significantly negatively associated with air pollution exposure; those articles rated from 5 to 8 (average 5.7) on the Newcastle–Ottawa scale, and the air pollution exposure was quite gross in most of them, except in one where it was a semi-individual exposure assessment. The studies (30–33, 40, 42) that did not find any association rated on average a little better on the Newcastle Ottawa Scale (6.7 going from 5 to 8), and one of them

assessed exposure at the individual level. Furthermore, one study (34) found that PM₁₀ exposure was significantly associated with an increase in sperm concentration. Overall, the weight of the studies that did show an association of air pollution exposure with lower sperm count is approximately the same as for those that did not, making it hard to draw a real conclusion. Sperm count provides a measure of the testes' capability of producing spermatozoa and the potency of the male tract, although its direct association with fertility is not clear.

Sperm Morphology

Seven of 10 of the articles that studied sperm morphology found that air pollution was significantly associated with abnormal sperm morphology. These seven studies (31, 34, 36, 38–41) rated from 5 to 7 on the Newcastle–Ottawa Scale; only two of the studies had semi-individual measures of air pollution exposure. The other three studies (30, 32, 33) that assessed air pollution effect on sperm morphology but did not find any significant association had similar rates on the Newcastle–Ottawa Scale (from 5 to 8), and one of them assessed exposure to air pollution at ZIP code level. Therefore, the evidence supporting an effect of air pollution on sperm morphology is quite suggestive. Although the clinical relevance of this is debatable, because the effect of sperm morphology on fertility only seems relevant for in vitro techniques (52) but not for natural conception (53), it is interesting to explore how this parameter is affected by air pollution exposure, to understand the pathologic mechanisms.

Biomarkers of Air Pollution and Sperm Quality Parameters

The results of these studies on the association between air pollution biomarkers and sperm quality parameters are even less consistent than those assessing air pollution exposures environmentally. In general all these studies are prone to biases, as shown by the Newcastle Ottawa scale. Furthermore, the use of biomarkers to assess air pollution exposure is controversial because it is not very specific (54).

Possible Mechanisms

Our review reveals effects across all parameters included, except for sperm count. We have found various hypotheses proposed by different authors to explain why air pollution could affect sperm count less than the other parameters. Zorn et al. (55) found that sperm count was positively correlated with FSH levels, which plays an important role in germ cell survival and is a key regulator of testicular function, necessary for maintaining spermatogenesis. Initial production of sperm is determined by FSH concentration, and there is no evidence that FSH concentration is affected by air pollution (39), therefore air pollution could affect the sperm functionality in posterior phases of spermatogenesis. Additionally, Rubes et al. (30) refer to the effect of reactive metabolites of PM₁₀ that can reach the testes and react with sperm DNA to form adducts; this toxic effect occurs in late spermatogenesis, when there are no repair mechanisms to correct

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

it, resulting in increased DNA fragmentation. This may occur without altering sperm count because it does not affect the first stages of spermatogenesis. Furthermore, as reported in various studies, DNA fragmentation may alter sperm morphology and motility. Both Zorn et al. (55) and Rubes et al. (30) hypotheses support our observation that air pollutants affect late phases of spermatogenesis and thus alter all parameters except sperm count.

There is also evidence that other air pollutants affect sperm parameters. Lead concentration is associated with sperm alterations (37), such as low sperm volume and count, low percentage of motile sperm, and increased abnormal sperm morphology. However, the concentration of lead in cities is currently much lower than previously (recent reports from the US Environmental Protection Agency report a 56% decrease in lead pollution between 2001 and 2007, with most values lower than 1.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and so may be less concern.

Hammound et al. (33) suggest that $\text{PM}_{2.5}$ could act as an endocrine disruptor, which is consistent with the reported delayed effect of air pollution on sperm motility, affecting the late synthesis of proteins necessary for sperm motility during passage through the male reproductive tract. This results in altered sperm motility but not of other parameters. Our results are consistent with this hypothesis, in that we observed that $\text{PM}_{2.5}$ exposure was not associated with DNA fragmentation, decreased sperm count, or alterations in sperm morphology.

Sokol et al. (35) suggested a relationship between O_3 and DNA damage in sperm, on the basis of the oxidative power of this gas. Ozone may affect DNA integrity through oxidative stress, which had been related to disrupt testicular and sperm function (56). Some studies have shown that reactive oxygen species damage the integrity of DNA in the sperm nucleus (56, 57), which affects sperm count and motility. However, Hansen et al. (32) were not able to obtain significant results for O_3 and DNA fragmentation.

Guven et al.'s (41) approach considered "diesel pollution" as an ensemble of multiple pollutants including gas, particles, and heavy metals; they did not measure specific effects. Experimental models in mice show that sperm production, spermatids, and Sertoli cells are affected in groups of mice exposed to diesel exhaust (58). Interstitial edema, degenerative and necrotic changes, and desquamation of the seminiferous epithelium, leading to loss of spermatozoa, are observed in the exposed mice and become progressively more severe with increasing doses of diesel exhaust (59). These studies conclude that doses used in these experiments are high, and it was not clear whether they could be extrapolated to the human male reproductive system, but they suggest that diesel exhaust may have the potential to influence spermatogenesis in men. Guven et al. (41) obtained concordant results, observing altered sperm count, motility, and morphology.

It is notable that only three of the manuscripts registered pollution levels above the legal limits (30, 34, 37), which implies that even relatively low levels of exposure could affect sperm quality. Altered sperm quality is reported even when environmental concentrations of gas are considerably lower than the limits established by US legislation (42),

which supports a recent hypothesis that, in cases of environmental exposure, qualitative sperm parameters could be early markers of toxic effects (60). In fact, 10 of the articles included reported a significant association between air pollutants and sperm alterations, even though only 3 of them (30, 34, 37) reported pollution levels higher than the legal limit.

It is also noteworthy that two studies found an increase in DNA fragmentation associated with various polymorphisms in metabolic genes. Rubes et al. (61) hypothesized that men who are homozygous null for glutathione-S transferase M1 (*GSTM1*) have lower capacity to detoxify reactive metabolites of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (c-PAHs) present in air pollution and are consequently more susceptible to the effects of air pollution on sperm chromatin. The same authors then studied other polymorphisms in repair genes (*XRCC1*, *XPD6*, and *XPD23*) and observed an association with high or medium DNA sperm damage (62). These studies could help to understand the mechanisms by which air pollution could affect sperm quality.

Air Pollution Exposure Assessment and Temporal Approach

Five of the studies included in our review were semi-individual (63), thus they assigned the average air pollution concentrations of the central monitoring station for a specific period of time (generally 90 days) before semen sampling. Only two studies estimated air pollution exposure individually at the participant's address (postcode), one using 10 \times 10-km modeled grids (35), and the other using data from the closest monitoring station (40). Thus, all studies used exposure assessment approaches that have strong limitations and that are incapable of providing truly individual estimates of exposure.

All of the articles reviewed considered the effects of high air pollution periods on spermatogenesis, a 70–75-day process; pollution levels were measured or estimated in the months before collecting the semen sample, such that permanent changes induced by pollutants were not considered. Furthermore, only two studies collected multiple samples from the same men (35), which is relevant considering the known high intraindividual variability in semen quality. Current evidence suggests that exposure to endocrine-disrupting chemicals during fetal or neonatal development alters sexual differentiation, sperm production, and epididymis function during adulthood (64, 65). These hypotheses are not incompatible and could be complementary.

Limitations

Because of the diversity of air pollution measures and sperm quality outcomes, and the techniques used to quantify them, we were unable to perform a meta-analysis. Further work is required in this area to standardize the measures and parameters used, to facilitate detailed comparisons and conclusions. Publication bias is a potential limitation, as in any systematic review, whereby studies with inconclusive or negative results are less likely to be published. However, this possibility was

not fully supported by a search we conducted in the Web of Knowledge and Google databases to identify conference abstracts relevant to assessing air pollution effects on sperm quality in humans. Indeed, we only identified three abstracts that did not correspond to any of the articles included in this manuscript. One described a significant association between semen parameters and air pollution in Czech Republic. However, even if the title and the authors' order did not match any of the articles included in this review, the main authors are the same in a couple of studies included in this review, and on the basis of the abstract we cannot rule out that it presented preliminary results of one of the included articles. Another abstract did not find significant associations between sperm parameters and air pollution in sperm donors, but it was quite recent. The third abstract was a literature review.

In addition, the effects of chronic exposure to reproductive toxins are not well documented, and the mechanisms of toxicity are either poorly understood or unknown. Thus, it is a research priority to conduct longitudinal studies with exposure assessment and a greater focus on explaining the biological mechanisms.

In conclusion, we found some evidence of an effect of outdoor air pollution on semen quality parameters, particularly DNA fragmentation and sperm morphology, with a possible impact on male fertility. The diversity of parameters and approaches of these studies preclude meta-analysis. Further researches with standardized techniques that facilitate comparisons are required to determine the impact of air pollution on the increasing problem of male sterility.

Acknowledgments: The authors thank Ivan Solà and Agustín García-Peiró for their help and input on the manuscript.

REFERENCES

- Legare C, Droit A, Fournier F, Bourassa S, Force A, Cloutier F, et al. Investigation of male infertility using quantitative comparative proteomics. *J Proteome Res* 2014;13:5403–14.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;305:609–13.
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;332:281–5.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16:231–45.
- Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson AM, et al. Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006;29:2–11.
- Louis JF, Thoma ME, Sorensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, et al. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. *Andrology* 2013;1:741–8.
- Lehtihet M, Hylander B. Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. *Andrologia* 2015;47:1103–8.
- La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 2012;33:145–53.
- Tvrda E, Agarwal A, Alkuhaimi N. Male reproductive cancers and infertility: a mutual relationship. *Int J Mol Sci* 2015;16:7230–60.
- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Sperm DNA damage in patients with chronic viral C hepatitis. *Eur J Intern Med* 2012;23:e19–24.
- Bachir BG, Jarvi K. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. *Urol Clin North Am* 2014;41:67–81.
- Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, Bonde JP. Environmental factors and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health* 2009;22:305–29.
- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:66.
- Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, du Plessis SS. Smoking and male infertility: an evidence-based review. *World J Mens Health* 2015;33:143–60.
- Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* 2005;84:919–24.
- MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010;16:293–311.
- 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.
- Deng Z, Chen F, Zhang M, Lan L, Qiao Z, Cui Y, et al. Association between air pollution and sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut* 2016;208(Pt B):663–9.
- Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. *Lancet* 2002;360:1233–42.
- Beelen R, Stafoggia M, Raaschou-Nielsen O, Andersen Z, Xun W, Katsouyanni K, et al. Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 2014;25:368–78.
- Sava F, Carlsten C. Respiratory health effects of ambient air pollution. *Clin Chest Med* 2012;33:759–69.
- Yorifuji T, Kashima S, Higa Diez M, Kado Y, Sanada S, Doi H. Prenatal exposure to traffic-related air pollution and child behavioral development milestone delays in Japan. *Epidemiology* 2016;27:57–65.
- Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol* 2013;14:1262–3.
- Chen Q, Hong X, Song Y, Sun Q, Wang J. Effects of diesel exhaust particles on the quality of mouse sperm. *Chin J Androl* 2009;23:22–5.
- el Feki A, Ghorbel F, Smaoui M, Makni-Ayadi F, Kammoun A. Effects of automobile lead on the general growth and sexual activity of the rat. *Gynecol Obstet Fertil* 2000;28:51–9.
- Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol* 2013;42:1–17.
- Jedlińska-Krakowska M, Gizejewski Z, Dietrich GJ, Jakubowski K, Glogowski J, Penkowski A. The effect of increased ozone concentrations in the air on selected aspects of rat reproduction. *Pol J Vet Sci* 2006;9:11–6.
- Beller EM, Glasziou PP, Altman DG, Hopewell S, Bastian H, Chalmers I, et al. PRISMA for Abstracts: reporting systematic reviews in journal and conference abstracts. *PLoS Med* 2013;10:e1001419.
- Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. Available at: www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm. Accessed July 11, 2016.
- Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005;20:2776–83.
- Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect* 2000;108:887–94.
- Hansen C, Luben T, Sacks J, Olshan A, Jeffay S, Strader L, et al. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect* 2009;118:203–9.
- Hammoud A, Carrell D, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Peterson C. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril* 2010;93:1875–9.

OUTDOOR AIR POLLUTION AND REPRODUCTION

34. Zhou N, Cui Z, Yang S, Han X, Chen G, Zhou Z, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ Pollut* 2014;187:145–52.
35. Sokol R, Kraft P, Fowler I, Mamet R, Kim E, Berhane K. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect* 2005;114:360–5.
36. Santi D, Vezzani S, Granata AR, Roli L, De Santis MC, Ongaro C, et al. Sperm quality and environment: a retrospective, cohort study in a Northern province of Italy. *Environ Res* 2016;150:144–53.
37. De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, et al. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 2003;18:1055–61.
38. Wijesekara GU, Fernando DM, Wijerathna S, Bandara N. Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility. *Ceylon Med J* 2015;60:52–6.
39. Calogero AE, La Vignera S, Condorelli RA, Perdichizzi A, Valenti D, Asero P, et al. Environmental car exhaust pollution damages human sperm chromatin and DNA. *J Endocrinol Invest* 2011;34:e139–43.
40. Radwan M, Jurewicz J, Polańska K, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, et al. Exposure to ambient air pollution—does it affect semen quality and the level of reproductive hormones? *Ann Hum Biol* 2016;43:50–6.
41. Guven A, Kayikci A, Cam K, Arbak P, Balbay O, Cam M. Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? *Andrologia* 2008;40:346–51.
42. Boggia B, Carbone U, Farinara E, Zarrilli S, Lombardi G, Colao A, et al. Effects of working posture and exposure to traffic pollutants on sperm quality. *J Endocrinol Invest* 2009;32:430–4.
43. Eibensteiner L, Del Carpio Sanz A, Frumkin H, Gonzales C, Gonzales GF. Lead exposure and semen quality among traffic police in Arequipa, Peru. *Int J Occup Environ Health* 2005;11:161–6.
44. Han X, Zhou N, Cui Z, Ma M, Li L, Cai M, et al. Association between urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and sperm DNA damage: a population study in Chongqing, China. *Environ Health Perspect* 2011;119:652–7.
45. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Brzeźnicki S, Ligocka D, Radwan P, et al. Association between a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health* 2013;26:790–801.
46. Song XF, Chen ZY, Zang ZJ, Zhang YN, Zeng F, Peng YP, et al. Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbon level in blood and semen quality for residents in Pearl River Delta Region in China. *Environ Int* 2013;60:97–105.
47. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039–49.
48. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual M, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;1:715–22.
49. Chohan K, Griffin JT, Lafromboide M, De Jonge CJ, Carrel DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27:53–9.
50. Lin M, Kuo-Kuang Lee R, Li S, Lu C, Sun F, Hwu Y. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008;90:352–9.
51. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* 2000;21:145–53.
52. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 1998;4:73–82.
53. Biljan MM, Taylor CT, Manasse PR, Joughin EC, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. Evaluation of different sperm function tests as screening methods for male fertilization potential—the value of the sperm migration test. *Fertil Steril* 1994;62:591–8.
54. Zou B, Wilson JG, Zhan FB, Zeng Y. Air pollution exposure assessment methods utilized in epidemiological studies. *J Environ Monit* 2009;11:475–90.
55. Zorn B, Golob B, Ihan A, Kopitar A, Kolbezen M. Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:357–64.
56. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43.
57. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 2004;16:259–67.
58. Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett* 2005;155:51–8.
59. Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 1999;22:307–15.
60. Phillips KP, Tanphaichitr N. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11:188–220.
61. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007;625:20–8.
62. Rubes J, Rybar R, Prinosilova P, Veznik Z, Chvatalova I, Solansky I, et al. Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2010;683:9–15.
63. Künzli N, Tager IB. The semi-individual study in air pollution epidemiology: a valid design as compared to ecologic studies. *Environ Health Perspect* 1997;105:1078–83.
64. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 4):741–76.
65. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaatari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996;4(Suppl 4):715–40.

Anexo 2. Historia Clínica para los individuos jóvenes y sanos

Fecha entrevista:

nº:

Datos personales:

Nombre: DNI:

Dirección: Ciudad:

Tel: / Caract. Sociodemográficas*:

Ocupación laboral*: Lugar de nacimiento:

Nacionalidad: E-mail:

Fecha de nacimiento:¿Cómo nos has conocido?

*Ver listado al final del documento

Datos físicos:**Talla:** **Peso:** **Raza:****Color Piel:** Pálido Moreno Normal Otros:**Color Ojos:** Marrón Azul Verde Ámbar Negro Otros:**Color Pelo:** Rubio Castaño claro C. oscuro Negro Pelirrojo **Textura Pelo:** Liso Ondulado Rizado Otros:**Grupo sanguíneo:** A B AB O **Factor Rh:** Positivo (+) Negativo (-)**Otras observaciones:**

Antecedentes familiares:

¿Eres adoptado?: NO SI ¿Alguno de tus padres?: NO SI

Edad materna al nacer: Embarazo normal: NO SI ¿Parto normal? NO SI

Padre vivo: NO SI Sano: SI NO

Madre viva: NO SI Sana: SI NO

Nº hermanos: Sanos: NO SI Parto gemelar en la familia: NO SI

Familia con alguna enfermedad hereditaria: NO SI

¿Antecedentes familiares de muerte prematura (antes de los 55 años)?: NO SI

Antecedentes personales:

Enfermedades: Actuales:Alergias:.....

 Infancia:

 Otras:

Alguna medicación:

Alguna intervención quirúrgica: NO SI ¿Cuál?

Historia psiquiátrica:

Historia reproductiv..... Nº hijos vivos:

Abortos espontáneos de repetición: Hijos malformados: Nacidos muertos:

Donaciones anteriores (nº, fecha y lugar de la última donación):

Problemas de visión: Miopía Hipermetropía Astigmatismo

 Dioptrías: Ojo derecho: : Ojo izquierdo:

Edad en las primeras eyaculaciones:

Exposición a sustancias químicas, mutágenos o teratogénicas: NO SI

Exposición a radiaciones: NO SI **Alguna enfermedad venérea:** NO SI

Hemospermia (sangre en semen): NO SI **Orina bien:** NO SI

Erección y eyaculación normal: NO SI **Relaciones homosexuales:** NO SI

Golpe testicular importante: NO SI **Hinchazón testicular:** NO SI

Pareja estable: NO SI **Convivencia en pareja:** NO SI

Relaciones sexuales de riesgo: NO SI **Algún tipo de drogas:** NO SI

¿Fumas?: Nada Poco Moderado Mucho

¿Bebes?: Nada Poco Moderado Mucho

Cuestionario:

¿Has recibido alguna transfusión de sangre (últimos 6 meses)?: NO SI

¿Te has vacunado (últimos 12 meses)?: NO SI

¿Tatuajes, piercings o tratamientos de acupuntura (últimos 12 meses)?: NO SI

¿Has viajado a algún país subdesarrollado (últimos 12 meses)?: NO SI

¿Te han diagnosticado alguna vez a ti o a tu pareja sexual alguna de las siguientes ETS?:

Clamidias No Sí

Herpes No Sí **Citomegalovirus** No Sí

Hepatitis No Sí

Sífilis No Sí **Tricomonas** No Sí

Gonorrea No Sí

Sida No Sí

¿En tu familia alguien presenta?:
--

<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Síndrome de Down. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Hemofilia. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Osteogénesis imperfecta y otras osteocondrodisplasias. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Labio leporino. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Enfermedad cardíaca congénita. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Desórdenes convulsivos. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Alteraciones de glándulas suprarrenales. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Otras cromosomopatías. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Hemoglobinopatías (Drepanocitosis, Talasemias...) <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Neurofibromatosis. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Focomielias. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Depresión maníaca, esquizofrenia, enfermedad mental familiar. Suicidios. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Diabetes. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Infertilidad.	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Espina bífida, anencefalia, hidrocefalia. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Metabolopatías congénitas (metabolismo lipídico, metabolismo de hidratos de carbono, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de las purinas, anomalías de ácidos grasos, otras). <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Riñón poliquístico. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Distrofia muscular. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Retraso mental o incapacidad severa de aprendizaje. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Neoplasias. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Déficit inmunitario. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Fibrosis quística. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Mucopolisacaridosis. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Ceguera congénita, progresiva desde el nacimiento. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Estenosis pilórica congénita, atresia esofágica, atresia anal. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Desórdenes neurológicos. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Senilidad precoz. <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí - Otras:
--	--

Exploración genital:

Testículos: **Pene:**

Epidídimos: **Deferentes:**

Varicocele: NO SI **Grado:**

(Nombre, firma y fecha)

Características demográficas:

Analfabeto

Sin estudios

Primer grado (primaria)

Segundo grado, primer ciclo (secundaria)

Segundo grado, segundo ciclo (bachillerato, FP...)

Tercer grado (escuela universitaria)

Tercer grado (facultad)

Ocupación laboral:

Empresario o profesional
independiente

Asalariado

En paro

Estudiante

Ama de casa

Otros

Anexo 3. Documento informativo para pacientes sobre el proyecto

IMPACTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE VARONES DEL ÁREA METROPOLITANA DE BARCELONA (SEMAP)

Investigadores responsables: Dra. Bénédicte Jacquemin, Dr. M. A. Checa y Dr. M. Brassesco
HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Ene 14 Rev.

Ante todo queremos agradecerle su participación en el proyecto **SEMAP** (Air Pollution and SEMen quality).

Se sabe que la **calidad del semen** tiene un impacto directo sobre la **tasa de embarazo**. A peor calidad seminal, menos probabilidad de conseguir un embarazo. Varias exposiciones ambientales se han asociado a una disminución de la calidad seminal como son: el tabaquismo, la dieta, el uso de telefonía móvil, la temperatura, etc. Una de estas **exposiciones ambientales** que podría influir es la **contaminación atmosférica**, y principalmente la proveniente del tráfico.

El presente estudio pretende analizar el efecto de la **exposición aguda** a estos contaminantes atmosféricos sobre la calidad del semen, y para ello necesitamos de su ayuda. Este estudio incluye a **varones del área metropolitana de Barcelona**, que acuden a este centro de infertilidad y que quieran participar independientemente de la causa de infertilidad. Intentamos así tener una amplia variedad de calidad de sémenes y poder medir mejor el **impacto de la contaminación**.

Este proyecto es un estudio que se coordina desde el **CREAL** (Centre de Recerca en Epidemiologia ambiental) que es un centre de investigación de renombre internacional, y donde participan pacientes del **Hospital del Mar** y del centro **CIRH** (Centro de Infertilidad y Reproducción Humana) en Barcelona. Todos los análisis de semen se realizarán en el centro CIRH.

PROTOCOLO DEL ESTUDIO

La participación a este estudio es totalmente **voluntaria y anónima**.

Si usted acepta la participación a este estudio se le pedirá:

- que cumplimente un **cuestionario detallado** sobre estilos de vida, hábitos dietéticos y de consumo, y actividad física,
- que nos facilite la **dirección de su domicilio** así como la de su **centro de trabajo** para cuantificar su exposición personal a determinados contaminantes atmosféricos,
- que nos autorice a recopilar los datos de los **parámetros seminales y % de fragmentación del ADN** de **dos muestras de semen** recogidas en un intervalo de tiempo como mínimo de 30 días. Se pueden aprovechar las muestras necesarias para el diagnóstico clínico que pueda necesitar o la muestra que entregue para el tratamiento que necesite. El coste de los análisis adicionales que sean necesarios correrán a cargo de CIRH.

Todos los datos derivados del cuestionario así como del análisis de las muestras semen serán tratados de forma totalmente **confidencial y anónima**. Todos los datos serán tratados **de forma encriptada**, donde nunca aparecerá el nombre del paciente.

El semen se analizará en el momento en que entregue la muestra en el centro CIRH, pudiendo disponer del resultado de las pruebas que se realicen.

PASOS A SEGUIR

Una vez acepte participar en el estudio:

- se le citará en el CIRH a un horario que le convenga con un investigador del centro CIRH para que **entregue la primera muestra (si ya disponemos de esa información no será necesario repetir el análisis)**
- se le pedirá **firmar el consentimiento** informado
- se le **entregará un cuestionario de exposición ambiental** que podrá rellenar y entregar en la siguiente visita

PREGUNTAS HABITUALES

¿CUÁNTO TIEMPO DURA LA CITA?

El cuestionario se cumplimenta en aproximadamente **20 minutos**, pero podrá hacerlo en casa y traerlo en la siguiente visita, o cuando entregue la segunda muestra de semen.

¿RECIBIRÉ ALGÚN BENEFICIO POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Es poco probable que a corto plazo obtenga otros beneficios médicos directos que los derivados de los resultados del seminograma. Sin embargo, esperamos que la información que se obtenga como resultado de este estudio beneficie en el futuro la comprensión de las causas de infertilidad.

¿HAY ALGUN RIESGO POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

No hay **ningún riesgo asociado**, ya que se podrán aprovechar las muestras de semen necesarias para los estudios diagnósticos previos, o para el tratamiento que su médico le indique.

¿SE MANTENDRÁ LA CONFIDENCIALIDAD?

Los datos estarán protegidos de acuerdo a la Ley 15/1999 de Protección de datos*. El uso que se haga de la información obtenida será confidencial. Por lo tanto, **la identidad del participante será siempre preservada**. Igualmente los datos obtenidos sólo podrán ser publicados de forma anónima, de forma agregada y no individual.

¿CUÁLES SON LOS COSTES?

Su participación en este estudio no representará **ningún coste para usted**. Usted no recibirá ninguna remuneración por participar en el estudio.

¿CUÁLES SON LOS DERECHOS COMO PARTICIPANTE?

La participación en el estudio es **voluntaria**. Usted puede escoger no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento. El no participar o retirarse del estudio no representará ninguna penalidad o pérdida de beneficios a los que tiene derecho.

¿A QUIÉN DEBO LLAMAR SI TENGO UNA PREGUNTA O UN PROBLEMA?

Para preguntar acerca del estudio o por aspectos relacionados con la investigación comuníquese con **Rafael Lafuente o Gemma López** en el centro CIRH, teléfono: 93 206 36 96 ó al email: rlafuente@cirh.es

* INFORMACIÓN ESPECÍFICA SOBRE PROTECCIÓN DE DATOS:

En virtud de los artículos 4, 5 y 6 de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, la *Fundació CREAL* pone en su conocimiento que dispone de un fichero con datos de carácter personal denominado *Investigación*. La finalidad del fichero es desarrollar la investigación epidemiológica avanzada sobre factores ambientales que afectan a la salud humana, para facilitar la prevención y el control de sus efectos perjudiciales. Los destinatarios de la información son el Grupo de Investigación encargado del estudio, y también los estamentos oficiales públicos o privados que, por obligación legal o necesidad material, deban acceder a los datos a efectos del correcto desarrollo del proyecto investigación, de acuerdo con las buenas prácticas científicas.

En cualquier caso, usted tiene derecho a ejercer los derechos de oposición, acceso, rectificación y cancelación en el ámbito reconocido por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre.

El responsable del fichero es la *Fundació CREAL*. Para ejercitar los derechos mencionados, y para cualquier aclaración, puede dirigirse por escrito mediante instancia dirigida a la Dirección de la Fundación en su domicilio sito en la calle Doctor Aiguader, 88, 08003 Barcelona.

Anexo 4. Consentimiento para participar en el estudio

ID participante:

Hoja de consentimiento para participantes mayores de edad en un proyecto de investigación biomédica

Contaminación atmosférica y calidad seminal (SEMAP)

Yo, _____, plena y libremente, acepto participar en el estudio SEMAP.

Entiendo y comprendo que los objetivos de este estudio son para incrementar el conocimiento médico. Advierto que puedo renunciar a mi consentimiento en cualquier momento durante la realización de las pruebas, sin verme obligado a justificar las razones al CREAL. Sé que no padeceré ningún inconveniente por participar o dejar de participar en el estudio.

Doy fe que el propósito de este estudio, los riesgos de las pruebas, y la naturaleza y propósito de las mismas me ha sido completamente explicados por: _____ y que he tenido oportunidad de discutir este asunto con él/ella. También he recibido la información para el paciente del estudio.

Entiendo que por el hecho de participar en este estudio no se derivaran beneficios directos para mi persona, sino para la comunidad científica y la sociedad. Los datos obtenidos con estas exploraciones serán totalmente confidenciales.

1. Confirmando que he leído y entendido este documento, y que he tenido la oportunidad de hacer todas las preguntas que creía necesarias..... SI NO

2. Entiendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de retirarme en cualquier momento, sin dar explicaciones, sin consecuencias legales o en la atención médica..... SI NO

3. Estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

Entrevista personal..... SI NO

Recogida de muestra de semen..... SI NO

Recogida de muestra de orina..... SI NO

Recogida de muestra de sangre..... SI NO

4. En el caso de producirse resultados que pudieran ser ciertamente relevantes para mí o mi familia deseo que se me comuniquen estos datos..... SI NO

5. Estoy de acuerdo en que se me contacte posteriormente por correo postal o teléfono en caso de que se haga un seguimiento de los participantes..... SI NO

Nombre y Apellidos del participante

Fecha

Firma

Rafael Lafuente/Anna Delgado

Fecha

Firma

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, por favor contacte con la Dra. Bénédicte Jacquemin en el número de teléfono 93 214 73 59 o al email bjacquemin@creal.cat.

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Parc de Salut MAR (CEIC – PS-MAR).

Anexo 5. Cuestionario de exposición ambiental

CUESTIONARIO EXPOSICIÓN AMBIENTAL

Título del estudio: Impacto de los factores ambientales en la calidad espermática en varones residentes en el área metropolitana de Barcelona (Air Pollution and SEMen quality, SEMAP)

Investigadores responsables: Dra. Bénédicte Jacquemin, Dr. M. A. Checa y Dr. M. Brassesco

Centros participantes

Centro de Investigación en Epidemiología Ambiental (CREAL)

Hospital del Mar – Parc de Salut Mar de Barcelona

Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH)

INFORMACIÓN

Deberá dedicar unos 20 minutos para rellenar este cuestionario. Procure informar lo más detalladamente posible cada parte del cuestionario para que tenga mayor validez. Puede entregar el cuestionario cumplimentado:

- en la siguiente visita al centro CIRH,*
- a través de email a la atención de Rafael Lafuente (rlafuente@cirh.es)*
- a través de FAX: 93 280 08 71 (a la atención de Rafael Lafuente)*

Todos los datos derivados del cuestionario, así como los resultados de los análisis de las muestras semen, serán tratados de forma totalmente confidencial y anónima. Los datos serán tratados de forma encriptada, y nunca aparecerá los datos personales en los resultados del estudio.

Para cualquier duda o consulta puede contactar con:

Rafael Lafuente / Gemma López

Laboratorio de Andrología

CIRH-Clínica Corachan

93 206 36 96

rlafuente@cirh.es

DATOS PERSONALES***HC:**

(Esta información es confidencial y será tratada de manera independiente respecto al resto de datos)

CENTRO: CIRH Hospital del Mar Médico:

Nombre y Apellidos:

Móvil:Email:

**Esta información (en hoja aparte) es confidencial y no será facilitada a terceros ni saldrá fuera del centro. El resto del cuestionario se integrará en una base de datos de forma independiente a los datos personales.*

0. DIRECCIÓN DOMICILIARIA Y LABORAL

(Esta información es confidencial y será tratada de manera independiente respecto al resto de datos)

A1. ¿Cuáles son los datos de su residencia actual?

CALLE: N° PISO.....

Municipio/Provincia CP

A2. ¿Cuánto tiempo hace que vive en su domicilio actual?

N° años |___/___/ N° meses |___/___/

A2a. Si lleva menos de 1 año, podría indicarnos la dirección de su domicilio anterior?

CALLE: N° PISO.....

Municipio/Provincia CP

A3. ¿Podría facilitarnos la dirección de su centro de trabajo?

CALLE: N° PISO.....

Municipio/Provincia CP

En caso de trabajo itinerante, indique en qué área lo desarrolla

1. DATOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS

A1. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? (Día/Mes/Año) |___/___/___/

Edad:

Altura: Peso:

A2. ¿Dónde nació usted? (Municipio, País)/.....

A3. ¿A qué etnia o raza considera usted que pertenece?

Blanca/Caucásica Amerindia

Gitana Asiática

Negra Magrebí

Otra

A4. ¿Cuál es su estado civil?

Soltero Casado o en pareja

Viudo Separado

Otros

A5. ¿Cuál es el nivel más alto de estudios que ha completado?

Sin estudios Estudios primarios

Formación profesional (FP o similar) Bachillerato/BUP/COU

Diplomatura/Licenciatura/Grado Máster y posgrado

Doctorado Otros

2. OCUPACIÓN

B1. ¿En relación a su situación laboral actual, cual le definiría mejor? (Puede señalar más de una opción)

Trabajo tiempo completo

Trabajo a tiempo parcial

Paro

Jubilado

Estudiante

Otro

[Saltar a la sección siguiente 'HISTORIA DE CONSUMO' en caso de no haber trabajado durante el último año]

B2. ¿En relación al trabajo actual y/o trabajos anteriores realizados durante el último año, podría indicarnos:

<i>Período de contrato</i>	<i>Tiempo trabajado en la empresa (inicio y finalización del contrato)</i>
<i>Actividad de la empresa</i>	<i>¿A qué se dedica la empresa?</i>
<i>Puesto de trabajo</i>	<i>¿Qué puesto de trabajo ocupa el trabajador en la empresa?</i>
<i>Tareas</i>	<i>¿Qué tareas desempeña el trabajador en su trabajo?</i>
<i>Exposiciones</i>	<i>¿El trabajador está expuesto en su trabajo a temperaturas extremas o sustancias químicas (herbicidas, pesticidas, insecticidas...)? Por favor, indique el tipo de exposición</i>

<i>Período de contrato (mes/Año)</i>	<i>Actividad de la empresa</i>	<i>Puesto de trabajo</i>	<i>Tareas</i>	<i>Exposiciones</i>
<i>Desde/.....</i>				
<i>Hasta/.....</i>				
<i>Desde/.....</i>				
<i>Hasta/.....</i>				
<i>Desde/.....</i>				
<i>Hasta/.....</i>				

3. HISTORIA DE CONSUMO

C1. ¿Cómo definiría su relación con el hábito tabáquico?

- Fumador actual [Ir a la pregunta C2]
- Exfumador [Ir a la pregunta C5]
- He fumado en alguna ocasión [Ir a la pregunta C9]
- Nunca he fumado [Ir a la pregunta C9]

FUMADORES ACTUALES: En referencia a su consumo de tabaco actual:

C2. ¿Con qué edad inició su consumo de tabaco? |___|___| años.

C3. ¿Qué tipo de tabaco consume habitualmente?

- Tabaco rubio
- Tabaco negro
- Tabaco rubio y negro
- No sabe

C4. ¿Señale el número de cigarrillos/puros/pipas que fuma habitualmente? (Indique la cantidad y SUBRAYE 'día' o 'semana' según si la cantidad hace referencia al día o a la semana. Puede señalar más de una opción)

- Tabaco en cajetilla: |___|___| cigarrillos al día / semana
- Tabaco de liar normal: |___|___| cigarrillos al día / semana
- Tabaco de liar sin aditivos: |___|___| cigarrillos al día / semana
- Puro |___|___| puros al día / semana
- Tabaco de pipa |___|___| pipas al día / semana

[Ir a la pregunta C9]

EXFUMADORES: En referencia a su consumo de tabaco que tenía:

C5. ¿Con qué edad inició su consumo de tabaco? |___|___| años.

C6. ¿Con qué edad cesó su consumo de tabaco? |___|___| años.

C7. ¿Qué tipo de tabaco consumía habitualmente?

- Tabaco rubio
- Tabaco negro
- Tabaco rubio y negro

No sabe

C8. ¿Cuánto fumaba habitualmente? (Indique la cantidad y SUBRAYE 'día' o 'semana' según si la cantidad hace referencia al día o a la semana. Puede señalar más de una opción)

- Tabaco en cajetilla: |___|___| cigarrillos al día / semana
 Tabaco de liar normal: |___|___| cigarrillos al día / semana
 Tabaco de liar sin aditivos: |___|___| cigarrillos al día / semana
 Puro |___|___| puros al día / semana
 Tabaco de pipa |___|___| pipas al día / semana

TABAQUISMO PASIVO: En referencia al tabaquismo en su domicilio:

C9. ¿Alguna de las personas que vive con usted fuma en el domicilio?

Si

C9a. Indique el consumo: |___|___| cigarrillos al día / semana
(SUBRAYE 'día' o 'semana' según si el consumo hace referencia al día o a la semana)

No, no se fuma en mi domicilio

C10. ¿Tiene en ocasiones personas de visita que fumen en su domicilio?

Si

C10a. Indique cuantas personas que vienen a su domicilio fuman: |___|___| personas al mes

No

OTROS TIPOS DE CONSUMO

C11. ¿Durante una semana normal, ¿cuántos vasos, copas o consumiciones acostumbra a tomar? (Marcar el consumo entre semana y fin de semana. En caso de consumo ocasional especificar el consumo mensual)

	Entre semana	Fin de semana	Al mes
<input type="checkbox"/> Cerveza	___ ___	___ ___	___ ___
<input type="checkbox"/> Vino o cava	___ ___	___ ___	___ ___
<input type="checkbox"/> Licores, coñac	___ ___	___ ___	___ ___
<input type="checkbox"/> Whisky, ginebra, ron, vodka	___ ___	___ ___	___ ___

C12. ¿Ha utilizado algún tipo de droga durante el último mes? (Incluye marihuana, hachís, cocaína, anfetaminas, MDMA...)

Si

C12a. Por favor especifique qué sustancia y la frecuencia:

a., |___|___| veces al mes

b., |___|___| veces al mes

No

4. HISTORIA RESIDENCIAL, CONSUMO Y USO DE AGUA

Vivienda

D1. ¿Cómo describiría su vivienda?

- Piso / apartamento (edificio) [Ir a pregunta D2]
 Casa unifamiliar aislada [Ir a pregunta D3]
 Casa unifamiliar pareada o adosada [Ir a pregunta D3]
 Otros

D2. En caso de piso o apartamento, en qué planta vive contando con entresuelo? |___|___| planta.

[Ir a la pregunta D4]

D3. En caso de casa aislada o apareada, en qué planta se encuentra el dormitorio? |___|___| planta.

D4. ¿Cuántos metros cuadrados tiene su domicilio sin contar jardín? |___|___| m².

D5. ¿Cuántas personas viven en su domicilio contando con usted? |___/___/ personas.

D6. ¿El dormitorio de su domicilio tiene ventana exterior?

Sí

No

D7. ¿Se han realizado obras en su domicilio durante los últimos 6 meses?

Sí

No

Aire acondicionado / Calefacción

D8. ¿Dispone de aire acondicionado?

Sí

No

D9. ¿Dispone de calefacción central?

Sí

D9a. Especifique tipo de calefacción central y la cobertura en su domicilio

	Salón-comedor	Dormitorio	Resto habitaciones
Gas natural	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eléctrico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> No			

Agua

D10. Indique la cantidad de agua bebe al día (SUBRAYE 'vasos' o 'litros' según corresponda): |___/___/ vasos/litros

D11. ¿Cuál es la procedencia del agua de grifo de su domicilio?

Agua de la red municipal

Otros

D12. ¿Cuál es la procedencia del agua que bebe en casa? (indique la más habitual)

Agua de grifo

D12a. Utiliza algún filtro?

Sí. ¿Qué marca?

No

Agua embotellada

Otro tipo

D13. ¿Cuál es la procedencia del agua que utiliza fuera de casa? (indique la más habitual)

Agua de grifo

D13a. Utiliza algún filtro?

Sí. ¿Qué marca?

No

Agua embotellada

Otro tipo

D14. ¿Cuál es la procedencia del agua que utiliza para cocinar? (indique la más habitual)

Agua de grifo

D14a. Utiliza algún filtro?

Sí. ¿Qué marca?

No

Agua embotellada

Otro tipo

D15. ¿Como se asea habitualmente, y con qué frecuencia a la semana? (Puede marcar ambas opciones)

Duchas: |___/___/ a la semana / mes

Baños: |___|___| a la semana / mes

D16. ¿Se baña en piscinas públicas o privadas?

Si

D16a. ¿Qué tipo de piscina y qué se utiliza como desinfectante? (Puede señalar ambas columnas)

	<i>Pública</i>	<i>Privada</i>
<i>Nada</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Cloro</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Ozono</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Otro</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>No sabe</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

No, nunca o casi nunca me baño en piscinas

D17. ¿Cuántas veces al mes se baña en una piscina? |___|___| veces al mes

D18. ¿Utiliza saunas o baños calientes? |___|___| veces al mes

Cocina

D19. ¿Qué tipo de cocina utiliza?

Gas natural

Eléctrica

Otras

D20. ¿Utiliza el extractor de humo cuando cocina?

Si

No

Limpieza

D21. ¿Con qué frecuencia se limpia su domicilio?

Menos de una vez por semana

Una vez por semana

Más de una vez por semana

D22. ¿Utiliza alguno de los siguientes productos para la limpieza al menos una vez por semana?

	<i>Si</i>	<i>No</i>	<i>No sabe</i>
<i>Lejía</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Amoníaco</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Sulfumán</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Spray Madera</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Limpiacristales</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Spray hornos</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Perfumes</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

D23. ¿Habitualmente realiza usted la limpieza de su domicilio?

Si

No

D24. ¿Les ayuda alguien en la limpieza del domicilio?

Si, mucho

Si, poco

Si, suficiente

No

D25. ¿Usa guantes cuando lava los platos?

Sí, siempre

Ocasionalmente

Nunca uso guantes

No, no lavo los platos a mano

5. EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES

E1. Indique cuál de los siguientes productos ha utilizado durante el último año. ¿Con qué frecuencia?

(Señale el producto que utiliza, y SUBRAYE 'al día' o 'a la semana' o 'al mes' según si el uso hace referencia al día, semana o mes)

- | | | | |
|--------------------------|--|----|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Colonia | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Lavado de cabello (champú, suavizante) | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Moldeado de cabello (laca, gomina, espuma) | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Lociones para cara (crema hidratante, after-shave) | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Crema hidratante para el cuerpo | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Otro tipo de cremas y lociones para el cuerpo | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Crema hidratante para manos o pies | | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Desodorante roll- | on | _ _ _ al día / semana / mes |
| <input type="checkbox"/> | Desodorante en spray | | _ _ _ al día / semana / mes |

E2. ¿Usa insecticidas o repelentes para mosquitos, cucarachas y/o hormigas?

Sí.

E3a. ¿Podría especificar el producto, qué zona del domicilio abarca y la frecuencia de uso? (Puede señalar más de una opción)

	Dormitorio	Toda la casa	Cuántas veces
Spray	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ a la semana/mes
Dispositivo enchufe (Pastilla/líquido)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ a la semana/mes
Loción repelente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ a la semana/mes
Otros.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ a la semana/mes
Otros.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ a la semana/mes
<input type="checkbox"/> No			

E3. ¿Utiliza el teléfono móvil de forma regular?

Sí

No

E4. ¿Cuántos minutos de media emite o recibe llamadas? |_|_|_|_|_| al día / a la semana. (SUBRAYE 'al día' o 'a la semana' según si se refiere al número de minutos al día o a la semana)

E5. ¿Qué modelo de teléfono tiene?

E6. ¿Tiene activada la conexión a internet?

Sí

E7a. ¿Qué tipo de conexión a internet tiene?

Internet 2G

Internet 3G

Internet 4G

Otro

No dispongo de conexión a internet / No tengo internet activado

E7. ¿Dónde guarda habitualmente el teléfono móvil cuando NO lo usa?

Bolsillo superior de la chaqueta o camisa

Bolsillo delantero del pantalón

Bolsillo trasero del pantalón

Bolso o mochila

E8. ¿Dónde tiene habitualmente el teléfono móvil cuando lo está utilizando?

En la mano

Utilizo auriculares bluetooth / manos libres

E9a. Indique donde lo guarda mientras lo utiliza:

- Bolsillo superior de la chaqueta o camisa
- Bolsillo delantero del pantalón
- Bolsillo trasero del pantalón
- Bolso o mochila

6. ACTIVIDAD FÍSICA Y TRANSPORTE

Actividad física VIGOROSA

Aquel ejercicio que requiere gran esfuerzo, provoca una respiración rápida y un incremento sustancial de la frecuencia cardíaca. Incluye squash, correr, hacer pesas, natación, ciclismo rápido, deportes de competición.

Actividad física MODERADA

Aquel ejercicio que acelera de forma perceptible el ritmo cardíaco. Incluye carpintería, aerobio, jogging, natación (no de competición), básquet, tenis etc.

F1. ¿Cuántas veces por semana realiza actividad física vigorosa?

Nunca

/___/___/ veces a la semana.

F1a. ¿Cuánto tiempo destina?

|__|__| minutos al día

|__|__| horas al día

No sabe

F2. ¿Cuántas veces por semana realiza actividad física moderada?

Nunca

/___/___/ veces a la semana.

F2a. ¿Cuánto tiempo destina?

|__|__| minutos al día

|__|__| horas al día

No sabe

F3. ¿Cuánto tiempo dedica a caminar? (Incluye trabajo y casa, como transporte, deporte o placer)

Nunca

/___/___/ veces a la semana.

F3a. ¿Cuánto tiempo destina?

|__|__| minutos al día

|__|__| horas al día

No sabe

F4. ¿Cuánto tiempo dedica a estar sentado en días laborables? (Incluye en el trabajo, en casa, mirando la TV, leyendo, etc.)

_____ minutos al día

_____ horas al día

No sabe

F5. ¿Cuánto tiempo pasa en los siguientes sitios? (Horas / minutos al día)

	Días laborables	Fin de semana	No sabe
En casa/...../.....	<input type="checkbox"/>
En el trabajo/...../.....	<input type="checkbox"/>
Espacios públicos cerrados (centro comercial...)/...../.....	<input type="checkbox"/>
Al aire libre (parque, calle)/...../.....	<input type="checkbox"/>
Medio de transporte/...../.....	<input type="checkbox"/>

F6. ¿Cuánto tiempo pasa en los distintos medios de transporte al día? (Horas / minutos al día)

	Días laborables	Fin de semana	No sabe	No lo utiliza
A pie/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En bicicleta/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En ciclomotor/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Coche o taxi/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bus o tranvía/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tren o metro/...../.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7. HÁBITOS DIETÉTICOS

G1. ¿Come productos biológicos, ecológicos u orgánicos? Con qué frecuencia?

- Nunca o 1 vez al mes
- 1-3 veces al mes
- 1 vez por semana
- Varias veces por semana
- Cada día

G2. ¿Toma algún suplemento vitamínico de forma regular?

- No
- Vitamina C
- Vitamina E
- β -caroteno
- Complejo multivitamínico. ¿Qué marca?

G3. Por favor especifique la frecuencia de consumo para cada grupo de alimentos:

⊕ G3. Por favor especifique la frecuencia de consumo para cada grupo de alimentos:

Alimento	Nunca < 1 mes	1-3 veces al mes	1 vez semana	2-4 veces semana	5-6 veces semana	1 vez al día	2-3 veces al día	4 o más al día
Legumbres (guisantes, garbanzos, lentejas)								
Verduras de hoja verde y hoja tipo col (lechuga, brócoli, endivias, espinacas...)								
Otras verduras								
Carne roja, salchicha, carnes frías, embutidos (puerco, vaca, ternera, cordero, salami)								
Carne blanca (pollo, conejo)								
Pescado azul (atún, sardina, salmón...)								
Otros pescados (bacalao, lenguado, rape...)								
Productos lácteos (queso, leche, yogurts...)								
Cítricos y frutos del bosque (naranja, limón, kiwi, fresa, fresasón...)								
Otras frutas								
Productos integrales (de grano entero)								
Aceite de oliva								
Nueces o frutos secos (almendras, avellana, cacahuètes, pasas...)								
Zumos (envasados y naturales)								
Comida enlatada								
Bebidas y soda enlatada								
Vino tinto								

FIN DEL CUESTIONARIO

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN EN ESTE ESTUDIO

Anexo 6. Minicuestionario de evaluación 24 horas antes a la eyaculación**Mini-CUESTIONARIO DE SEGUIMIENTO****EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL RECIENTE**

Nº INCLUSIÓN:

PIN:

Nº ciclo:	
Fecha del análisis:	
Días de abstinencia sexual	
Transporte empleado para acudir al centro	
EN LAS ÚLTIMAS 24 HORAS	
Ha fumado	
Si Sí: Nº cigarrillos aprox.	
Ha consumido café	
Si sí: cuántas tazas	
Ha consumido té	
Si sí: cuántas tazas	
EN LA ÚLTIMA SEMANA	
Ha estado resfriado?	
Ha tenido enfermedad infecciosa:	
Infección urinaria	
Gastroenteritis	
Ha ido a una sauna de vapor	

¿Ha cambiado de domicilio en el último año?

Anexo 7. Procedimiento para la realización del seminograma

1. OBJETO

El seminograma es una prueba diagnóstica de la calidad del semen. El objetivo de este protocolo es analizar y cuantificar las variables seminales de la muestra para hacer el diagnóstico de ésta.

2. ALCANCE

Este proceso abarca desde la recogida de la muestra de semen del paciente hasta la determinación de las características del eyaculado en el laboratorio de andrología.

Su finalidad es diagnosticar la fertilidad y detectar problemas de esterilidad masculina.

3. EJECUCION

Para el pipeteo de muestras de semen utilizar siempre pipetas de plástico Pasteur estériles de 3mL y trabajar dentro de la cabina de flujo. Utilizar siempre los elementos de protección (guantes EN-374 de protección biológica) ya que las muestras pueden contener agentes infecciosos dañinos (por ejemplo, VIH, virus de la hepatitis, y virus del herpes)

Tras la recepción de la muestra en el laboratorio de andrología verificar que el tiempo ideal transcurrido desde la eyaculación hasta el comienzo del análisis es de 30 minutos. Si pasan más de 60 minutos, los resultados pueden no ser representativos ni fiables y debe anotarse en el registro.

Dejar atemperar la muestra en el incubador a 30° durante 15-30 minutos para su completa licuefacción.

4. EXAMEN MACROSCÓPICO INICIAL

- Se realiza una valoración del semen previa homogenización, determinando:

Color: El semen recién obtenido es denso, viscoso, opaco y blanquecino. Un color verdoso o amarillento indica la existencia de infección seminal (piospermia). Un color rojizo indica la presencia de sangre (hemospermia), generalmente por inflamación o congestión a cualquier nivel de la vía seminal.

Licuefacción: La muestra se coagula por efecto de las proteínas de las vesículas seminales y se licúa por la acción de las enzimas de origen prostático. Una muestra debería haber licuado al cabo de 15-30 minutos de haberse obtenido la muestra.

Si observamos, a simple vista, pequeñas aglutinaciones en la muestra, diremos que tiene licuefacción incompleta. Por el contrario si no observamos dichas aglutinaciones, la licuefacción será completa.

Viscosidad: Si al dejar caer el semen desde una pipeta este cae de forma continua, formando una hebra >2cm diremos que la viscosidad está aumentada. Por el contrario, si cae gota a gota, diremos que es normal.

Para las muestras con viscosidad moderada es suficiente comentar el hallazgo en el registro. La viscosidad aumentada interfiere con la determinación de la movilidad espermática. Puede ser solventada pipeteando (procurando no formar burbujas) con pipeta Pasteur, dejando calentar el bote a 37° durante 10-15 minutos, o bien diluyendo la muestra con medio de cultivo (Sperm Buffer, Sperm Rinse o similar) y mezclando con pipeta Pasteur.

Si optamos por la dilución, habrá que tenerlo en cuenta al hacer los cálculos de concentración; se recomienda coger los 10 microlitros de muestra para el análisis, antes de diluir.

Volumen: Mediante una Pipeta Pasteur de plástico. El volumen se valora a toda la muestra, incluyendo los cuerpos gelatinosos que no se hayan licuado después de 60 minutos de la eyaculación, a 37°C. Se considera un volumen normal cuando este es mayor o igual a 1.5 ml, cuando se presenta un volumen menor se considera una hipospermia.

pH: El pH se mide con una pipeta graduada esparciendo uniformemente una gota de semen en un papel indicador. El color de la zona impregnada se compara con el de la tira de calibración.

Considerar un pH normal ≥ 7.2 .

Las alteraciones del pH seminal son indicativas de alteración a nivel de la próstata o de las vesículas seminales. Si es inferior a 7.2 en una muestra con azoospermia, puede haber obstrucción de los conductos eyaculatorios o ausencia bilateral congénita de conductos.

Tras la observación macroscópica, depositaremos una pequeña gota de semen, equivalente a 10 microlitros, en una cámara de recuento (Leja o Makler).

5. EXAMEN MICROSCÓPICO DEL EYACULADO

Analizar la **concentración y movilidad** con cámara de recuento. Se debe realizar la estimación de la concentración espermática mediante el uso de una cámara de recuento Leja (Standard Count 4 Chamber Slide 10 micron) o en su defecto una cámara de recuento Makler® (Sefi-Medical Instruments), la cual permite valorar el recuento de espermatozoides y movilidad espermática de forma rápida y precisa.

Analizar la **morfología espermática**. Identificar la presencia de elementos celulares que no sean espermatozoides durante la investigación microscópica de la muestra.

5.1. CONCENTRACIÓN Y MOVILIDAD

Se utiliza un microscopio de contraste de fases.

Homogenizar bien la muestra de semen evitando la formación de burbujas.

Colocar 5 microlitros de la muestra con pipeta automática en la cámara de recuento Leja (Standard Count 4 Chamber Slide 10 micron) o en su defecto una cámara de recuento Makler® (Sefi-Medical Instruments)

Realizar el conteo ya sea manual o con Analizador ISAS (Proiser SL)-

5.1.1. CAMARA MAKLER

Makler® (Sefi-Medical Instruments), la cual permite valorar el recuento de espermatozoides y movilidad espermática de forma rápida y precisa.

Consta de un único espacio con una base y una tapa.

Limpiar las superficies de cristal de la cámara de recuento Makler® antes de utilizarla, ya que la medida de las partículas de polvo es más de 10 μm .

Con una micropipeta colocar una gota de unos 5-10 μl de muestra en el centro de la parte inferior de la cámara.

Colocar la tapa encima de los cuatro puntos de cuarzo, así se asegura el extendido automático de la gota. Se recomienda que la gota se esparza sobre toda base de la cámara. **Es importante que no flote la tapa de cristal sobre los puntos de cuarzo y que no queden burbujas en la gota.**

Una vez la tapa de cristal está colocada, evite tocarla, levantarla o recolocarla, puesto que esto podría afectar el esparcido uniforme de los espermatozoides dentro de la gota.

5.1.2. RECUENTO MANUAL cámara Makler®

Realizar el recuento de espermatozoides por línea de 10 cuadros, el cual representa su concentración en millones por mililitro. Es recomendable contar cuatro o cinco líneas para hacer una media y hacer el recuento de dos o tres gotas para incrementar la fiabilidad.

Para el recuento de toda la cámara:

En toda la cámara caben aproximadamente 15 rejillas de 10 líneas, cada una con 10 cuadros.

(total espermatozoides) ÷ 150 M/ml (1500 cuadros)

Al realizar el examen microscópico, también deberemos tener en cuenta la presencia de los siguientes fenómenos en la muestra:

Espermatozoides “Pin head”



Son un tipo de espermatozoides con una anomalía morfológica a nivel de cabeza (presentan cabeza con forma de alfiler), que distinguen fácilmente por su pequeña cabeza de color negro. Son espermatozoides no aptos ya que no contienen información genética.

Células redondas

Son células que se encuentran en el eyaculado y que son diferentes a los espermatozoides. Éstas incluyen células epiteliales del tracto genitourinario, células prostáticas, células de la espermatogénesis y leucocitos. Son indicativas de alguna anomalía.

Aglutinaciones

Son espermatozoides móviles que se tocan entre ellos cabeza a cabeza, cola a cola o cabeza a cola.

La presencia de aglutinación sugiere, aunque no es evidencia suficiente, una causa inmunológica de infertilidad por presencia de anticuerpos antiespermatozoide.

5.2. VITALIDAD

5.2.1. TINCIÓN PARA VITALIDAD

La determinación de la vitalidad se llevará a cabo cuando la **movilidad de la muestra examinada sea <50 % de espermatozoides móviles**. Se determinará al momento el porcentaje de espermatozoides vivos mediante la tinción de eosina/nigrosina.

Si la concentración de la muestra es muy baja se debe concentrar la muestra y hacer la preparación con el concentrado. Los espermatozoides muertos se tiñen de color rojo y los vivos quedan sin teñir (se ven de color blanco). Se deberán contar un mínimo de 200 células. Según la OMS (2010), se considera normal una muestra con el 58% o más de formas vivas.

Procedimiento para llevar a cabo la tinción Eosina – Nigrosina

Depositar en un porta una gota de la muestra de esperma con una gota de eosina, mezclar y esperar 1 minuto

Añadir una gota de nigrosina y esperar 1 minuto

Extender la muestra en el porta, dejar secar y montar con una gota de DPX y un cubre encima para observar a 100X en el microscopio óptico con aceite de inmersión y sin contraste de fases.

5.3. TEST CON PENTOXIFILINA

Se utiliza para determinar la vitalidad espermática “in vivo”, sin necesidad de fijar los espermatozoides. Se utiliza pentoxifilina (Hemovas o similar).

Procedimiento

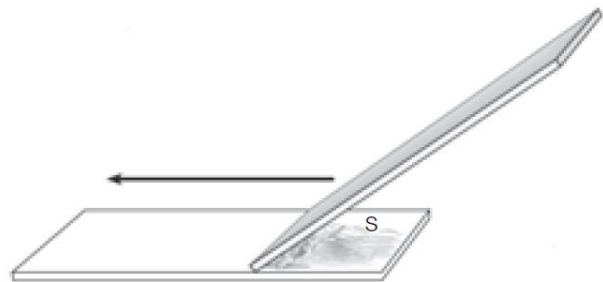
Mezclar 1:1 la muestra con la pentoxifilina. Homogeneizar y depositar una gota de la mezcla sobre un portaobjetos. Cubrir con un cubre y observar en el microscopio. Si hay vitalidad se observará movimiento de los espermatozoides.

5.4. MORFOLOGIA

5.4.1 PREPARACION DE LA EXTENSIÓN

Para la realización de la morfología espermática: Se pone una gota de la muestra de semen sobre el porta, se hace una extensión de la muestra tal, y como se ve en la imagen, y se deja secar.

Para muestras de concentración normal poner 5-10 μl de muestra. Para muestras con concentración $<2 \times 10^6/\text{ml}$, concentrar la muestra (1500 rpm, 10 min), retirar el sobrenadante y resuspender con menos volumen (hasta una concentración máxima de 50 millones/ml).



Con la ayuda de otro portaobjetos o de un cubreobjetos, realizar una extensión por toda la superficie del portaobjetos, asegurándose de que la inclinación del portaobjetos es de unos 45° y de que se realiza una presión suave y uniforme. Un exceso de presión o un movimiento de fricción pueden alterar seriamente la morfología.

TINCIÓN

Teñir la preparación con los colorantes Diff Quik® II. La tinción se lleva a cabo sumergiendo la preparación en tres soluciones consecutivas:

1) Solución FIJADORA “color turquesa claro”: sumergir el portaobjetos 1 minuto

Retirar el exceso de líquido apoyando el portaobjetos en un papel absorbente.

2) Solución ACIDA (eosina) “color rojo”: sumergir 1 minuto

Retirar el exceso de líquido apoyando el portaobjetos en un papel absorbente.

3) Solución BASICA (tiazina) “color violeta”: sumergir 1 minuto

Lavado en AGUA del grifo.

Secado al aire dejando drenar el exceso de agua colocándolas de forma vertical sobre papel absorbente.

Una vez secas, montar con una gota de DPX y cubrir con un cubreobjetos.

Cambiar las soluciones de tinción 1 vez a la semana aproximadamente.

5.4.2 VALORACIÓN DE LA PREPARACIÓN

Indicaciones generales

La valoración se realizará en el microscopio de campo claro, sin contraste de fases, a 100x y con aceite de inmersión.

Contaje

Los porcentajes de las características morfológicas se realizan con un contador manual, debiéndose contar un mínimo de 200 células.

Se contarán por separado las anomalías de la cabeza, cola, pieza intermedia (PI) y restos citoplasmáticos.

Se obtendrán los porcentajes según la fórmula siguiente:

Ej: $(\text{anomalía cabeza} / \text{total espermatozoides anormales}) * 100$

Se obtendrá también el Índice de Teratozoospermia (ITZ) mediante la fórmula siguiente:

$(\text{N}^\circ \text{ spz con anomalías cabeza} + \text{n}^\circ \text{ spz con anomalías de cola} + \text{n}^\circ \text{ spz con anomalías en la PI} + \text{n}^\circ \text{ spz con restos citoplasmáticos}) / \text{n}^\circ \text{ total de spz con anomalías}$

Defectos morfológicos

Los defectos pueden estar en cualquiera de las partes del espermatozoide: cabeza, pieza intermedia o cola.

Defectos de cabeza:

Incluyen formas grandes, pequeñas, alargadas (cociente largo/ancho >2), con forma de pera (piriforme), redondas, amorfas, vacuoladas ($>20\%$ del área de la cabeza ocupada por vacuolas no teñidas), acrosomas pequeños ($<40\%$ del área de la cabeza) o dobles cabezas, o combinaciones de estos defectos.

Defectos de pieza intermedia:

Incluyen cola doblada (cuando la pieza intermedia y la cola forman un ángulo $>90^\circ$ con el eje longitudinal de la cabeza), con inserción asimétrica, pieza intermedia ancha, irregular o estrecha, o una combinación de estas.

Defectos de cola:

Incluyen cola corta, doble, en horquilla (hairpin), rota, doblada (ángulo $>90^\circ$), irregular o enrollada, o las combinaciones de estas anomalías. Las colas sueltas no se cuentan.

Una frecuencia $>20\%$ de formas enrolladas deberá comentarse en el informe.

Gotas citoplasmáticas:

Pueden permanecer restos citoplasmáticos sobresaliendo de la base de la cabeza en el cuello-pieza intermedia. Las gotas con contorno liso, y un tamaño no superior a la tercera parte de la cabeza del espermatozoide son clasificadas como normales. Si el tamaño de la gota es mayor o el contorno es irregular (teñida verde o roja), se trata de un residuo citoplasmático anormal y se clasifica como gota citoplasmática.

Anexo 8. Procedimiento para la determinación de la fragmentación del ADN espermático mediante SCSA

1.- INTRODUCCIÓN

Este PNT detalla cómo realizar el test de fragmentación de ADN espermático mediante diferentes técnicas como prueba diagnóstica para el estudio de la infertilidad. Esta técnica permite cuantificar la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado con objeto de ofrecer información adicional para valorar el grado de fertilidad de un paciente. Se aconseja realizar el estudio de fragmentación en los siguientes casos:

Infertilidad idiopática

Fallos repetidos de implantación o mala calidad embrionaria

Abortos de repetición

Varicocele

Pacientes de más de 45 años.

Pacientes que estén o hayan estado expuestos a una situación de daño oxidativo (periodos de fiebre alta, fumar, contacto con sustancias tóxicas...).

2. DESARROLLO

Se recomienda realizar el ensayo lo antes posible tras la recogida de la muestra. Pueden procesarse asimismo, muestras crioconservadas o congeladas a -20°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba, que debe realizarse justo después de la descongelación.

2.1. SCSA: inducción ácida mediante naranja de acridina

Cada muestra se realizará por duplicado ya que habrá un control negativo.

Procesamiento de la muestra

Obtener dos alícuotas de 10 μL de la muestra en fresco y depositar en dos tubos eppendorf (muestra y control negativo). Ajustar el volumen de los tubos a 200 μL con el buffer TNE (Ej: 10 μL muestra + 190 μL TNE). Al tubo del control negativo: añadir 400 μL de TNE.

Preparar la Solución de tinción: mezclar 6 μL de naranja de acridina por cada mL de buffer de tinción.

Esto es: 1200 μL buffer de tinción + 7.2 μL de Naranja de Acridina por tubo que se tenga que analizar. (Ej.: Muestra + control negativo: preparar 2400 μL + 14.4 μL)

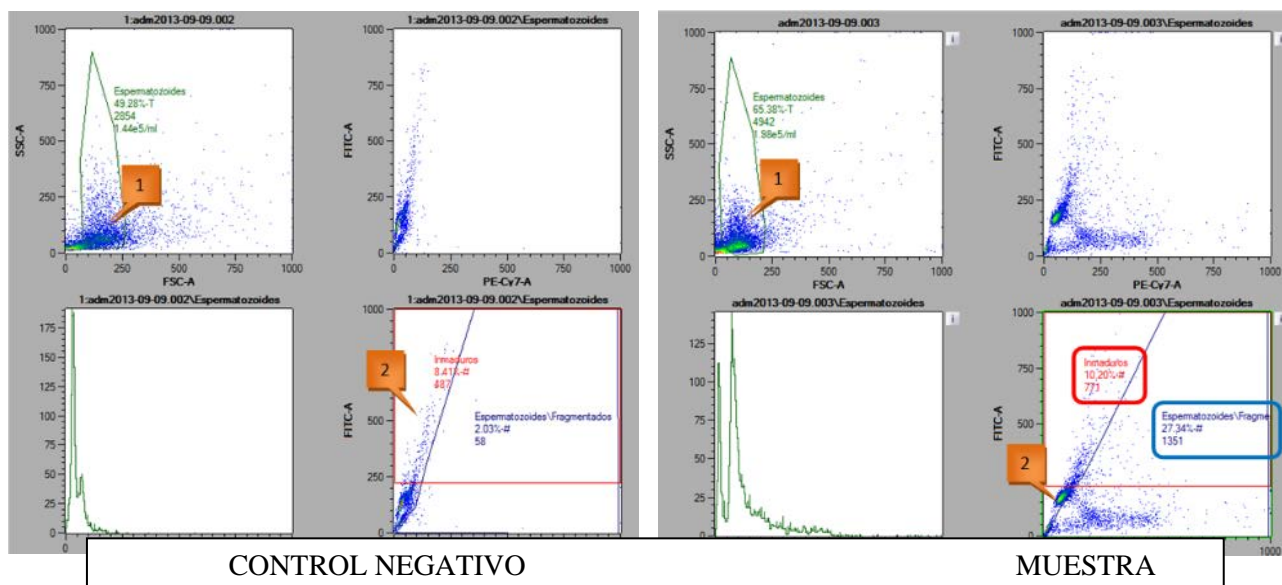
Al tubo muestra: añadir 400 μL de la solución ácida a la muestra durante 30 segundos.

Añadir 1200 μL de la solución de tinción a los 2 tubos (Muestra y control negativo).

Pasados 3 minutos se puede realizar la adquisición en el citómetro.

Para la adquisición se deberán utilizar las plantillas “SCSA” en Instrument Settings y Analysis Template. Se leerá primero el control negativo y después la muestra.

Los resultados obtenidos se registrarán teniendo en cuenta el % de espermatozoides con ADN fragmentado y el % de espermatozoides inmaduros.



BUFFER DE TINCIÓN

- contiene fosfato, por lo que se aconseja guardar en nevera

Composición:

Ác. Cítrico 0,1M (Fluka)

Na₂PO₄ 0,2M (Pm = 141,96)

EDTA

NaOH

NaCl

HCl

H₂O bidestilada

Solución A: 29,41 g ác. Cítrico (dihídrico) + 1 L H₂O

(Si es puro 19,2 g/L, y si es monohídrico 21,01 g/L)

Solución B: 28,39 g Na₂PO₄ + 1 L H₂O

Mezclar 370 mL sol. A + 630 mL sol. B + 372 mg EDTA. Añadir NaOH hasta pH 8-10 para que se disuelva el EDTA

Agitar con mosca

Añadir 8,77 g NaCl

Ajustar pH a 6 con HCl

Guardar a 4°C

SOLUCIÓN ÁCIDA

Composición:

HCl 2N

NaCl

Tritón X-100

H₂O bidestilada

En probeta con agitación, añadir a 250 mL de H₂O bidestilada + 4,39 g NaCl + 20mL HCl 2N + 0,5 mL Tritón X-100. Enrasar a 500 mL con H₂O bidestilada. Ajustar pH a 1,2.

TNE

Composición (10x) para 600 mL:

TRIS

HCl

EDTA

H₂O bidestilada

En probeta con agitación, añadir 300 mL de H₂O bidestilada + 9,48 g TRIS + 52,6 g HCl + 3,72 g EDTA. Enrasar a 600 mL con H₂O bidestilada y ajustar a pH 7,4

SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE

El procesamiento de las muestras debe realizarse bajo una cabina de extracción de gases. Evitar inhalación y contacto con las soluciones suministradas. Las soluciones utilizadas contienen productos tóxicos. No liberar los productos usados al medio ambiente, realizarlo en contenedores adecuados. Tras la utilización de las diferentes soluciones reactivas estas se descartaran en un bote de recogida de muestras bien cerrado y se desechará en el contenedor amarillo. Las muestras biológicas deben tratarse como potencialmente infecciosas. Se recomienda el uso de guantes certificados durante todo el proceso.

3.- RESULTADOS

- Los resultados obtenidos mediante el citómetro de flujo se deberán interpretar adecuadamente y registrar en la plantilla correspondiente de la base de datos.

- Generar un informe de resultados según el registro anexo. Imprimir dos copias, una para el paciente y otra para la historia clínica.