

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción



ASESA

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ANDROLOGÍA,
MEDICINA SEXUAL Y REPRODUCTIVA

CUADERNOS DE ANDROLOGÍA CLÍNICA

Contaminación ambiental y manejo del estrés oxidativo en el factor masculino

1ª Edición · 2017

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción



Contaminación ambiental y manejo del estrés oxidativo en el factor masculino

Coordinadores

CARMEN ANARTE JIMENO
CRISTINA GONZÁLEZ RAVINA
RAFAEL LAFUENTE
JUAN CARLOS MARTÍNEZ SOTO
ALBERTO PACHECO CASTRO

Comisión de Trabajo del Grupo de Interés de Andrología de ASEBIR y miembros de ASESAs:

DAVID AMORÓS PRATS (ASEBIR)
SARA ATIENZA DE NAVA (ASEBIR)
MOISÉS DE LA CASA HERAS (ASEBIR)
BÉNÉDICTE JACQUEMIN (ASESA)
RAFAEL LAFUENTE (ASEBIR-ASESA)
MARÍA JOSÉ LÁZARO MORILLO (ASEBIR)
GEMMA LÓPEZ GRANOLLERS (ASEBIR-ASESA)
JUAN CARLOS MARTÍNEZ SOTO (ASEBIR)
JAIME MENDIOLA OLIVARES (ASESA)
ANA PUIGVERT (ASESA)
SILVIA SAHUQUILLO FRÍAS (ASEBIR)



ASEBIR

1º Edición - 2017

El contenido de este Cuaderno ha sido ratificado por
la Junta Directiva de Asebír y la Junta Directiva de ASESAs

Diseño y maquetación

Góbal, Agencia Creativa Digital
c/ Castillo de Fuensaldaña 4 · 28232 Las Rozas, Madrid
Tfno.: 91 626 39 74 · www.gobalo.es · hola@gobalo.es
Depósito legal: M-30.301-2008 - ISSN: 1888-8011

Introducción	7
1. Disruptores endocrinos, vías de exposición y su efecto en la calidad seminal y en las hormonas reproductivas	10
1.1. Disruptores endocrinos: fuentes y evidencia de sus efectos sobre la salud reproductiva masculina	12
1.2. Mecanismos de acción de los CDE sobre el sistema reproductivo masculino ..	17
2. Distancia anogenital como biomarcador del medio ambiente hormonal prenatal en varones	20
2.1. Distancia anogenital y su relación con la salud reproductiva masculina	22
3. Principales marcadores de contaminación atmosférica que podrían afectar a la calidad seminal. Normativa europea vigente	25
3.1. Principales contaminantes atmosféricos	26
3.2. Estudios en modelo animal	27
3.3. Estudios en varones.....	27
3.4. Posibles mecanismos.....	30
3.5. Situación actual de la normativa europea medioambiental.....	30
3.6. Perspectivas de futuro	33
3.7. Efectos de la contaminación ambiental sobre la salud.....	35
4. Efectos de los campos electromagnéticos en la calidad seminal	36
5. Hábitos de vida: ejercicio físico, tabaco, alcohol, cafeína y drogas en relación con la calidad seminal	42
5.1. Hábitos de vida	43
6. Factor masculino y estrés oxidativo	47
6.1. Especies reactivas del oxígeno	48
7. Sistema antioxidante en semen y suplementación exógena	54
7.1. Sistema antioxidante en semen.....	55
7.2. Suplementación exógena	58
8. Conclusiones	65
9. Referencias bibliográficas	67
10. Listado de siglas	103

Notas

Introducción

Ana Puigvert. Unidad de Reproducción Quirón Barcelona

Nacemos, crecemos, vivimos, trabajamos, nos alimentamos, respiramos y nos reproducimos en un entorno en desarrollo permanente. Nuestra sociedad está constantemente en cambio continuo y a gran velocidad.

Todas las categorías animales son evolutivas y requieren de un periodo de adaptación biológica a los cambios medio ambientales.

Los seres humanos somos producto progresivo de los cambios del medio, las mutaciones y la selección natural que fueron modelando al conjunto de poblaciones de homínidos.

Ello explica que en Europa, en plena época glacial el *Homo heidelbergensis*, da lugar a una especie adaptada a una climatología muy adversa, fría, con una flora y una fauna también adaptada: será el *Homo neanderthalensis*.

El Neanderthal, el primer humano verdadero, experto cazador que cuidaba a sus hijos y ancianos, enterraba a sus muertos y fue capaz de construir herramientas mucho más precisas (1).

Para estos cambios se requirieron miles de años que permitieron la evolución de la raza humana, modificando nuestro fenotipo, hábitos de vida y mutando genéticamente provocando paulatinamente la pérdida de ciertas características morfológicas para adaptarse al nuevo entorno.

Desde los inicios del siglo XIX, con la revolución industrial, muchos de nuestros hábitos de vida han cambiado drásticamente transformando nuestro entorno natural de forma muy rápida, sin permitir el periodo de adaptación necesario ante nuevas situaciones. Fue el inicio de la exposición del ser humano a elementos tóxicos medio ambientales y nutricionales lo que impactó negativamente en nuestro organismo y forma de vida, y determinó la aparición de trastornos en la salud que, en aquella época y de forma simplemente observacional ya se detectaron. Además ciertas alteraciones en el proceso reproductivo ya se comprobaron cuando la causa efecto era tan evidente como podría ser una elevada tasa de abortos en poblaciones mineras.

En los inicios del siglo XX, la aparición de factores tóxicos que actúan sobre el ser humano y su proceso reproductivo se aceleró aún mucho más, apareciendo agencias de control y regulación de sustancias farmacológicas para fiscalizar graves situaciones como la que se vivió por el efecto de la talidomida en recién nacidos. La talidomida afectaba al desarrollo fetal a través de la ingesta directa de la madre durante el primer trimestre de gestación o bien a través del espermatozoide fecundante que ya portaba los efectos teratogénicos del medicamento y los transmitía en el momento de la fecundación (2).

En 1977 se publicó el primer artículo basado en la toxicología reproductiva en el que se describe el efecto tóxico reproductivo del pesticida dibromocloropropano: DBCP (3). A partir de entonces, se crea la necesidad de un área de conocimiento, la toxicología reproductiva, como consecuencia de la situación del entorno medio ambiental y factores de riesgo toxicológicos:

- Toxicología aguda
- Carcinogénesis
- Teratogénesis
- Toxicidad genética
- Toxicidad reproductiva

La toxicología reproductiva es una especialidad de interés primordial que permite profundizar en aquellos fenómenos que interfieren en la salud de la raza humana en su proceso reproductivo: base que garantiza la continuidad de nuestra especie.

El mecanismo por el que se puede producir el daño es altamente complejo, ya que no hablamos solamente del fenómeno primario de caso-efecto sino que puede afectar a los dos miembros que participan en el proceso reproductivo y a cada una de las fases donde puede actuar:

- Eje hipotálamo–hipofisario–testicular
- Afectación directa en el gameto masculino en cada uno de sus etapas evolutivas
- Afectación durante el proceso de fecundación, implantación y desarrollo embrionario

Tengamos en cuenta que cada año aparecen 600 sustancias químicas nuevas a las que los humanos quedamos expuestos y que pueden interferir, cambiar y afectar al proceso reproductivo masculino (4).

De nuevo nos encontramos ante una complejidad añadida ya que dichos elementos pueden actuar de diversas formas:

- Acción directa tóxico-proceso reproductivo
- Acción indirecta a través de algún metabolito del factor tóxico
- Dependiendo de la exposición al tóxico que puede ser agudo o crónico
- Exposición crónica ocupacional
- Exposición crónica medio ambiental
- Dependiendo de la dosis: leve, moderado o grave
- Aditiva que requiera de otro elemento para su activación

Históricamente siempre se ha estudiado el factor tóxico reproductivo en las mujeres, si bien en las últimas décadas sabemos ya que los efectos adversos toxicológicos en la función reproductiva masculina están marcando el descenso de la capacidad reproductiva del ser humano.

Múltiples trabajos, desde los años 90 demuestran la disminución de las características seminales de los hombres, obligando a la OMS a adaptar los parámetros seminales a los nuevos tiempos y, a su vez, a la creación de un órgano europeo de control: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances (**REACH**, EC 1907/2006) cuyo objetivo y función es la de llevar a cabo estudios sobre diversas sustancias químicas no analizadas previamente.

A todo ello se suma un mayor conocimiento de la fisiopatología espermática pudiéndose detectar, mediante estudios complementarios y diagnósticos de laboratorio, aquellos procesos de deterioro del espermatozoide que permiten medir marcadores oxidativos, peroxidación lipídica, lesión de ADN espermático, etc. (5). Gracias a estos avances y al mayor número de herramientas terapéuticas disponibles hoy en día, se han optimizado los protocolos de actuación médica y tratamiento farmacológico para recuperar la capacidad fértil.

Esta revisión es un gran paso para introducirse en el conocimiento sobre la contaminación ambiental y el manejo del estrés oxidativo en el factor masculino, su impacto en la capacidad fértil de la pareja y las pautas de actuación para neutralizar los elementos negativos y mejorar la reproducción humana.

1. Disruptores endocrinos, vías de exposición y su efecto en la calidad seminal y en las hormonas reproductivas

Autores: **Jaime Mendiola y María José Lázaro**

Resumen

Los compuestos disruptores endocrinos (CDE) interfieren en el balance hormonal normal y podrían producir consecuencias adversas en humanos. El sistema reproductivo masculino podría ser susceptible a los efectos de estos tóxicos y contaminantes ambientales. En los siguientes apartados se discuten los conocimientos actuales, basados en estudios experimentales y epidemiológicos, sobre la relación entre la exposición a CDE y la salud reproductiva masculina así como los posibles mecanismos de acción asociados. Además, se mencionan algunas recomendaciones sobre futuras líneas que ayudarán a comprender mejor los efectos de los CDE sobre la salud reproductiva del varón.

Introducción

Los compuestos disruptores endocrinos (CDE) 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 (1). Los CDE 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. Estos compuestos exógenos pueden provenir de ámbitos domésticos e industriales o de vertidos urbanos y rurales. La población general está expuesta a CDE a través de la ingesta de comida contaminada, inhalación de aire y polvo contaminado y contacto con la piel, simplemente y además, algunas áreas están sujetas a un mayor riesgo debido a razones culturales y geográficas (2).

Ya en los años 60 se observó que determinados productos químicos utilizados para el control de plagas agrícolas estaban afectando de manera importante al equilibrio entre las especies y que, en ocasiones, su efecto no se manifestaba de forma inmediata sino apareciendo incluso en generaciones posteriores (3). Unos años más tarde, en 1979, se celebró el primer simposio

“Estrogens in the Environment”, en el Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente Americano (NIEHS), donde se presentaron algunos datos acerca de las consecuencias de la exposición a compuestos como el dietilestilbestrol (DES); en el quinto simposio celebrado en 1985, sería el momento en el que se expondrían datos relevantes acerca del efecto de estas sustancias químicas sobre el desarrollo humano, constatándose tanto su ubicuidad, como el diferente potencial que tendrían dichas sustancias en su efecto como agonistas o antagonistas hormonales (4, 3). Fue en 1991 cuando se acuñó el término “disruptores endocrinos (CDE)” para referirse a todo este grupo de compuestos químicos organohalogenados y bioacumulables con efectos sobre el sistema endocrino de humanos y animales (3).

Los efectos de los CDE pueden deberse a que: a) mimetizan los efectos de las hormonas endógenas, b) antagonizan los efectos de las hormonas endógenas, c) alteran la síntesis y metabolismo de las hormonas endógenas, d) se unen a los receptores de las proteínas esteroideas interfiriendo con su actividad normal (5).

En las últimas décadas se ha documentado una tendencia temporal de descenso en la concentración espermática y niveles séricos de testosterona, y una tasa incrementada de cáncer testicular entre poblaciones adultas de varones (6, 7). Los investigadores barajan como potencial riesgo la exposición a CDE y su posible efecto sobre la salud reproductiva del varón. Los modelos celulares y los estudios toxicológicos en animales han demostrado que los CDE pueden ejercer efectos adversos sobre el sistema reproductor masculino. En humanos, están aumentando día a día las evidencias en estudios epidemiológicos que señalan a los CDE como potenciales alteradores de la función reproductiva (8). Sin embargo, la relación entre el declive de la salud reproductiva masculina y su relación con la exposición a CDE es un tema que ha suscitado controversia durante las dos últimas décadas (9).

Es importante también mencionar que exposiciones prenatales (fetales) podrían tener un efecto tardío en la función reproductiva del adulto. La hipótesis del síndrome de disgenesia testicular (TDS) sugiere que un desarrollo testicular inadecuado durante la vida fetal podría dar lugar a uno o más desórdenes reproductivos postnatales, siendo uno de los principales factores de riesgo la exposición fetal a CDE (10). Este síndrome comprende cáncer testicular, hipospadias, criptorquidia y baja calidad seminal. Otros estudios observacionales importantes en humanos han mostrado que las malformaciones genitales (incluyendo criptorquidia e hipospadias) podrían estar directamente relacionadas con la exposición prenatal a estos tóxicos y contaminantes (11).

Esta sección se centra en la revisión de los datos en humanos adultos que relacionan las exposiciones a CDE con la calidad seminal y los niveles de hormonas reproductivas. El objetivo específico serán los compuestos no persistentes como el bisfenol A (BPA), los ftalatos, o los plaguicidas organofosforados; y por otro lado, los compuestos orgánicos persistentes como los plaguicidas organoclorados: el diclorodifeniltricloroetano (DDT), su metabolito diclorodifenildicloroetileno (DDE), y los bifenilos policlorados (PCBs) (Tabla 1).

Tipos	Composición química	Usos	Principales vías de exposición
Organoclorados	Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	En medicamentos contra la malaria y también como insecticida.	Oral; aérea/inhalación
Organofosforados	Clorpirifos	Como insecticida, principalmente, en algodón, maíz, almendra y árboles frutales.	Oral; aérea/inhalación
	Malation	En agricultura como plaguicida y en cuidados médicos para tratamiento de pediculosis y sarna.	
	Dietiltiofosfato (DETP)	En productos hortofrutícolas como insecticida.	
	Dimetilfosfato (DMP)	En insecticidas.	
	Etilfosfato (EP)	En plásticos, plaguicidas, disolventes.	
	Metamidofos	En cultivos como insecticidas y en venenos.	
Otros compuestos químicos	Bisfenol A (BPA)	Como componente de las resinas epoxi que se usan en la manufacturación de policarbonatos, usados en plásticos de almacenamiento, botellas de agua y refrescos, canalizaciones, y en componentes de empaquetamiento de alimentos (recubrimiento de latas de conservas, etc.), equipamiento deportivo, dispositivos médicos y dentales, composites dentales y sellantes, CDs y DVDs, y electrodomésticos, y como inhibidor de polimerización en el PVC. También se encuentra en las copias de papel sin carbón.	Oral; aérea/inhalación; transdérmica
	Ftalatos	En adhesivos y pegamentos, materiales de construcción, productos de cuidado personal, dispositivos médicos, detergentes y surfactantes, juguetes de niños, embalajes, plastilinas, ceras, pinturas, tintas de impresión y recubrimientos, productos farmacéuticos, productos alimenticios, textiles y plásticos blandos. En el hogar como artículos para el cuidado personal, electrónica moderna y aplicaciones médicas, y PVC.	Oral; aérea/inhalación; transdérmica
	Bifenilos policlorados (PCBs)	En pinturas y cementos como plastificantes, estabilizadores aditivos en recubrimientos de PVC flexibles, cables eléctricos y componentes electrónicos, reforzantes de plaguicidas, retardantes de la llama, aceites lubricantes, fluidos hidráulicos, adhesivos, suelos de madera, pinturas, agentes de despolvo, compuestos resistentes al agua, fluidos de bomba de vacío, fijadores en microscopía, implantes quirúrgicos y en copias de papel sin carbón.	Oral; aérea/inhalación; transdérmica

Tabla 1. Tipos, composición química, usos y principales vías de exposición de los compuestos químicos revisados.

1.1. Disruptores endocrinos: Fuentes y evidencia de sus efectos sobre la salud reproductiva masculina

Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) se ha utilizado extensamente en la producción de plástico policarbonato, resinas epoxi, recipientes y empaquetamiento para comida, recubrimiento de latas de

conserva, albañilería, barnices, materiales ortopédicos, tintes y como base del composite dental. Se ha encontrado también en alimentos, productos manufacturados y productos farmacéuticos (12, 13). Los seres humanos estamos expuestos a BPA principalmente por ingestión dietaria proveniente de la filtración del recubrimiento interno de las latas de conservas y los envases de microondas durante el proceso de calentamiento de la comida; y a través de refrescos o agua en botellas de policarbonato, debido al uso repetido o el contacto con cualquier sustancia ácida o alcalina (14). El BPA es muy prevalente en nuestro medio ambiente y de hecho, en una muestra representativa de varones del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 Americano, un 93% de la muestras urinarias presentaron concentraciones detectables de BPA, indicando que la exposición es común en la población general de Estados Unidos (15).

El BPA se ha descrito como un compuesto con efectos estrogénicos y antiandrogénicos, en definitiva como un compuesto disruptor endocrino (16). Múltiples estudios experimentales en modelos animales han demostrado que la exposición a BPA tiene diversos efectos sobre el sistema reproductivo masculino, incluyendo la inhibición del desarrollo de los túbulos seminíferos y la espermatogénesis, y la afectación de la calidad seminal (17, 18). También se han incrementado las evidencias, a través de estudios epidemiológicos que muestran la relación entre la exposición a BPA y la calidad seminal, sin embargo, esta asociación sólo se observa a altas concentraciones de exposición a BPA. Concentraciones de BPA de 1,55 ng/ml en varones de parejas potencialmente infértiles podrían influir en el recuento espermático (19), debido a una relación inversa entre las concentraciones de BPA y la concentración de espermatozoides. En un estudio transversal llevado a cabo en una población de 20 varones sanos, los niveles séricos de BPA se correlacionaron positivamente con la movilidad espermática e inversamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (20). Otros estudios han observado que la exposición al BPA durante el desarrollo neonatal podría influir disminuyendo la profase meiótica y aumentando la frecuencia de fallos de recombinación, efecto que perduraría durante la vida adulta una vez que el individuo ya no esté expuesto (21). En un estudio reciente en 360 hombres fértiles, Mendiola y colaboradores (22) mostraron que no existía correlación entre los niveles urinarios de BPA y la calidad seminal, pero sí que el BPA estuvo inversamente relacionado con los niveles del índice de andrógenos libres (FAI). Meeker y colaboradores (23) presentaron hallazgos similares mostrando una tendencia no significativa en el incremento de los niveles de BPA relacionado con la baja calidad seminal. Por último, en un estudio de seguimiento sobre 190 varones de parejas que acudían a una clínica de infertilidad, se mostró que las concentraciones urinarias de BPA no estaban asociadas con los parámetros de calidad seminal, pero sí lo hicieron positivamente con el daño del ADN espermático (24).

Ftalatos

Los ftalatos son compuestos químicos industriales ubicuos que podrían afectar adversamente a la función reproductiva humana. Estas sustancias se dividen en dos grupos dependiendo

del peso molecular y sus diferentes aplicaciones, así como sus propiedades toxicológicas, a saber: a) compuestos con alto peso molecular [di(2-etilhexil) ftalato (DEHP)] y b) compuestos con bajo peso molecular [dietil ftalato, dibutil ftalato (DBP)]. Además, los ftalatos también incluyen tres principales metabolitos del DEHP, como son el mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP), el mono-(2-etilhexil-5-hidroxihexil) ftalato (MEHHP) y el mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato (MEOHP) y uno del DBP, el mono-butil ftalato (MBP). Los ftalatos con alto peso molecular se utilizan como componentes de los plásticos en la manufacturación de productos industriales y comerciales (plástico vinilo flexible, recubrimientos de suelos y paredes o utensilios médicos) (25).

De nuevo, existen evidencias palpables de que la exposición a estas sustancias es ubicua y un gran porcentaje de la población presenta niveles detectables en orina de distintos ftalatos (26). Los ftalatos de bajo peso molecular se utilizan en productos de uso personal (cosméticos, perfumes), como disolventes y también como plásticos para el acetato de celulosa. La exposición a través de la ingesta, inhalación, y el contacto dérmico se consideran como las principales rutas de exposición para la población general. Debido a que no forman parte del polímero, los ftalatos se liberan paulatinamente de la matriz plástica e impregnan los materiales con los que están en contacto. Se ha demostrado su presencia en el medio acuático, desde aguas subterráneas hasta aguas superficiales e incluso de consumo, con una concentración que desde los ng/L hasta los mg/L. También se ha encontrado frecuentemente en alimentos o bebidas empaquetadas en materiales plásticos de los cuales pueden liberarse al alimento y convertirse en una fuente de exposición (12). Tras la exposición, los ftalatos son rápidamente absorbidos en forma de diésteres y metabolizados en el organismo a monoésteres, los cuales son excretados en orina y heces (25). No son compuestos persistentes, pero el mayor inconveniente es la exposición ubicua y continua a dichas sustancias. La medida de las concentraciones urinarias de los metabolitos de los ftalatos se usa como la aproximación más común para su bio-monitorización e investigación en humanos (27, 28). Los ftalatos han demostrado tener una acción antiandrogénica potencialmente alteradora hormonal (25).

Los estudios toxicológicos han mostrado consistentemente que los ftalatos y sus metabolitos son tóxicos reproductivos. Algunos estudios observaron que una exposición al DEHP durante el desarrollo prenatal podría afectar a la expresión de genes involucrados en la espermatogénesis, aumentando la metilación del DNA y disminuyendo el recuento espermático (29). Por otro lado, la exposición perinatal de varones a ftalatos parece asociarse con bajos niveles de andrógenos y menor distancia anogenital (30). Hay evidencias de que la exposición puberal y adulta a DEHP provoca toxicidad testicular y afecta a la espermatogénesis (31).

En la pasada década se ha incrementado el número de estudios epidemiológicos que han investigado las asociaciones entre los metabolitos de los ftalatos y la calidad seminal, pero los resultados no han sido consistentes. Uno de los primeros estudios investigó 168 hombres de parejas infértiles y concluyó que algunos metabolitos específicos de los ftalatos se correlacionaban con una

concentración y movilidad espermática disminuidas. Se mostraron relaciones dosis-respuesta entre el compuesto MBP y los parámetros seminales antes indicados, pero existe una evidencia limitada de las relaciones entre otros metabolitos de ftalatos y la concentración o morfología espermática reducida (32). En un estudio de seguimiento de la misma cohorte de sujetos, los autores mostraron que el mono-benzil ftalato (MBzP), MBP y el MEHP presentaban asociaciones con la movilidad espermática, pero no se encontró relación entre el mono-metil ftalato (MMP) y alguno de los parámetros de movilidad espermática analizados (33). En un reanálisis reciente de esta población de estudio con 463 varones se mostraron de nuevo relaciones significativas dosis-respuesta entre los niveles de MBP y una movilidad y concentración espermática disminuidas (34). Un estudio reciente en 344 varones que presentaban una concentración espermática normal de entre 20-300 millones/ml mostró que los niveles de metabolitos urinarios de ftalatos (MEOHP, MEHP) estaban asociados significativamente con un descenso de la movilidad espermática (35). Sin embargo, diversos estudios han mostrado asociaciones nulas o débiles entre la exposición a metabolitos de ftalatos en varones adultos y una calidad seminal disminuida (36, 33). En un reciente meta-análisis (con 14 estudios) se han evaluado las asociaciones entre los niveles de ftalatos o sus metabolitos y la calidad seminal humana (37). En general, los investigadores informaron de una relación entre la exposición a ciertos ftalatos y una calidad seminal alterada (ej. MBP, MBzP or MEHP), pero también señalaron que hubo varios casos en los que no se evidenciaron asociaciones entre la exposición a otros metabolitos de ftalatos (ej. MMP) y la calidad seminal (27). Con respecto a los niveles de hormonas reproductivas, varios estudios han mostrado una asociación inversa entre los niveles de exposición a metabolitos de ftalatos (DEHP, DBP) y hormonas esteroideas como el estradiol o la testosterona, el FAI y/o el INSL3 (38, 39, 40).

En general, los estudios mencionados anteriormente tienen importantes diferencias metodológicas, incluyendo el rango de edad de los participantes, los distintos tipos de poblaciones estudiadas (varones de parejas infértiles, jóvenes sanos, hombres fértiles, etc.), las diferencias en los métodos analíticos usados para medir los ftalatos (orina vs. suero sanguíneo), o los distintos ajustes estadísticos, lo cual limita claramente la comparación de los resultados e interpretación de los mismos.

Plaguicidas organoclorados

Los plaguicidas organoclorados, principalmente el DDT y su principal metabolito el DDE, son contaminantes ambientales persistentes y ubicuos debido a su gran estabilidad y a su carácter lipofílico (41). En modelos celulares y en estudios experimentales se ha demostrado que el DDT promueve la actividad estrogénica (42). En distintos animales salvajes y ratas de laboratorio se han observado anormalidades reproductivas atribuidas a la exposición a DDT/DDE (43). En humanos, varios estudios epidemiológicos recientes han evaluado la relación entre la exposición a DDT y la salud reproductiva masculina (44, 45). La exposición a este tipo de pesticidas bioacumulables en la placenta durante el desarrollo prenatal, estaría asociada a malformaciones urogenitales como criptorquidia e hipospadias (46). La evidencia

epidemiológica actual sugiere que la exposición a altas concentraciones de DDT tiene relación con la afectación de la calidad seminal. Los estudios en áreas endémicas de malaria, donde el DDT ha sido fumigado repetidamente, muestran una asociación entre concentraciones séricas altas de DDT y pobre calidad seminal. Por ejemplo, el DDT/DDE se asoció negativamente con todos los parámetros clásicos de calidad seminal en una población de estudio surafricana de 311 varones jóvenes en el área endémica de malaria de la provincia de Limpopo (47). Otros estudios también han mostrado que la exposición al DDT afecta adversamente a la calidad espermática, principalmente a su movilidad (44, 45). Sin embargo, esas asociaciones no se han mostrado en otros estudios llevados a cabo en poblaciones con niveles de DDT/DDE relativamente menores (48). Así pues, el DDT puede afectar negativamente a la calidad espermática, especialmente cuando se consideran niveles de concentración altas.

Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OF) son compuestos que se usan para el control de plagas domésticas y actividades agrícolas (49), especialmente desde que el uso del DDT y otros plaguicidas organoclorados decreciera debido a su persistencia y toxicidad. Casi todos los plaguicidas OF se metabolizan al menos a uno de los seis posibles dialquilsulfatos (DAF). A pesar de su amplio uso, sus potenciales efectos sobre la salud reproductiva en varones, así como su mecanismo de acción, no han sido todavía totalmente caracterizados.

Los estudios experimentales en animales -principalmente roedores- han demostrado que los OF pueden afectar a los parámetros seminales y a los niveles de hormonas reproductivas (50). Además, en humanos, también se han mostrado efectos adversos de su exposición crónica, como por ejemplo alteraciones del sistema endocrino y reproductor (51). Un número limitado de trabajos han estudiado la relación entre la exposición a metabolitos de OF (DAF) y alteraciones de la calidad seminal (52, 53) o cambios en los niveles de hormonas reproductivas (49, 52). En general, aunque con la limitación en el número de estudios, se evidencia una posible asociación entre la exposición a plaguicidas OF y la alteración de los niveles hormonales y calidad seminal en varones adultos.

Bifenilos policlorados

Los bifenilos policlorados (PCBs) son un conjunto de sustancias tóxicas sintéticas, persistentes y lipofílicas, que se encuentran en el medio ambiente y se han reconocido como disruptores endocrinos. Los PCBs se usaron en productos industriales y de consumo, tales como los transformadores y fluidos hidráulicos, y como aditivo en pinturas, aceites y materiales de construcción. El uso y la producción de PCBs se prohibió en los años 70, sin embargo, no se ha detectado una bajada significativa de los niveles de estas sustancias en el medio ambiente desde mitad de los años 90 (54). Por tanto, todavía existe un riesgo considerable para la salud humana debido a la exposición a PCBs (55).

Los testículos parecen ser un órgano diana importante para la acción de los PCBs, los cuales pueden alterar la producción y el desarrollo espermático (56). Diversos estudios muestran una asociación inversamente significativa entre los PCBs y la movilidad espermática (57), mientras que su relación con la disminución de la concentración espermática es menos sólida, y sólo parece ocurrir cuando se presentan concentraciones relativamente altas de PCBs. Varones que presentaron niveles séricos de PCBs de 240 ng/g de lípidos y formaban parte de parejas diagnosticadas con infertilidad se asociaron con una concentración espermática disminuida (58). Bonde y colaboradores (59) seleccionaron el hexaclorobifenil (CB-153) como un marcador de congéneres de PCBs y hallaron una relación inversa significativa entre los niveles séricos de CB-153 y la movilidad espermática, y una relación también inversa con la concentración espermática en una subpoblación de estos varones.

1.2. Mecanismos de acción de los CDE sobre el sistema reproductivo masculino

Los compuestos disruptores endocrinos pueden actuar como sustancias estrogénicas, antiandrogénicas y antiestrogénicas, siendo conocidos por su habilidad para competir con los receptores de unión a hormonas esteroideas endógenas. Se ha demostrado que los CDE alteran la esteroidogénesis masculina, lo cual altera las hormonas reproductivas, factor crítico en la espermatogénesis. Estudios recientes proporcionan nuevos indicios acerca de los mecanismos relacionados con el efecto perjudicial de los CDE sobre los parámetros reproductivos masculinos.

En algunas ocasiones, la mezcla de distintos tipos de CDE con diferentes mecanismos de acción pueden mostrar efectos sinérgicos o ser dosis aditivos (60). Además, los CDE también pueden interactuar con las hormonas tiroideas y sus receptores o con el eje hipotálamo-pituitario-gonadal, así como inhibir las enzimas involucradas en la esteroidogénesis, lo que llevaría a una reducción de los niveles de testosterona, FSH y LH (39, 61-63).

El BPA parece inhibir la actividad de los cassettes transportadores de unión al ATP de la membrana celular de los tejidos testiculares, disminuyendo los niveles de hormonas reproductivas como la testosterona (64). El BPA tiene afinidad para unirse a los receptores estrogénicos alfa y beta, de hecho, estudios en modelo animal knock-out para receptores estrogénicos han demostrado que éstos son fundamentales para la espermatogénesis, sugiriendo que los estrógenos juegan un papel importante en el desarrollo testicular y la espermatogénesis (65).

Respecto a otros CDE, los ftalatos por su parte pueden ejercer un efecto directo sobre la estructura de las células de Leydig o Sertoli con una correlación entre los hallazgos de los estudios *in vitro* e *in vivo* (66). Se ha observado que el DEHP altera la función de las células de Leydig y Sertoli durante el desarrollo e inhibe la producción de testosterona (67). Los

metabolitos del DEHP pueden ejercer su acción antiandrogénica a través de la inhibición directa de la síntesis de testosterona en las células de Leydig (68), lo cual se ha propuesto que ocurre a través de una disfunción de la citocromo CYP17 (69). Algunos ftalatos también han demostrado alterar los patrones de expresión génica que regulan la homeostasis lipídica o la actividad insulínica, lo que podría también resultar en una menor síntesis de testosterona (70). Además, ciertos ftalatos podrían interferir con la habilidad de las células de Sertoli para responder a los ligandos endógenos normales de FSH (71). Esto se debe a que el sitio de acción de los ftalatos se encuentra en el emparejamiento del complejo ligando-receptor de la FSH con la proteína G transportadora, que se encuentra en la membrana celular de la célula de Sertoli (71).

Los plaguicidas organoclorados (DDT/DDE) podrían causar un descenso en el transporte de andrógenos testiculares como resultado de una degradación acentuada. El DDT y sus metabolitos pueden inhibir los ligandos endógenos que se unen a los receptores androgénicos y estrogénicos (72).

Los mecanismos de acción de los plaguicidas organofosforados (OF) sobre la función reproductiva masculina aún no se han dilucidado completamente. Uno de los mecanismos que se hipotetizan es que los OF podrían dañar el epitelio seminífero afectando a la proliferación de las células germinales, y por tanto producir una reducción de la producción espermática (74). Por último, los PCBs pueden alterar la función del receptor estrogénico mimetizando el ligando natural y actuando como su agonista (75).

Las evidencias actuales muestran una variabilidad en los hallazgos con respecto a la relación entre la exposición a CDE y la salud reproductiva masculina. Sin embargo esta variabilidad podría explicarse por varias causas: a) muchas de las potenciales relaciones exposición-respuesta descritas aquí no han sido suficientemente exploradas y estudiadas; b) existen diferencias entre los estudios, incluyendo diferencias en el tamaño muestral, diseño y poblaciones de estudio, análisis estadísticos, estrategias para obtener los datos de exposición a CDE, y/o importantes co-variables a tener en cuenta, aunque estas limitaciones suelen ser inherentes a los estudios epidemiológicos. Por ejemplo, los seres humanos no estamos expuestos exclusivamente al tóxico o contaminante estudiado, sino a una mezcla de compuestos químicos (el llamado efecto cóctel), algunos de los cuales actúan a través de rutas similares. Además, ningún compuesto individual puede actuar como marcador del resto, puesto que el perfil de contaminantes varía entre individuos. Por ejemplo, distintas sustancias químicas podrían presentar diferentes perfiles tóxico cinéticos.

Los estudios realizados hasta la fecha proporcionan un mejor entendimiento del impacto de la exposición a CDE sobre la salud reproductiva masculina junto con los posibles mecanismos. Sin embargo, son necesarios muchos más análisis para dilucidar si estos hallazgos son concluyentes. En general, podemos señalar la necesidad de:

- a. estudios epidemiológicos longitudinales bien diseñados en cohortes de varones de distintas poblaciones, pero que no se limiten al análisis de la calidad seminal, puesto que ésta podría no ser el mejor biomarcador de la función testicular o la fertilidad humana.
- b. desarrollar métodos para estudiar mejor las mezclas de CDE, tales como la exposición a múltiples ftalatos a diferentes concentraciones y cómo podrían actuar entre sí, de forma aditiva, sinérgica, o incluso antagonista, ya que los datos sobre valoración de la exposición en humanos no apoya uniformemente la toxicidad de estos compuestos a concentraciones ambientales.
- c. nuevas aproximaciones químicas y bioquímicas dirigidas al mejor entendimiento de los mecanismos de acción (estrogénica y antiandrogénica) con respecto a efectos a bajas dosis (exposición medioambiental), tales como la transmisión de la señal vía membrana y receptores estrogénicos nucleares; y mejoras en química analítica para determinar estos compuestos y sus metabolitos en distintos tejidos.
- d. los humanos estamos expuestos a distintos tóxicos y contaminantes que actúan por diferentes vías en distintos momentos de nuestro desarrollo, lo cual es importante para el estudio de las interacciones entre los compuestos, puesto que varios de ellos podrían actuar a través de un ruta común y compuestos individuales podrían actuar por diferentes rutas.
- e. identificar y valorar los factores de susceptibilidad que pudieran incrementar el riesgo de eventos adversos en la salud reproductiva humana tras la exposición a CDE.

2. Distancia anogenital como biomarcador del medio ambiente hormonal prenatal en varones

Autores: **Jaime Mendiola y Silvia Sahuquillo**

Resumen

Durante los últimos veinte años, los estudios experimentales en roedores han demostrado que la distancia anogenital (DAG) es un reflejo de la androgenicidad del medio ambiente hormonal en útero, y se correlaciona con características anatómicas, fisiológicas y comportamentales dependientes de andrógenos en la edad adulta. Los ftalatos (compuestos disruptores endocrinos con actividad antiandrogénica) y otras sustancias tóxicas medioambientales se ha mostrado que pueden causar alteraciones en la DAG masculina. Esta medida sólo se ha explorado muy recientemente en humanos y las evidencias de su posible relación con exposiciones prenatales todavía son limitadas. En este capítulo se resumen los datos actuales que existen sobre la relación entre DAG y la salud reproductiva del varón adulto, incluyendo calidad seminal, hormonas reproductivas y alteraciones del tracto reproductivo masculino. Aunque los estudios son muy limitados, en general los datos sugieren que las exposiciones prenatales a tóxicos capaces de menguar el nivel de andrógenos podrían acortar la DAG, así como también afectar concomitantemente a los parámetros reproductivos masculinos. Así pues, la DAG en varones podría ser un biomarcador sensible del medio ambiente hormonal intraútero, pero se necesitan más estudios para esclarecer la importancia de las ventanas de exposición prenatales y también su posible modificación por influencias endógenas.

Introducción

La distancia anogenital (DAG), la distancia desde los genitales al ano, es un dimorfismo sexual en mamíferos placentarios (1-5). La DAG es andrógeno dependiente y en los varones presenta casi el doble de longitud que en las féminas (2-4, 6, 7).

Las dos variantes de DAG que suelen medirse en varones son las siguientes: la primera se mide desde la inserción proximal superior del pene en el abdomen al centro o límite superior del ano (AGDAP; Figura 1, punto 1 a punto 3); la segunda medida se toma desde la base inferior (primer pliegue) del escroto al centro o límite superior del ano (AGDAS; Figura 1, punto 2 a punto 3). Ambas mediciones se suelen realizar con un pie de rey digital y la posición para tomarlas debe

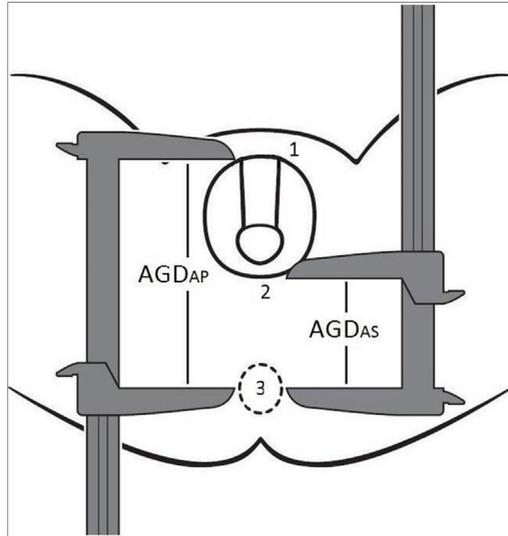


Figura 1. Referencias anatómicas para las dos medidas de distancia anogenital (DAG o AGD en inglés): AGD_{AP} desde la inserción proximal superior del pene en el abdomen al centro del ano (punto 1 a punto 3); y AGD_{AS} desde la base inferior (primer pliegue) del escroto al centro del ano (punto 2 a punto 3). Adaptado con permiso de Sathyanarayana *et al.* (2010).

ser siempre la misma. Hasta el momento se han usado dos posiciones principales para tomar estas medidas, a saber: usando la posición de litotomía, con los muslos a 45° sobre la mesa de exploración (8) o la posición de “ancas de rana”, es decir, en decúbito supino con las plantas de los pies juntas y las rodillas separadas para exponer la zona perineal (9).

Para aumentar la precisión de las medidas se recomienda tomar dos-tres medidas repetidas por cada examinador (variabilidad intraobservador) y prestar atención si existe más de un examinador para tener en cuenta y calcular la variabilidad interobservador. Por último, se ha sugerido recientemente que los investigadores deberían estandarizar las técnicas para valorar las DAGs y llevar a cabo trabajos más en profundidad en diferentes poblaciones de estudio (10,11). No se ha encontrado en la bibliografía una medida estándar de la DAG, ya que ésta depende de las medidas antropométricas (altura y peso). En la Tabla 1 se muestran las medidas del estudio de Parra y colaboradores (12) para la DAGAS y DAGAP en jóvenes universitarios del sureste español.

Estudios experimentales en animales han demostrado que la DAG se determina en el útero y persiste durante toda la vida adulta (13). No obstante, recientemente se ha descrito que la DAG en ratas adultas podría mostrar cierto grado de plasticidad, lo que podría estar

	Media	Desviación típica	Mediana
Edad (años)	20,0	1,3	20,0
Altura (cm)	177	7,1	178
Peso (kg)	75,7	11,9	75,1
IMC (kg/m ²)	23,9	3,4	23,7
DAGAS (mm)	48,3	11,6	47,8
DAGAP (mm)	128	12,0	127

Tabla 1. Medidas de DAG en jóvenes universitarios del sureste español (adaptación de Parra et. al., 2015) (12).

modulado por la acción local de estrógenos/andrógenos (14). En roedores y otros mamíferos, la DAG refleja la cantidad de andrógenos a la que ha estado expuesto el feto masculino en el desarrollo temprano durante la ventana crítica de masculinización para el crecimiento genital (15), y una exposición prenatal más alta a andrógenos resulta en una DAG más alargada y masculinizada (16). Por tanto, la DAG serviría como una lectura-resumen de la actividad androgénica prenatal.

En roedores se ha comprobado que las exposiciones prenatales a distintos compuestos disruptores endocrinos generan disminución de la DAG, hipospadias y criptorquidia (17,18). En humanos, sustancias tales como los ftalatos (19-22), el DDT y sus metabolitos, las dioxinas o el bisfenol A (23-26) se han relacionado con un acortamiento de la DAG en niños. Además, los niños (y hombres) con hipospadias y/o criptorquidismo presentan una DAG acortada (27-30). Estos datos sugieren que las exposiciones prenatales a tóxicos capaces de menguar el nivel de andrógenos podrían alterar el sistema y tracto reproductivo masculino, incluyendo la DAG. Por último, también deberíamos tener en cuenta los factores y características prenatales maternas (hormonas endógenas, estrés, etc.) que podría modificar la acción de estos compuestos hormonalmente activos sobre la DAG (31). Actualmente se están realizando estudios tanto en bebés como en varones adultos para relacionar la DAG y el ratio 2D:4D, que es otro marcador de exposición prenatal ya conocido (32,33).

2.1. Distancia anogenital y su relación con la salud reproductiva masculina

Calidad seminal

Son escasos los estudios que han explorado la relación entre la DAG y la calidad seminal en humanos. En estudiantes universitarios varones residentes en Rochester (NY, EE.UU.) se ha mostrado que una DAG (ano-escroto) acortada estaba asociada con una calidad

seminal disminuida, incluyendo la concentración, recuento total, movilidad y morfología espermática (8). Además, una DAG alargada se ha asociado con la paternidad (e.g. historia previa de paternidad vs. varones infértiles), y con una mayor concentración espermática en varones americanos que acudían a una clínica urológica (9). De modo similar, recientemente, Mendiola y colaboradores (34) han mostrado que la DAG estaba positivamente asociada con la concentración y recuento espermático en varones de parejas potencialmente infértiles que acudían a un servicio de reproducción. Sin embargo, la DAG no se ha visto asociada con ningún parámetro espermático en jóvenes varones universitarios del sureste español (12), pero en este caso el recuento espermático y su distribución fue significativamente menor en comparación con otras poblaciones similares (35), lo cual podría influir a la hora de hallar asociaciones con la DAG. En un estudio realizado por Eisenberg y colaboradores en 2014 (36) en el que estudiaron a 473 varones observaron que la concentración espermática, el recuento espermático total y la motilidad espermática era mayor en aquellos varones que presentaban una DAG mayor.

Con respecto a aspectos moleculares, en trabajos previos se ha visto que unas longitudes de repeticiones CAG más largas se asocian con un disminución de la función del receptor androgénico (AR) (37). Eisenberg y colaboradores (38) exploraron la relación entre la DAG y la longitud de las repeticiones CAG del receptor de andrógenos en un estudio transversal con 195 varones que acudían a una clínica urológica. Los autores comprobaron que, en una subpoblación del estudio, aquellos varones con unas longitudes de repeticiones CAG más largas presentaban una DAG significativamente más corta comparada con aquellos varones con unas longitudes de repeticiones CAG más acertadas.

Hormonas reproductivas

Hasta donde conocemos sólo existen dos trabajos donde se hayan estudiado las relaciones entre la DAG y los niveles séricos de hormonas reproductivas en varones adultos. Eisenberg y colaboradores (39) han mostrado una relación positiva entre la DAG y los niveles de testosterona sérica -pero no con otras hormonas reproductivas como la FSH, LH o el estradiol- en varones americanos que acudían a una clínica urológica. Sin embargo, Parra y colaboradores (12) no encontraron ninguna asociación entre las DAGs y los niveles séricos de ninguna de las hormonas reproductivas investigadas, incluyendo la testosterona o el estradiol.

Alteraciones del tracto reproductivo masculino

Los niños y varones adultos con hipospadias y/o criptorquidismo presentan una DAG acertada en comparación con los que no presentan estas anomalías del tracto reproductivo (27-30). Además, también se ha mostrado que una DAGAP alargada se asocia con un menor riesgo significativo de padecer cáncer de próstata, con una odds ratio (OR) ajustada de 0,83 (IC95%: 0,70-0,99, p-valor: 0,03) por cada 5 mm de incremento en la DAGAP (40).

Diversos trabajos de Eisenberg y colaboradores (41,42) han revelado que la DAG estaría asociada con alteraciones del tracto reproductivo masculino en varones adultos. Todos estos estudios se realizaron en varones americanos que acudían a una clínica urológica por distintas razones como infecciones, problemas andrológicos relacionados con infertilidad, disfunción eréctil, vasectomías, etc. Por ejemplo, el equipo de trabajo de Eisenberg y colaboradores (41) investigó si la DAG podría ser distinta entre varones con azoospermia obstructiva (OA) y azoospermia no obstructiva (NOA), hallando que los varones con NOA presentaban una DAG significativamente más corta de los varones con OA (DAG: 36,3 vs. 41,9 mm, p-valor: 0,01). Por tanto la DAG podría proporcionar una nueva medida para valorar la función testicular masculina y distinguir entre varones con NOA y OA. En otro trabajo, Eisenberg y colaboradores (42) estudiaron la relación entre la DAG y la eficacia de la reparación del varicocele en una población de estudio similar a la arriba indicada. A este respecto se sabe que cerca del 30% de los varones no presentan mejora de los parámetros seminales tras la varicolectomía y es por tanto difícil valorar qué pacientes tendrían más probabilidad de beneficiarse de la reparación quirúrgica. Los resultados obtenidos fueron que los varones con una DAG más larga presentaban una probabilidad significativamente mayor de mejorar sus parámetros seminales tras la varicolectomía comparado con aquellos que tenían una DAG acortada. De nuevo, los autores sugieren que la DAG podría permitir a los urólogos aconsejar mejor a los varones sobre la potencial eficacia de la reparación del varicocele. Así pues, la DAG en varones podría ser un biomarcador sensible del medio ambiente hormonal prenatal, pero en general es patente que el uso de la DAG es todavía escaso y son necesarios muchos más estudios para obtener más datos y alcanzar una conclusión definitiva con respecto a su posible uso clínico.

3. Principales marcadores de contaminación atmosférica que podrían afectar a la calidad seminal

Autores: B Jacquemin, MJ Lázaro, S Sahuquillo, Rafael Lafuente y Sara Atienza de Nava

Resumen

El estilo de vida actual, el aumento de población en las ciudades, el exceso de empleo de combustibles fósiles, así como la gran industrialización, han dado lugar al incremento de la contaminación del aire y a una mayor exposición a contaminantes atmosféricos. La contaminación atmosférica está asociada a un aumento de la mortalidad y morbilidad, a enfermedades respiratorias y cardiovasculares, a cáncer y a una disminución de los parámetros de salud perinatal. También parece tener un efecto negativo sobre la fertilidad y más específicamente sobre la calidad seminal.

Hay contaminantes que persisten como el dióxido de nitrógeno, partículas en suspensión y ozono que son una amenaza para la salud. Existe una amplia legislación al respecto que se ha ido adaptando según el nivel de conocimiento adquirido a lo largo de los años. Desde la Agencia Europea de Medioambiente (AEMA) se intentan identificar y abordar las causas subyacentes de la presencia de estos contaminantes para ayudar en la implementación de una política de calidad del aire. Se han buscado formas eficaces de aplicación de la política ambiental, aunque la dificultad intrínseca de aplicar ciertas medidas medioambientales depende en ocasiones de particularidades de las distintas regiones, lo que dificulta la aplicación de dichas medidas.

En este capítulo se resume la evidencia existente tanto en estudios experimentales como epidemiológicos que han buscado una asociación entre la contaminación atmosférica y la calidad seminal. Asimismo, se da una visión de la situación actual en cuanto al cumplimiento de la normativa europea y la dificultad que existe en disminuir los efectos de los diferentes contaminantes.

Introducción

Es un hecho que la calidad seminal de los varones está empeorando con el paso del tiempo, tanto es así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha modificado en varias ocasiones los valores de lo que se considera un seminograma normal (1).

Las causas del empeoramiento de la calidad seminal son objeto de discusión. Uno de los factores que podría estar influyendo en esta pérdida de calidad es la contaminación atmosférica. Existen una gran cantidad de artículos científicos que han puesto de manifiesto que la contaminación atmosférica tiene efectos negativos en la salud, influyendo sobre la mortalidad, las enfermedades respiratorias y/o cardiovasculares y la salud perinatal (2-7). El sistema reproductor masculino y la espermatogénesis se podrían también ver afectados por los contaminantes atmosféricos. Estos pueden alterar el normal funcionamiento del organismo a través de mecanismos inflamatorios o de estrés oxidativo.

La relación entre la contaminación atmosférica, la fertilidad y la calidad seminal es un tema todavía poco explorado. Presenta dificultades a la hora de realizar estudios debido a la complejidad en la medición de la exposición a los contaminantes y a la gran variabilidad intra-individual en cuanto a la capacidad de detoxificarlos (8, 9). A lo largo de este capítulo se expone lo que se sabe hasta la fecha sobre este tema.

3.1. Principales contaminantes atmosféricos

La contaminación atmosférica se define como la modificación de las características naturales de la atmósfera debido a agentes químicos, físicos o biológicos. Estos agentes se emiten a la atmósfera por causas naturales (i.e. erupciones volcánicas, incendios forestales, etc.) o por causas antropogénicas. La contaminación atmosférica supone un problema de salud sobre todo en áreas urbanas, donde las principales fuentes antropogénicas son la industria, el tráfico automotriz, la combustión casera (calefacción) y los incineradores. Actualmente en España, la fuente principal de contaminación es el tráfico, y es de particular importancia ya que 3 de cada 5 personas viven en una zona urbana y se calcula que en 2025 serán 4 de cada 5 (10).

Se identifican dos grandes grupos de contaminantes ambientales, los gases y la materia particulada (PM). Los gases que se han asociado con efectos negativos en la salud son el monóxido de carbono (CO), los óxidos de nitrógeno (NO_x) que son la suma del dióxido nitroso (NO_2) y del monóxido nitroso (NO), el dióxido de azufre (SO_2) y el ozono (O_3). La fuente principal de CO y NO_x es el tráfico, la del SO_2 es la industria y el O_3 resulta de la fotooxidación del NO_x . La materia particulada respirable es la materia que se encuentra en la atmósfera de forma sólida o líquida (polvo, ceniza, polen, metales...). Su concentración puede depender de la época del año. Se diferencian en tres grupos según su diámetro aerodinámico, PM_{10} (diámetro $\leq 10 \mu\text{m}$ que penetran hasta los bronquios), $\text{PM}_{2.5}$ (diámetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$ que penetran hasta los alveolos) y $\text{PM}_{0.1}$ o partículas ultrafinas (UFP) (diámetro $\leq 0.1 \mu\text{m}$ que penetran hasta el torrente sanguíneo).

El NO_2 , las $\text{PM}_{2.5}$ y las UFP son buenos indicadores de la contaminación atmosférica derivada del tráfico automotriz. Los principales mecanismos por los que causan efecto en la salud son el estrés oxidativo y la inflamación, ya sea sistémica o local. Dentro de la PM se identifican multitud de elementos con efectos nefastos sobre la salud, como los

hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) que incluyen varios disruptores endocrinos, el carbono y algunos metales (plomo, cadmio, sílice, vanadio, etc.).

3.2. Estudios en modelo animal

Pocos estudios han buscado el efecto de la exposición a la contaminación atmosférica en la calidad espermática. Mohallem (11) encontró que una concentración moderada de contaminación afecta a la salud reproductiva de las hembras de ratón pero no a la calidad espermática. Watanabe (12) demostró que las partículas emitidas por motores diésel (DEP) estimulan la secreción hormonal, disminuyen la GnRH e inhiben la espermatogénesis en ratas. Este mismo autor, en otra publicación en 2005 (13), observó que existía una diferencia significativa en la producción de espermatozoides, espermátidas y células de Sertoli entre el grupo control, expuesto a aire limpio, y el grupo de ratones expuestos a emisiones DEP. Siguiendo esta misma línea, Ono (14) observó que una exposición in útero en ratones provocaba efectos dañinos en la espermatogénesis de la descendencia. Pires (15) observó en ratones el efecto de la exposición pre y post-natal a ambientes con una elevada presencia de $PM_{2.5}$ concluyendo que se ve afectada la espermatogénesis por daño en la producción espermática.

Para concluir, los pocos estudios publicados en modelo animal apuntan hacia un efecto negativo de la calidad espermática en ratones.

3.3. Estudios en varones

Una quincena de estudios se han publicado buscando una asociación entre la exposición a la contaminación atmosférica y la calidad seminal. Los parámetros seminales más estudiados fueron el recuento de espermatozoides, la movilidad, la morfología y la fragmentación del ADN.

Srám (16) fue pionero en esta temática en la Republica Checa. Realizó varios estudios en sujetos sanos con medidas repetidas o estudios de casos y controles, y sus resultados más relevantes fueron que el aumento de la contaminación atmosférica estaba asociado a una peor movilidad y a un aumento de la fragmentación del ADN. Posteriormente, Rubes y colaboradores realizaron varios estudios en varones normozoospermicos en los que observaron una asociación entre la exposición a contaminantes atmosféricos y el incremento en el porcentaje de fragmentación de ADN y el número de espermatozoides inmaduros (8, 9 y 17). De hecho, la mayoría de los estudios que buscaron los efectos de la exposición a la contaminación sobre la fragmentación encontraron resultados significativos (18-21).

En esta línea de asociación entre la contaminación ambiental y el daño en el contenido genético, Jurewicz y colaboradores encontraron relación entre algunos contaminantes atmosféricos como el $PM_{2.5}$ o PM_{10} , y la presencia de aneuploidías en semen de varones normozoospermicos que habían acudido a clínicas de fertilidad en Polonia (22).

En cuanto a la movilidad, los resultados no son tan claros. Aunque varios estudios encontraron disminución de la misma (18, 20, 21, 23, 24, 25), como por ejemplo, Boggia (24) que observó una relación negativa entre la movilidad espermática y la exposición a elevadas concentraciones ambientales de NO_x , otros, en cambio, no encontraron asociación con la movilidad, aunque sí con la morfología (17, 26, 27).

Un estudio que cabe destacar es el de Hammoud, que incluye 1700 muestras de semen de pacientes que acudían a inseminación o FIV, y encontraron una correlación negativa entre la concentración de $\text{PM}_{2.5}$ y la movilidad espermática, cuya disminución persistía 2-3 meses después de la exposición (25).

Los resultados en cuanto al recuento espermático son similares. La mayoría de los estudios que buscaron alguna asociación entre la contaminación atmosférica y el conteo espermático no encontraron ninguna (17, 18, 24-26, 28), aunque hay algunos que sí reportaron una disminución significativa (20, 21, 23, 27).

Respecto a la morfología, también existe controversia; algunos autores encuentran relación entre la contaminación producida por el tráfico y la morfología, reportando mayor proporción de formas atípicas (18, 21, 23, 25, 28), mientras otros no encuentran relación (17, 26). Un estudio interesante, aunque no directamente asociado con el tráfico automotriz es el de Faure (29) que relacionó la calidad seminal con la concentración de dioxinas en el ambiente de la población cercana a una planta de incineración. Los autores observaron que a medida que incrementaba el tiempo desde el cierre de las chimeneas de la planta mejoraba la morfología espermática, más concretamente, disminuía la proporción de anomalías de la pieza intermedia y disminuía el TZI (índice de teratozoospermia). Radwan y colaboradores, observaron una asociación entre distintos contaminantes atmosféricos y disminución de espermatozoides morfológicamente normales, disminución de los niveles de testosterona y aumento del número de células con cromatina inmadura (30).

Meta-análisis como el de Deng (31) muestra una comparación de la calidad seminal teniendo en cuenta el volumen, la concentración, la movilidad y la morfología, entre el grupo de varones de alta exposición y el grupo de baja exposición a distintos gases contaminantes como SO_2 , NO_x , PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$ u ozono. En este meta-análisis, se concluye que no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros seminales entre ambos grupos, pero sí una tendencia a la afectación de la calidad espermática en casos de exposición crónica a alto nivel de gases contaminantes.

Otro meta-análisis de interés es el realizado por Fathi Najafi (32), en el que observó que metales pesados como el plomo (Pb), el cadmio (Cd) o el mercurio (Hg) pueden afectar a la espermatogénesis y al eje hipotálamo-hipófisis-testicular, que causarían cambios en los niveles de LH y FSH, los cuales podrían afectar a los parámetros espermáticos. De

esta manera, dichos metales pesados estarían relacionados con una disminución en la movilidad y la morfología, así como con cambios en el ADN espermático. Sin embargo, este mismo meta-análisis nos indica que hay autores como Inhorn o El-Zohairy que no encuentran dicha asociación. Por otro lado, Fathi Najafi (32) también observa que el O₃ podría inducir aumentos en la fragmentación de ADN espermático vía estrés oxidativo.

El Pb y el Cd son probablemente los dos metales pesados más prevalentes que afectan a la calidad seminal. La concentración Pb en el medio ambiente se controló desde el uso de gasolina sin plomo, pero el de Cd ha seguido aumentando durante las últimas décadas debido al uso en exceso de los derivados del petróleo, la industrialización y el tabaquismo. La exposición a dichos metales tiene lugar a través de agua, comida o aire contaminados, y una vez absorbidos, se depositan en los huesos, riñones y órganos reproductores.

Wijesekara (33) realizó un estudio en el que diferenciaba si el tipo de exposición a dichos metales era ambiental u ocupacional, comparándolos en ambos casos con individuos no expuestos. En este estudio se observa una relación inversa entre la distancia al área de exposición ambiental o el nivel de exposición ocupacional con la concentración de Pb o Cd, observándose a su vez, que los individuos de exposición ambiental mostraban mayores concentraciones de Pb, mientras que los de exposición ocupacional mostraban mayores concentraciones de Cd. Este grupo observa la existencia de diferencias significativas en distintos parámetros seminales entre los individuos expuestos y los no expuestos, tanto en varones normozoospermicos como en los no-normozoospermicos, sugiriendo que el Pb y el Cd afectan a la espermatogénesis y la esteroidogénesis testicular, y causan alteración en el balance pro-oxidantes/ anti-oxidantes que desembocaría en daños por ROS.

Taha (34) estudió la concentración de Pb y Cd en plasma seminal de varones con oligo y/o astenozoospermia idiopática en comparación con varones fértiles control, y observó que al menos la mitad de los casos de infertilidad masculina idiopática podría atribuirse a exposiciones ambientales u ocupacionales a Cd y Pb.

Finalmente, los resultados de los diferentes estudios mencionados anteriormente son poco comparables entre sí ya que incluyen poblaciones diferentes (por ejemplo, donantes de semen, hombres sanos o pacientes de clínicas de reproducción asistida) y contaminantes diferentes. Además, la mayoría de los estudios estiman la exposición a la contaminación de manera ecológica. Por todo ello, es difícil sacar una conclusión clara al respecto.

3.4. Posibles mecanismos

Los contaminantes pueden afectar a la calidad espermática directamente, ya sea por la inflamación y el estrés oxidativo que causan a nivel testicular, o indirectamente actuando como disruptores endocrinos (elementos de los PM).

Los HAP pueden afectar tanto al eje hipotálamo-pituitaria como a la espermatogénesis a nivel testicular, lo que puede generar alteraciones espermáticas (35, 36).

Los DEP pueden generar sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Un exceso de ROS genera daño oxidativo en las células y, a nivel testicular se traduce en un posible daño en las cadenas de ADN (37), así como un menor recuento espermático y una disminución de la movilidad (38). Dentro de estas sustancias algunas de ellas presentan actividad estrogénica, antiestrogénica y antiandrogénica.

De todos los parámetros espermáticos, la fragmentación de ADN es el que presenta mayor consenso entre los autores. Los contaminantes ambientales presentes en el aire están asociados a un incremento del estrés oxidativo lo que conlleva un incremento de ROS y con ello un incremento de la fragmentación de ADN espermático.

Varios estudios realizados por Rubes (8, 9) establecen que distintos polimorfismos genéticos muestran diferente respuesta a la toxicidad de los contaminantes ambientales, concretamente la susceptibilidad del ADN espermático a fragmentarse en función de la exposición a dichos contaminantes. Con ello se observa que además de la diferente exposición a la contaminación atmosférica, existe una variabilidad interindividual en la capacidad de detoxificar, y por consiguiente, en el daño espermático. La fragmentación de ADN espermático es uno de los marcadores de la apoptosis a nivel espermático. Este parámetro es de particular importancia ya que se ha relacionado con problemas de fertilidad y con fallos en los tratamientos de fecundación in vitro, incluyendo, bajas tasas de fecundación, mala calidad embrionaria, fallos de implantación y abortos (39-42).

3.5. Situación actual de la normativa europea medioambiental

Se calcula que hasta el 90% de la población urbana de la unión europea está expuesta a alguno de los contaminantes atmosféricos más perjudiciales que la OMS considera nocivos para la salud. Y no sólo afecta en términos de salud, los efectos de la contaminación medioambiental están muy ligados a nuestra economía (43-44). El director de la AEMA, Hans Bruyninckx, afirma que la contaminación atmosférica provoca daños a la salud humana y a los ecosistemas, y que una gran parte de la población vive en ambientes no saludables. Para ser sostenible, Europa debe mostrarse ambiciosa e imponer requisitos legislativos más estrictos.

Durante el año 2015 se ha dado a conocer el informe de evaluación que se realiza cada cinco años por la Agencia Europea de Medio Ambiente (45). SOER 2015 es un informe integral sobre el medio ambiente en Europa que también incluye evaluaciones y datos de ámbito global, regional y nacional, así como comparaciones entre distintos países. No cabe duda que las políticas europeas llevadas a cabo hasta ahora han generado beneficios

sustanciales en la calidad del aire, del agua y en el reciclaje de residuos, pero estamos lejos de alcanzar el objetivo de 2050 de “vivir bien, respetando los límites de nuestro planeta”, como establece el Séptimo Programa de Acción en materia de Medio Ambiente (46). Vamos a necesitar políticas más ambiciosas para alcanzar la visión de Europa a largo plazo para 2050. En el programa también se resumen unos objetivos a corto plazo (2020) y a medio plazo (2030).

La definición de “vivir bien”, va encaminada a respetar los límites del planeta como objetivo a largo plazo y tener un trabajo digno con ingresos suficientes que permitan el acceso a bienes y servicios. En el sentido físico de la pregunta, vivir bien se relaciona con la vida sana, sin enfermedades, tensiones ni ruidos y con acceso a aire y agua limpia (43).

Hay evidencias de que la continua degradación del ecosistema pone en peligro la producción económica y nuestro bienestar. La biodiversidad sigue deteriorándose, la conservación de especies y hábitats protegidos es desfavorable en más de un 60% y 77% de los casos respectivamente. La biodiversidad marina y costera es un área de especial preocupación: deterioro del lecho marino, contaminación, especies invasoras y acidificación. Además se espera que los efectos del cambio climático intensifiquen las presiones y los impactos de los efectos de la contaminación medioambiental (45).

En el área de la salud y el bienestar, las políticas medioambientales han producido una mejora en la calidad del agua potable y de baño, y se ha reducido la exposición a los principales contaminantes peligrosos. La contaminación atmosférica y acústica sigue provocando graves problemas de salud, especialmente en las zonas urbanas. En el 2011, en la UE se atribuyeron a las partículas finas (PM_{2.5}) unas 430.000 muertes prematuras, a las que hay que sumar las 10.000 muertes prematuras por enfermedades coronarias y accidentes cerebrovasculares, debidas a la exposición al ruido ambiental. Se calcula que los niveles elevados de partículas en suspensión en la UE reducen la esperanza de vida en torno a 8 meses (45, 47).

Hay un aumento de sustancias químicas en los productos de consumo, que se han asociado a un incremento constatado de enfermedades y trastornos endocrinos en humanos (45). Muchos de estos trastornos podrían estar directamente relacionados con problemas de fertilidad. El daño para la salud y el medio ambiente se calcula que tiene unos costes para la Unión Europea de 100.000 millones anuales.

Actualmente, Europa no realiza las políticas necesarias para cumplir su compromiso de detener la pérdida de biodiversidad antes del 2020. Otra iniciativa acordada por todos los países de la Unión Europea es la reducción de la emisión de gases invernadero en 80-95% antes del 2050. Aunque desde 1990 la emisión de gases invernadero ha disminuido un 19%, la producción económica ha aumentado un 45%. Otro punto positivo destacado en este informe

es que ha disminuido el consumo de combustibles fósiles (aunque siguen representando las $\frac{3}{4}$ partes del suministro de energía), se están generando también menos residuos y hay un aumento considerable del reciclaje de forma generalizada en todos los países.

Por otro lado, más de $\frac{1}{3}$ de las zonas de seguimiento de la calidad del aire rebasan los límites correspondientes a las partículas en suspensión (PM_{10}) y $\frac{1}{4}$ superan los límites de NO_2 . Esto ha llevado a que se inicien procedimientos sancionadores por superar los límites de partículas en suspensión en 17 estados miembros (48). La lluvia ácida (acidificación) ha disminuido en los últimos años, en parte, gracias a la aplicación de la legislación de la UE sobre las emisiones de azufre de grandes instalaciones de combustión (48).

Los vehículos diésel ligeros son una de las principales fuentes de emisión de NO_2 , y dentro de los estados miembros esta es una de las emisiones que más incumple la legislación, siendo a veces 5 veces superior al límite establecido. En recientes reuniones se ha acordado su cumplimiento total por parte de los países miembros antes del año 2020 (48). Una forma de cumplir los niveles establecidos es la de promover una movilidad urbana sostenible para resolver los problemas de transporte, o incluso prohibir o limitar la circulación de dichos vehículos en las ciudades más afectadas.

Aunque actualmente se aplique la legislación vigente en la UE, el impacto negativo sobre la salud humana sólo se reducirá en torno a un $\frac{1}{3}$ de aquí al 2025. Y los gastos sanitarios producidos por la contaminación sólo se reducirán un 30% en 2025 y en torno a un 35% en 2030 (48).

Pese a los logros conseguidos, la contaminación atmosférica es la primera causa medioambiental de mortalidad prematura en la UE, responsable de 10 veces más muertes que las provocadas por accidentes de tráfico. En 2010 causó más de 400.000 muertes prematuras y un número de enfermedades muy alto, especialmente afecciones respiratorias (como asma) y problemas cardiovasculares. En el ámbito sanitario los costes producidos por la contaminación atmosférica se sitúan entre 330.000-900.000 millones de euros. En cuanto a otros daños directos, como la pérdida de productividad laboral, en el 2010 se valoraron en 23.000 millones de euros al año (48).

Cada estado miembro es responsable de resolver los problemas localizados en su región, mejorando la movilidad urbana sostenible y la regulación del acceso de vehículos a zonas urbanas. También se están desarrollando indicadores que permitan a la población seguir los avances en materia de reducción de la contaminación atmosférica, y tener conocimiento sobre las emisiones reales de los vehículos.

Tal como remarca el director de la AEMA, “la realidad es que continuamos dañando los sistemas naturales que sustentan nuestro bienestar. Y aunque vivir respetando los límites

de nuestro planeta supone un gran reto, los beneficios que se desprenderán de ello serán enormes. Si utilizamos todo el potencial de Europa para innovar, podremos llegar a ser verdaderamente sostenibles y ponernos a la cabeza en materia de ciencia y tecnología, mediante la creación de nuevas industrias y de una sociedad más sana”.

El informe SOER 2015 destaca, por tanto, la necesidad de políticas más ambiciosas para alcanzar la visión de Europa para 2050. Es complicado modificar sistemas de producción y consumo que además suponen puestos de trabajo, y cambiar estos sistemas va a generar costes elevados. El informe concluye que ni siquiera aplicando todas las políticas en vigor existentes, ni aumentando la eficiencia de los sistemas de producción, será suficiente para alcanzar la visión de Europa para 2050 (46).

3.6. Perspectivas de futuro

Si el informe SOER 2015 sirve para tener una visión de la situación actual, mirando al futuro no cabe duda que serán necesarias políticas más ambiciosas, junto con un mayor conocimiento e inversiones más inteligentes con el fin esencial de transformar sistemas clave como la alimentación, la energía, la vivienda, el transporte, la economía, la salud y la educación. Serán necesarias estrategias y perspectivas cuyo propósito sea mitigar las presiones y evitar daños potenciales, restaurar ecosistemas, corregir desigualdades socioeconómicas y adaptar las tendencias globales, como el cambio climático y el agotamiento de los recursos.

Según Bruyninckx, director de la AEMA: «Nos quedan 35 años para asegurarnos de que en 2050 viviremos en un planeta sostenible. Puede que parezca un futuro lejano, pero si queremos lograr nuestro objetivo, hemos de actuar ya. Necesitamos que nuestras acciones e inversiones sean aún más ambiciosas y coherentes. Muchas de las decisiones que se tomen hoy, determinarán nuestras vidas en 2050.»

No cabe duda que la industria medioambiental, en la que se busca la utilización de tecnologías limpias, ha crecido de forma espectacular en los últimos años, y en España supone ya el 1,6% del PIB. Estas nuevas legislaciones han creado oportunidades en el mundo de la innovación de tecnologías verdes, desarrollando un nuevo sector laboral especializado en ello, ayudando a una reducción de la contaminación y mejorando el comportamiento ambiental en las grandes industrias (48). Este dato hace ser algo más optimistas, pero en el futuro se van a necesitar medidas más concretas.

Mediante la Directiva Europea sobre la Calidad del Aire se pretende desarrollar un calendario en el cual se deberán cumplir los objetivos antes del 2020, así como reducir las emisiones de contaminantes antes del 2030, de tal forma que las concentraciones se mantengan por debajo de los valores recomendados en la “Guía de la OMS” (48-49).

Los beneficios asociados a la reducción de la contaminación previstas para el 2030 compensan ampliamente los costes producidos por el cumplimiento de las normas. En primer lugar, las medidas tomadas se traducirán en una vida más larga y sana para la población de la UE, como consecuencia de la reducción de las muertes debidas a la contaminación atmosférica. En segundo lugar, debido a la mejora en la salud de la ciudadanía, habrá una disminución en los costes sanitarios. También hay que tener en cuenta el aumento de la productividad laboral aumentando de esta forma el PIB, y compensando completamente los gastos derivados del cumplimiento de la norma (48).

Para conseguir los objetivos descritos en la norma, es fundamental la cooperación entre la Unión Europea y los estados miembros, además de entre cada miembro y las regiones y ciudades que lo componen. No se debe olvidar que los problemas de contaminación no tienen fronteras.

Antes del 2030 los estados miembros tienen la obligación de reducir los niveles de los contaminantes ambientales originales (SO_2 , NO_x , COV y NH_3) y de los dos incluidos más recientemente: $\text{PM}_{2.5}$ (partículas finas con grave impacto sobre la salud) y CH_4 .

En cuanto a las emisiones de amoníaco en la agricultura, la normativa exige que se reduzcan al menos un 27%. Para ello, se impondrán requisitos para la aplicación de fertilizantes y el control del estiércol. Estas medidas también contribuirán a la reducción del óxido nitroso (48).

Las emisiones debidas al transporte marítimo tienen también un gran impacto sobre la calidad del aire. En 2005 las emisiones de NO_x y SO_2 debidas al transporte marítimo supusieron entorno a un 25% y 21% respectivamente de las emisiones totales procedentes de la tierra. En 2030 la reducción de las emisiones de NO_x se estima en torno a un 65% mientras que la reducción de las emisiones debidas a transporte marítimo estaría tan solo en un 2% (48).

No cabe duda que el futuro supone movilizar la acción internacional para promover una economía verde y promover la investigación e innovación. En este sentido, el programa de investigación europea Horizonte 2020 puesto en marcha para el periodo 2014-2020 tiene como objetivos la transformación social hacia una economía verde y la reducción de los efectos negativos de la contaminación atmosférica sobre la salud y el medio ambiente. Impulsa la búsqueda a largo plazo de soluciones sostenibles, herramientas y estrategias para mejorar la calidad del aire.

Cada cinco años empezando desde el 2020 se analizarán los avances de los objetivos de la política de calidad del aire para el 2030 y se evaluarán los indicadores fijados en estos objetivos. También se seguirá con la política de reducción de emisiones en los vehículos diésel ligeros.

3.7. Efectos de la contaminación ambiental sobre la salud

El cumplimiento de la normativa actual no ha alcanzado los objetivos deseados, aunque se han realizado avances importantes. La contaminación se asocia a una amplia variedad de efectos adversos, muchos de ellos relacionados con enfermedades respiratorias, cardiovasculares y también con el desarrollo del embarazo (50) (Figura 1). Las investigaciones para entender los procesos biológicos por los que la polución afecta a la salud se han centrado principalmente en estudiar procesos inflamatorios y también relacionados con el estrés oxidativo. Se necesitan otro tipo de investigaciones para profundizar en enfermedades más concretas incluyendo todas las relacionadas con la fertilidad.

La aplicación de la legislación europea actual no se traduce en alcanzar unos niveles aptos para la salud sobre todo en las grandes urbes. Queda mucho trabajo por hacer para conseguir reducir los parámetros más críticos y a su vez seguir realizando estudios que permitan conocer el efecto real de estos contaminantes sobre la salud. Existen muy pocos trabajos que relacionen la contaminación con la infertilidad masculina, aunque seguramente se podrá encontrar una correlación directa como se ha hecho con otras enfermedades.



Figura 1. Pirámide de los efectos de la contaminación en la salud

4. Efectos de los campos electromagnéticos en la calidad seminal

Autores: **Moisés de la Casa y Sara Atienza de Nava**

Resumen

El desarrollo de nuevas tecnologías y su introducción en nuestra vida cotidiana están estrechamente relacionados con el aumento de la exposición a ondas electromagnéticas. Debido a la creciente preocupación por cómo afectan a nuestra salud, distintos organismos nacionales e internacionales han redactado guías de recomendación, donde se proponen límites a la exposición a los distintos tipos de radiación (ionizante y no ionizante).

Múltiples estudios, basados en modelos animales y epidemiológicos, nos permiten discutir las diferentes repercusiones sobre la fertilidad masculina y en concreto sobre la calidad seminal de dichas radiaciones. Podemos concluir, por tanto, que determinados parámetros de la calidad seminal se ven afectados según el tipo de radiación electromagnética y el tiempo de exposición a la misma.

Introducción

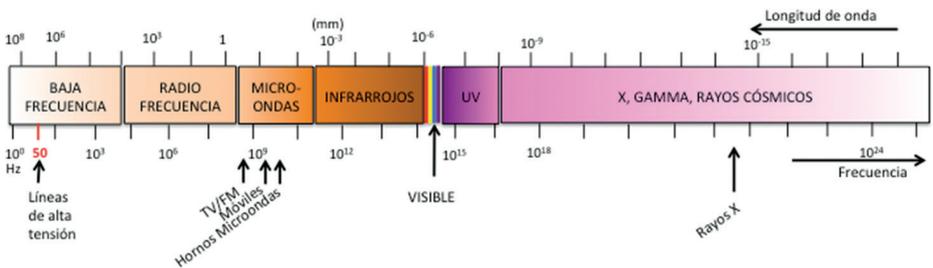
En las últimas décadas se han producido en los países industrializados cambios importantes en los hábitos de vida, así como el desarrollo de nuevas tecnologías que han podido contribuir de una forma más o menos importante, a la disminución de la salud reproductiva masculina. De entre las tecnologías más extendidas en este periodo, las relacionadas con la electricidad, la comunicación y la informática son las que parecen estar teniendo una vinculación importante en la reducción o alteración de la calidad seminal en los varones, debido a su capacidad de emisión de radiaciones u ondas electromagnéticas (REM).

Tras el desarrollo de estas tecnologías, se han realizado varios estudios, basados en distintos modelos experimentales, sobre los posibles efectos que las REM creadas de forma artificial están teniendo en la salud en general y en la salud reproductiva en particular. Existe un amplio rango de radiaciones para las diversas tecnologías, y por ello, los estudios sobre los posibles efectos biológicos de los campos electromagnéticos se han realizado a distintas frecuencias que abarcan desde los 0.5Hz hasta 300Ghz fundamentalmente.

En la actualidad diversos organismos nacionales o internacionales han establecido ciertas guías de recomendaciones sobre los límites de exposición a los campos electromagnéticos, métodos de medida, etc., tanto para el ámbito laboral como para la población general. De entre estos organismos cabe destacar el International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), del cual existe una guía (1) con las recomendaciones, que no dejan de ser eso, recomendaciones y no de obligado cumplimiento. Por este motivo, existen además distintas normativas específicas en cada país, lo que da lugar a una gran variabilidad en cuanto a los límites de exposición a las REM según su frecuencia, las normas de certificación de los niveles de medida de emisión de cada equipo o la instalación y los componentes productores de campos electromagnéticos. En Europa la directiva 2013/35/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO del 26 de Junio del 2013 (2), es la que está vigente en la actualidad y se basa en las recomendaciones establecidas por el ICNIRP.

Radiaciones electromagnéticas

Dentro de las radiaciones electromagnéticas podemos diferenciar entre las radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma y UV de alta frecuencia) y las radiaciones no ionizantes (microondas, producidas por los teléfonos móviles, etc.,) (3-4).



Grafica 1. Esquema de la frecuencia y la longitud de onda de las distintas radiaciones.

1.-Radiaciones ionizantes (Rayos X, y UV de alta frecuencia)

Las radiaciones ionizantes tienen la energía suficiente como para producir rotura de enlaces químicos, por lo que son de sobra conocidos sus efectos mutagénicos y carcinogénicos. En el caso de la fertilidad pueden alterar de forma importante la capacidad reproductiva de los gametos, así como producir alteraciones genéticas y epigenéticas (5-7).

En la población en general, la exposición a radiaciones ionizantes es algo que ocurre de forma excepcional y transitoria. Debido a ello, sus posibles efectos no deberían ser preocupantes o alarmantes, exceptuando aquellos casos en los que debido a un accidente se produzca un aumento

importante en la exposición a este tipo de radiaciones, o bien en grupos de población muy específicos que se ven sometidos a una exposición más elevada por su ocupación (exposición ocupacional).

Hay una gran cantidad de estudios, algunos basados en modelos animales, que relacionan los efectos de las radiaciones ionizantes con distintos aspectos de la salud humana como alteraciones hematológicas, cáncer, afecciones cardíacas, etc. (8-15). Las radiaciones ionizantes pueden influir de distinta forma en la fertilidad del varón, afectando en diferentes niveles de la espermatogénesis. Se ha observado que la exposición incluso a baja intensidad de radiaciones ionizantes a nivel testicular, puede inducir la rotura de la doble cadena de las moléculas de ADN (DSBs) de las espermatogonias, provocando la entrada en apoptosis de las células germinales esenciales para mantener la capacidad de producir espermatozoides. Este efecto de la exposición a las radiaciones ionizantes puede ser reversible y es dosis-dependiente, pero a la vez su efecto puede ser prolongado en el tiempo y por lo tanto puede afectar a la capacidad reproductiva del individuo por la presencia estas roturas DSBs en el esperma fecundante (16-17). Dosis elevadas y prolongadas de radiaciones ionizantes pueden llegar incluso a producir el bloqueo de las células germinales, y por lo tanto a una atrofia testicular que conllevaría a la infertilidad de los individuos expuestos a esas altas dosis de radiación (17-19). También se ha observado que ciertos daños en las moléculas de ADN asociados a las radiaciones, pueden estar mediados por la alteración entre el balance de componentes antioxidantes y los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS) (20). La alteración en el nivel de protección ante los ROS, puede afectar a la peroxidación lipídica de las membranas del espermatozoide y por lo tanto, a la fragmentación del ADN y la movilidad espermática (21). Recientemente algún estudio apunta a la existencia de posibles mecanismos adaptativos en individuos con exposiciones prolongadas a bajas dosis de radiaciones, mediado por un aumento en los niveles de antioxidantes en el plasma seminal (22). Debido a ello, aun estando expuestos a la radiación y por tanto a un aumento de los niveles de ROS, no se verían afectados en la integridad y movilidad espermática, aunque hacen falta estudios que corroboren este hecho.

Otros de los efectos que se han observado a bajas exposiciones es la afectación en parámetros como la movilidad, vitalidad, presencia de vacuolas, alteraciones en la morfología espermática, alteraciones en la metilación global, y aumento de la fragmentación del ADN espermático (17, 20, 23-25). En el caso de la concentración espermática y el grado de aneuploidías hay divergencias y parece que puede estar más influenciado por exposiciones a altas dosis de radiación, y algunos estudios establecen que también depende de la especie, pudiendo afectar la radiación de forma distinta en función de los individuos a estudiar (21).

Todos estos efectos van a afectar de una forma más o menos severa a la capacidad reproductiva del varón, disminuyendo su fertilidad, así como al posible desarrollo del embarazo y por lo

tanto del niño nacido, como consecuencia de la incorporación al embrión de una molécula de ADN que puede presentar distintas alteraciones, tanto en su dotación cromosómica como en su integridad, afectando a la genética y epigenética del espermatozoide (26-30).

Por todo ello, existen unas recomendaciones en cuanto a los niveles de exposición anual para la población en general y para los sujetos expuestos ocupacionalmente, que fueron establecidas por la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP), en el año 2007 (31) que establece unos límites de dosis efectivas recomendadas en situaciones de exposición planificada de 1mSv al año para el primer grupo y un máximo de 20mSv de promedio anual en periodos definidos de 5 años para la población con exposición ocupacional.

2.-Radiaciones no ionizantes

Son las ondas localizadas en la parte más baja del espectro electromagnético y comprenden las ondas de baja frecuencia, de radio, microondas, infrarrojo, visible y ultravioleta de frecuencia no ionizante. Son ondas que transmiten muy poca energía y como consecuencia de ello no son capaces de tener los mismos efectos sobre la materia que la que tienen las radiaciones ionizantes, además sus posibles efectos desaparecen a una corta distancia de la fuente emisora. La frecuencia de estas ondas como se puede ver en la gráfica 1 se corresponde con el rango de 0Hz a 300GHz.

Las ondas electromagnéticas, al igual que la luz, se desplazan en línea recta y cuando colisionan con un objeto pueden transmitirse a través de ese objeto, pueden ser reflejadas o bien pueden ser absorbidas y ello dependerá en gran parte de la composición del objeto con el que colisionan. Al ser ondas de baja energía, su intensidad se irá reduciendo a medida que se alejan de la fuente emisora y por lo tanto sus posibles efectos sobre la materia receptora, igualmente se verán mermados con la distancia.

En el caso de las radiaciones no ionizantes por su mayor implicación en la vida diaria de las personas y debido a la existencia de infinidad de fuentes de emisión de este tipo de campos electromagnéticos, ha suscitado un mayor interés no sólo a nivel científico, sino también a nivel periodístico y en la población en general.

Efectos de la radiaciones o campos electromagnéticos producidos por los móviles:

El rápido crecimiento del uso de los móviles en las últimas dos décadas, más de cinco mil millones de líneas en la actualidad, ha ocasionado un incremento importante en la exposición de la población general a los campos electromagnéticos producidos por dichos dispositivos y sus torres (los móviles emiten a una frecuencia de entre 800-2200MHz) (32-33). Junto con el desarrollo de estos dispositivos y su constante crecimiento, también se ha visto

incrementada de forma paralela la preocupación por sus posibles efectos, lo que ha dado lugar a la realización de diversos estudios sobre los efectos de los campos electromagnéticos producidos por estos dispositivos en la salud humana. En dichos estudios, se ha observado que pueden tener relación con efectos nocivos en el cerebro, corazón, sistema endocrino, SNC, cáncer etc., asociados con dolor de cabeza, fatiga y dificultad de concentración (34-40), aunque existen ciertas divergencias en cuanto a los resultados obtenidos (41).

En estudios realizados en las dos últimas décadas, se sugiere que el uso del móvil puede estar asociado con la calidad seminal, y puede ser un factor que contribuye al aumento de la infertilidad masculina. Con el objetivo de aclarar la relación entre el uso del teléfono móvil y la calidad seminal, se han realizado estudios epidemiológicos, *in vitro*, *in vivo*, y en animales, no siendo siempre coincidentes los resultados obtenidos, pero si observándose una tendencia en los resultados a la afectación en distintos parámetros de la calidad seminal (32-33, 42-48).

Las diferencias que se han observado, pueden deberse a la existencia de distintas condiciones experimentales, distintas especies en estudio, distintas frecuencias y tiempos de exposición etc. Por todo ello, y con el objetivo de intentar estandarizar los estudios más recientes, se hace referencia al término de tasa de absorción específica o “Specific Absorption Rate” (SAR). Este término se define como la potencia absorbida por la masa de los tejidos y tiene unidades de vatios por kilogramo (W/Kg), y se utiliza para las radiaciones no ionizantes y muy particularmente para los teléfonos móviles. Se han establecido, basándose en el principio de precaución, unos niveles de SAR máximo que los móviles pueden producir, siendo este valor en Europa de 2 W/Kg como promedio en 10 gramos de tejido, siguiendo la recomendación marcada por la ICNIRP. En EEUU el límite superior para el valor de SAR de los móviles es de 1.6 W/Kg (49).

El valor del SAR para los móviles varía entre los distintos modelos, marcas o modo de uso y suele estar entre 0.12 y 1.6 W/Kg (32), siendo valores que no tiene un efecto térmico, puesto que parece que para poder ejercer un efecto térmico sobre las células el valor de SAR debería ser superior a 4W/Kg (33, 44). Los posibles efectos térmicos que pudiese generar el uso del móvil, serían del calor producido por el terminal, pero no por los efectos de las ondas electromagnéticas.

Tras la revisión de la literatura reciente, se puede afirmar que existe una correlación entre el uso de los teléfonos móviles y la alteración de distintos parámetros seminales, sobre todo en aquellas personas que suelen llevar el móvil en el bolsillo del pantalón. Esta correlación negativa es muy dependiente tanto del tiempo de exposición, como de la distancia y el modo de uso del móvil (50).

De entre todos los parámetros seminales afectados por las ondas electromagnéticas producidas por los móviles: movilidad, morfología, concentración y vitalidad (32-33, 46, 50-54), es en los 2 primeros donde la bibliografía encuentra mayor unanimidad en cuanto al efecto negativo de las mismas. De igual forma, existen bastantes evidencias en la alteración

que producen estas radiaciones sobre el incremento de los niveles de ROS y la disminución de la capacidad antioxidante por la alteración de los niveles de enzimas antioxidantes existentes en el plasma. Las consecuencias más importantes de este desequilibrio en el nivel de estrés oxidativo, son el daño del ADN y la membrana lipídica de los espermatozoides, pudiendo ocasionar de forma indirecta la alteración de la movilidad y apoptosis celular (45, 54-56). Aunque hay menos estudios realizados y sería necesario corroborarlo, parece que los móviles también pueden tener efectos sobre el ciclo celular en la espermatogénesis (57), y sobre cambios histológicos en los testículos (58).

De cara a la realización de futuros estudios, sería conveniente la estandarización y la simulación de las condiciones reales de la vida cotidiana, con el objetivo de conocer más sobre el efecto que los móviles juegan en la suma de los distintos condicionantes ambientales que afectan a la calidad seminal.

Efectos de la radiaciones o campos electromagnéticos producidos por el wi-fi:

La evidencia de los efectos del wifi (2.45GHz) sobre la calidad seminal se basa fundamentalmente en escasos estudios animales y alguno realizado en humanos. Por tanto, no existe una evidencia clara de los posibles efectos tanto histopatológicos, como sobre los distintos parámetros seminales al respecto (59-64).

Al igual que con el uso del móvil y descartando el posible efecto térmico producido por los ordenadores conectados vía wifi, por su forma de uso (apoyo cerca de la zona testicular y transmisión del calor producido por el terminal), parece que puede haber efectos sobre la calidad seminal por las ondas electromagnéticas y puede ser mediado por un incrementos de los niveles de ROS (59) y también se ha observado que puede haber algún efecto sobre la movilidad y recuento espermático (59-60).

Sería necesaria la realización de más estudios que confirmen esto, siendo difícil la elección a día de hoy de una población estudio que esté sometida únicamente a las ondas electromagnéticas producidas vía wifi, y que no esté expuesta al uso del teléfono móvil.

Efectos de las radiaciones de las líneas de alta tensión:

Las intensidades de los campos magnéticos producidos por las líneas aéreas de transmisión de energía eléctrica son relativamente bajos, y debido a la reducción de los posibles efectos de las ondas con la distancia, no existen estudios que relacionen solo los posibles efectos de esta fuente de emisión sobre la fertilidad. En cualquier caso, son los empleados de compañías de suministro eléctrico que trabajen en subestaciones o en el mantenimiento de líneas de transmisión activas con corrientes de alta intensidad los que constituyen ese grupo especial expuesto a campos intensos producidos por las líneas de transmisión eléctrica.

5. Hábitos de vida: ejercicio físico, tabaco, alcohol, cafeína y drogas en relación con la calidad seminal

Autores: **Rafael Lafuente y Bénédicte Jacquemin**

Resumen

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.

En este capítulo se revisan los principales factores relacionados con los 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 los efectos de todos estos factores sobre la fertilidad masculina.

Introducción

No cabe duda que la calidad seminal ha ido disminuyendo con el paso del tiempo (1-7). Pero también se sabe que las variaciones en la calidad seminal dependen del lugar geográfico de residencia, lo que nos hace sospechar que hay factores específicos que pueden afectar más o menos (8-10). La prevalencia de infertilidad parece ser más acusada en zonas industrializadas (11).

Los hábitos de vida pueden influir mucho en la salud general y en el bienestar, incluyéndose la fertilidad (12). 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.

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 1 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 1. Efectos de los hábitos de vida en la calidad seminal según la bibliografía revisada.

5.1. Hábitos de vida

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 (13). La morfología también mejoraba en comparación con deportistas de competición o atletas de élite (13). Por otro lado, practicar ciclismo más de cinco horas a la semana se correlaciona negativamente con la concentración y movilidad espermática (14).

Un ejercicio excesivo puede afectar negativamente alterando el balance energético del cuerpo y afectando al sistema reproductivo (15), 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 (16). El estrés y la depresión parece que reduce la testosterona (17 y 18), interrumpen la función gonadal (18) y en última instancia reduce la espermatogénesis.

Tabaco

Se estima que hasta un 35% de hombres en edad reproductiva son fumadores (19), y que los hombres que fuman antes o durante los intentos de concebir tienen una fertilidad disminuida en comparación con los no fumadores (20). 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 (12, 21). El tabaco afectaría a la concentración espermática (16), movilidad (22, 23), morfología (16, 23, 24, 25), volumen del eyaculado (16) y a la tasa de fecundación (26), seguramente debido a una reducción de la actividad mitocondrial (22). 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 (27). También hay estudios que demuestran un aumento de la aneuploidía en espermatozoides (28, 29, 30), altos niveles de estrés oxidativo (31), y aumento de la fragmentación del ADN (22, 32, 33) 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 (34, 35). Posiblemente la respuesta inflamatoria inducida por la presencia de los metabolitos derivados del tabaco sería la responsable de esta cascada de reacciones (34).

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 (36).

También, 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 (37).

Sin embargo, en la literatura también hay estudios que no encuentran una asociación entre los efectos del tabaco y la calidad espermática (38), o la fragmentación del ADN (39). Lo cierto es que el humo del cigarrillo contiene más de 4.000 productos químicos (40) y se asocia claramente con riesgos para la salud general y es muy probable que también se asocie con la salud reproductiva.

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 (41, 42, 43, 44). Está descrito que la espermatogénesis puede deteriorarse progresivamente a medida que se incrementa el consumo de alcohol (44). Y un consumo crónico afecta directamente las hormonas reproductivas masculinas y también la calidad seminal (41). Un estudio caso-control desarrollado en Japón demuestra que la ingesta de alcohol era significativamente más frecuente en hombres infértiles que en los controles (45). También se sabe que el riesgo de aneuploidías en espermatozoides aumenta en consumidores de alcohol respecto a los no consumidores de alcohol (29).

Un meta análisis que incluye 57 estudios y 29.914 individuos detectó una asociación entre alcohol y volumen seminal (16). Muy pocos hombres considerados como alcohólicos son normozoospermicos, y la mayoría presentan teratozoospermia (46).

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 (1), 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.

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 (47), 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 (12), mayor tasa de aborto e incluso mayor muerte fetal (12).

En un trabajo realizado por Jensen et al. (48), 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.

Otras drogas

La marihuana es una de las drogas más utilizada en el mundo (49,50). La marihuana contiene cannabinoides 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 (50). 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 (47).

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 (51). 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 (52, 53).

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.

6. Factor masculino y estrés oxidativo

Autores: Gemma López, Juan Carlos Martínez Soto, David Amorós

Resumen

La disminución de la calidad seminal y como consecuencia el aumento de la infertilidad masculina, es un hecho constatado por multitud de estudios. Uno de los principales factores causantes de esta infertilidad es el estrés oxidativo originado por elevadas concentraciones de sustancias reactivas del oxígeno. Estas sustancias, de origen intrínseco o extrínseco al propio individuo, originan un daño espermático causando incremento en la fragmentación de ADN, disminución en la movilidad y morfología espermática y aumento en los fenómenos de apoptosis. En este capítulo se revisan las causas y efectos producidos por este fenómeno.

Introducción

La infertilidad afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva y el factor masculino es la única causa en el 25% de estos casos (1, 2). El hombre infértil presenta, con frecuencia, un análisis de semen anormal. El origen de esta alteración es a menudo difícil de explicar ya que puede ser multifactorial (ambiental, genética, fisiológica, nutricional, etc.) (3).

Una de las causas potenciales de la infertilidad masculina es el estrés oxidativo (2, 4). Numerosos estudios han descrito la presencia de concentraciones elevadas de especies reactivas del oxígeno o *Reactive Oxygen Species* (ROS) en el 30-80% de hombres infértiles (5-7). En condiciones fisiológicas el espermatozoide produce pequeñas cantidades de ROS, necesarias para funciones espermáticas tales como la capacitación, la reacción acrosómica y la unión ovocito-espermatozoide (8), aunque un exceso de ROS, puede dañar a los espermatozoides normales induciendo peroxidación lipídica y daño en el ADN (9-11). Normalmente existe un equilibrio entre la producción de ROS y la maquinaria antioxidante del sistema reproductivo masculino, pero en ocasiones, la presencia excesiva de ROS sobrepasa la capacidad antioxidante de los mecanismos de defensa del espermatozoide y del plasma seminal, causando un estado de estrés oxidativo (12).

Concepto de antioxidante

Un antioxidante se define como una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. A pesar de que las reacciones de oxidación son cruciales para el funcionamiento celular,

pueden originar ROS y causar daño celular. Para evitar este daño celular, el espermatozoide y el plasma seminal cuentan con un sistema de capturadores y antioxidantes que actúan protegiendo a los espermatozoides de los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno (13).

Los antioxidantes pueden obtenerse principalmente a través de dos vías: fisiológica o exógena, a partir de la dieta. En un eyaculado pueden encontrarse antioxidantes tanto en el plasma seminal como en el espermatozoide (5,14), aunque debido al escaso citoplasma de esta célula la mayoría de los antioxidantes se localizan en el plasma seminal. Pueden clasificarse dependiendo de su origen en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los antioxidantes enzimáticos más frecuentes se encuentran la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa. Entre los no enzimáticos, se incluyen la carnitina, los carotenoides, el glutatión, el urato y las vitaminas C y E (15, 16). Ver capítulo 7.

Los antioxidantes provenientes de la dieta se obtienen básicamente a través de la ingesta oral de alimentos (frutas, verduras, frutos secos) aunque en ocasiones también se obtienen a través de suplementos orales (suplementos vitamínicos, minerales o plantas medicinales) y se cree que aumentan la capacidad antioxidante fisiológica total.

6.1. Especies reactivas del oxígeno

A pesar de ser un elemento necesario para la supervivencia, el oxígeno puede dar lugar a la formación de radicales libres que son subproductos de procesos fisiológicos y del metabolismo celular. Las ROS son moléculas de oxígeno que contienen uno o más electrones desapareados, haciéndolas inestables y muy reactivas en presencia de aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos. La forma más primaria de ROS se da con la adición de un electrón extra al O_2 , formando el anión superóxido (O_2^-). El anión superóxido puede convertirse después a otras ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y el peroxilo (HO_2) (16, 17).

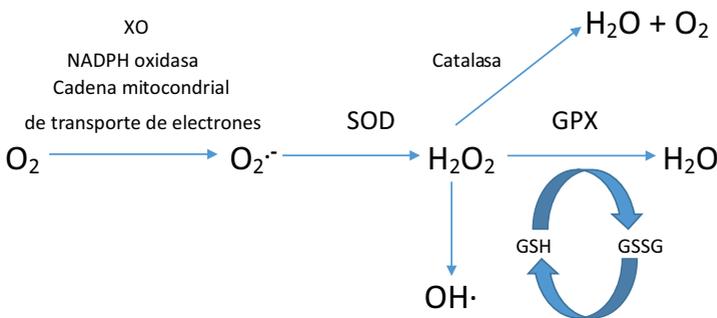


Figura 1. Esquema de formación de sustancias ROS

A nivel testicular, las especies reactivas de oxígeno son importantes intermediarios implicados en el tono vascular y la regulación génica. Además, se requieren niveles fisiológicos de ROS para la maduración, la hiperactivación y capacitación espermática, para la quimiotaxis, la unión a la zona pelúcida, la reacción acrosómica y la fusión entre el ovocito y el espermatozoide (15-18). En condiciones fisiológicas normales, los antioxidantes ayudan a mantener un nivel bajo de estrés oxidativo en el semen, facilitando el desarrollo normal de los procesos celulares, la función espermática y evitando así el daño celular inducido por las ROS (19).

Factores que originan aumento de ROS en el semen

El estrés oxidativo puede ser originado por el mismo espermatozoide y/o por una serie de condiciones que se sabe que tienen efectos perjudiciales para la fertilidad masculina Fig. (2). Estas condiciones pueden deberse tanto a anomalías del propio espermatozoide, como a la exposición ambiental (22).

Causas intrínsecas: Los principales productores de ROS en el semen son los leucocitos y los espermatozoides inmaduros. En condiciones fisiológicas los leucocitos pueden producir 1000 veces más ROS que el espermatozoide. Fallos en procesos como la remodelación de la membrana del espermatozoide durante la espermatogénesis, anomalías en la unión cabeza-cola, el desarrollo incompleto del acrosoma o alteraciones en el citoesqueleto del espermatozoide pueden ser el origen tanto de radicales libres como de espermatozoides anormales (14, 20, 21).

Las ROS intrínsecos pueden ser originados por espermatozoides dañados o inmaduros (23). La espermatogénesis alterada, que da lugar a espermatozoides anormales, es una fuente importante de especies reactivas del oxígeno (24). Sin embargo existen otras etiologías intrínsecas causantes del aumento de ROS en el plasma seminal (4):

- a. El **varicocele** es una condición causada por la dilatación de las venas espermáticas que se ha asociado a la infertilidad en aproximadamente un 30% de los hombres (21, 25). El aumento del flujo de sangre retrógrado causa una elevación de la temperatura escrotal y testicular, hecho que provoca un aumento en la concentración de ROS en el testículo y en el semen y que causa la aparición de estrés oxidativo a nivel testicular. El varicocele está asociado también a una disminución de la capacidad antioxidante (26).
- b. La **criptorquidia**, al igual que el varicocele, causa un aumento de la temperatura testicular y se asocia también a un aumento de la producción de ROS y al estrés oxidativo (27). La elevación de los niveles de ROS puede ser una causa directa de la apoptosis en células germinales y de la alteración de genes responsables del metabolismo lipídico y energético, de la respuesta al estrés y de las reacciones redox celulares (28).

- c. La **torsión testicular** y su reparación pueden inducir un estrés oxidativo debido a la lesión de isquemia y reperusión. La torsión, puede causar una alteración en los túbulos seminíferos y originar una pérdida de células germinales. Se ha observado un aumento del estrés oxidativo testicular tras la reparación de la torsión testicular (29).
- d. Las **infecciones e inflamaciones genitourinarias** localizadas también pueden afectar a la fertilidad masculina causando un aumento del estrés oxidativo. Esto es debido al aumento de la concentración de leucocitos a nivel local que se da en estas situaciones. A su vez, la respuesta inflamatoria causa la aparición en el testículo de varios enzimas como la sintasa óxido nítrica, la interleukina-1 β y la ciclooxigenasa-2, que junto a una simultánea disminución de enzimas antioxidantes y de células germinales, provocan el exceso de ROS (30). Se ha demostrado también, que la inflamación testicular resulta en una reducción del potencial de membrana mitocondrial, en una esteroidogénesis y en la apoptosis de células germinales (31).
- e. La **edad** del hombre es otro de los factores que se han relacionado directamente con el aumento del estrés oxidativo a nivel testicular (32). Esto es debido a la disminución de la esteroidogénesis con la edad (33). Las células de Leydig más antiguas presentan una reducción de la expresión de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, disminuyendo así su capacidad tampoadora testicular y aumentando el riesgo de daño por ROS (32).

Causas extrínsecas: Además de las causas intrínsecas ya mencionadas, existen otros factores extrínsecos o medioambientales que también pueden afectar los niveles de ROS testicular, aumentando el nivel de estrés oxidativo y provocando anomalías en la espermatogénesis (10). Entre estos factores se encuentran la exposición a toxinas, la quimioterapia y la radiación ionizante. Existen numerosas **toxinas ambientales e industriales** que provocan la elevación de los niveles de ROS en el testículo y tienen un impacto tanto en la espermatogénesis como en la función espermática. Por ejemplo, el metoxietanol presente en pinturas, líquidos de freno y otros químicos industriales, puede aumentar los niveles de estrés oxidativo (34). Del mismo modo, el tolueno presente en disolventes puede causar daño oxidativo en el ADN (35).

Se ha visto también que la elevada exposición a ciertos metales como el cadmio (36) o el plomo (37) puede aumentar el estrés oxidativo testicular y la aportación epididimaria de ROS, dando lugar a una disminución de la producción espermática, de la capacidad antioxidante y de la movilidad espermática, así como de un aumento de la peroxidación lipídica (38).

Las toxinas generadas al fumar cigarrillos son otra fuente importante de ROS en muchos tejidos incluyendo los testículos y se han asociado a la infertilidad tanto masculina como femenina (17, 39).

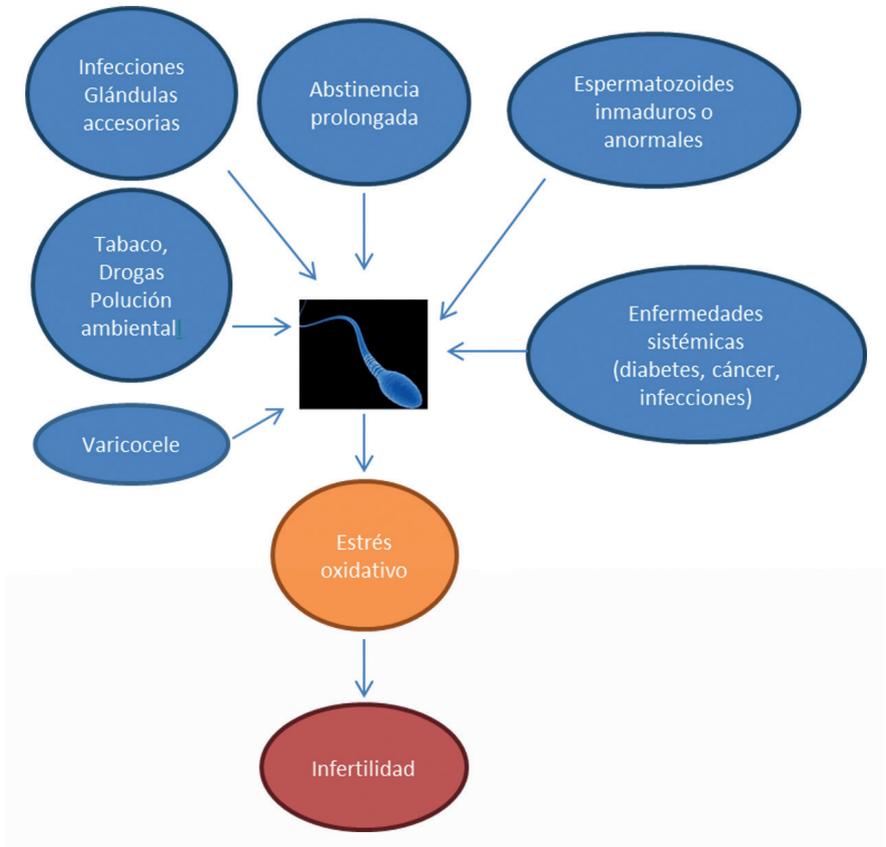


Figura 2. Factores que provocan estrés oxidativo

Daño que originan las ROS en el espermatozoide

El estrés oxidativo o daño patológico debido a las especies ROS ocurre cuando hay un desequilibrio en el sistema antioxidante y los niveles de ROS superan la capacidad tamponadora del sistema. Dicho estrés puede darse cuando hay un incremento en la producción de los niveles de ROS, cuando hay una disminución de la capacidad bloqueadora de los antioxidantes, o cuando ocurren ambas cosas a la vez (4, 17).

En hombres infértiles la causa más probable de estrés oxidativo es el aumento de producción de radicales y no tanto la disminución de la concentración de antioxidantes cuando se comparan con controles fértiles. Más del 80% de los hombres infértiles presentan niveles patológicos de ROS en semen (40).

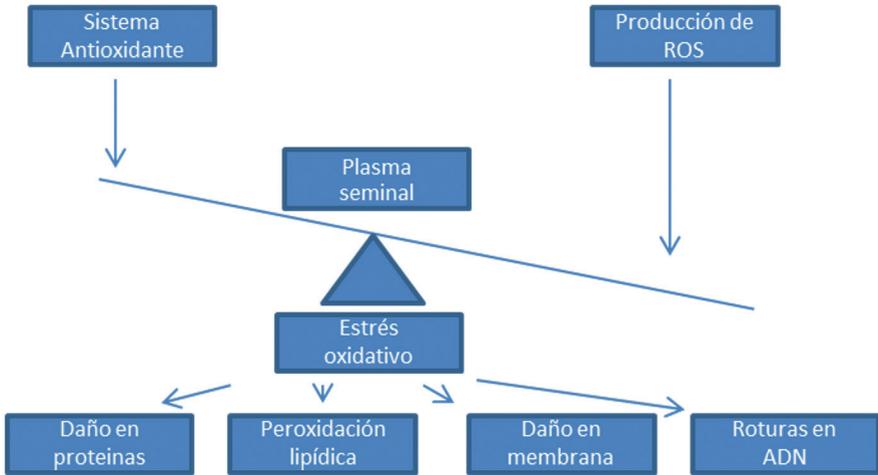


Figura 3. Origen y consecuencias del estrés oxidativo en espermatozoides

A nivel genitourinario, el estrés oxidativo tiene un gran impacto tanto en la espermatogénesis como en la funcionalidad espermática. Se cree que la presencia de niveles suprafisiológicos de ROS a nivel testicular impactan potencialmente en todos los aspectos del análisis seminal. Hay numerosos estudios que demuestran el efecto deletéreo de los ROS sobre la concentración espermática (41-43), la movilidad (42) y la morfología (44), así como su implicación en el daño al ADN espermático (45, 46) y la apoptosis celular (47). Incluso se ha demostrado que la presencia de elevados niveles de ROS puede disminuir la fusión ovocito-espermatozoide (48). Contrariamente, hay estudios que no encuentran relación entre los ROS y la movilidad espermática (49).

El efecto negativo de las ROS sobre el espermatozoide es debido a la alta susceptibilidad de las membranas espermáticas. Estas membranas contienen una elevada concentración de lípidos poliinsaturados, sensibles a la peroxidación por radicales libres. Ciertos radicales, como el H_2O_2 pueden penetrar a través de las membranas y afectar la actividad de enzimas como la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (50), provocando una disminución de la disponibilidad de NADPH. Esta disminución de los niveles de NADPH implica un aumento de los niveles de glutatión oxidado, la reducción de la concentración de glutatión y, en consecuencia, la disminución de la capacidad antioxidante y el aumento de la peroxidación de fosfolípidos de membrana (51).

La peroxidación de fosfolípidos de membrana se traduce en la pérdida de integridad y fluidez de la misma, aumentando así su permeabilidad y afectando a funciones del espermatozoide como la movilidad (46).

Otra de las consecuencias del aumento de estrés oxidativo es el daño del ADN a nivel mitocondrial y nuclear en el espermatozoide (52). Este daño afecta tanto a nivel molecular como al propio aminoácido por modificación de bases, deleciones, enlaces cruzados, desplazamientos del marco de lectura e incluso, en última instancia, puede dar lugar a reorganizaciones cromosómicas. Niveles de ROS elevados se asocian a un aumento de la frecuencia de las roturas de ADN en hombres infértiles aunque no hay estudios publicados que establezcan un punto de corte en los valores de ROS o fragmentación del ADN espermático a partir del cual el embarazo no sería posible.

Clínicamente el daño en el ADN se manifiesta como una disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide, como una afectación en el desarrollo embrionario, como un incremento en las tasas de abortos así como en posibles problemas en el recién nacido (53). Existe una elevada correlación entre las tasas de aneuploidías y los niveles elevados de fragmentación espermática, resultando en un aumento de las anomalías genéticas (54).

Se ha observado también una correlación directa entre los niveles elevados de ROS y el aumento de la apoptosis en espermatozoides maduros, resultando en oligozoospermia (55). El estrés oxidativo puede causar alteraciones en la apoptosis a través de la disrupción de las membranas mitocondriales y por alteración de la actividad de caspasas inductoras de la apoptosis. Dado que la apoptosis espermática controla la sobreproducción de gametos masculinos, su alteración implica la persistencia de espermatozoides anormales que han sido marcados para ser eliminados, aumentando así la teratozoospermia (56).

A pesar del efecto negativo de los ROS sobre el espermatozoide sigue habiendo una controversia en cuanto al efecto de los niveles elevados de ROS sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA), incluyendo la fecundación in vitro (FIV) y los resultados de embarazo. Mientras que hay estudios que demuestran que a pesar del impacto negativo sobre la calidad y la funcionalidad espermática, niveles elevados de ROS no tienen efecto negativo sobre las tasas de FIV o ICSI (57), otros estudios han demostrado el impacto negativo de los ROS en los resultados de TRA (58, 59), incluyendo un meta-análisis que demuestra la correlación entre los niveles de ROS y la tasa de fecundación mediante FIV (60).

7. Sistema antioxidante en semen y suplementación exógena

Autores: **Juan Carlos Martínez-Soto, David Amorós, Gemma López**

Resumen

Debido a la susceptibilidad que presentan los espermatozoides al daño oxidativo, existe un eficaz sistema antioxidante, tanto a nivel citoplasmático como en el plasma seminal, capaz de contrarrestar este efecto deletéreo. Sin embargo la exposición del individuo a diferentes agentes externos así como a ciertas condiciones fisiológicas puede hacer necesario recurrir a una suplementación exógena de antioxidantes. En este capítulo realizaremos una revisión de los diferentes sistemas antioxidantes que protegen al espermatozoide y de los efectos de la terapia antioxidante sobre la calidad seminal.

Introducción

Se sabe que un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno puede originar un estado de estrés oxidativo que tiene como consecuencia directa en el espermatozoide una disminución de la viabilidad y de la movilidad y un aumento de la peroxidación lipídica y del daño a nivel de ADN espermático. El sistema reproductivo masculino posee una eficaz maquinaria antioxidante capaz de prevenir y/o disminuir este daño oxidativo. Existen una serie de moléculas antioxidantes tanto en el citoplasma espermático como en el plasma seminal que son capaces de modular los niveles de ROS en semen y que actúan tanto a nivel de regulación como de respuesta ante un aumento súbito de dichos niveles. Dependiendo de la naturaleza de estas sustancias antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticas y no enzimáticas.

Lamentablemente, a veces ocurre que la presencia excesiva de ROS sobrepasa la capacidad antioxidante de los mecanismos de defensa del espermatozoide y el plasma seminal, haciendo necesaria la suplementación exógena con antioxidantes desarrollados por parte de la industria farmacéutica, como suplementos nutricionales para el tratamiento de la infertilidad masculina. Este tipo de suplementos suelen estar formados por la combinación de varias sustancias antioxidantes y oligoelementos en diferentes concentraciones, con diferente poder antioxidante y efectividad a la hora de lograr una mejoría en la calidad seminal (1).

7.1. Sistema antioxidante en semen

Antioxidantes enzimáticos

Se han identificado una serie de enzimas involucrados en el sistema antioxidante del semen. Este conjunto de enzimas actúan a nivel de metabolismo directo de ROS, de la síntesis y reducción del Glutatión, ciclos red-ox de Tiol y activación de la expresión de algunos de ellos (2, 3).

La mayoría de estos enzimas antioxidantes están regulados mediante el factor de transcripción nuclear NRF2, que no actúa directamente sobre los ROS sino que regula la expresión de enzimas que si lo hacen. Dicha regulación se realiza mediante el elemento de respuesta antioxidante (ARE) que está localizado en los promotores de algunos de los principales genes del sistema antioxidante en semen (3).

En condiciones normales el NRF2 se encuentra unido a la proteína KEAP1 que lo identifica como diana para su degradación. En presencia de agentes oxidativos dicha proteína se disocia de NRF2 permitiendo de este modo su translocación al núcleo y su unión a los ARE fig (1). Así, se activa la expresión de diversos genes que codifican para enzimas antioxidantes. Los enzimas del sistema antioxidante en semen que están bajo regulación de NRF2 son el conjunto de formas de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) la glutatión S-transferasa, peroxiredoxinas (PRX), las tioredoxinas (TRX) y la glutatión peroxidasa (GPX).

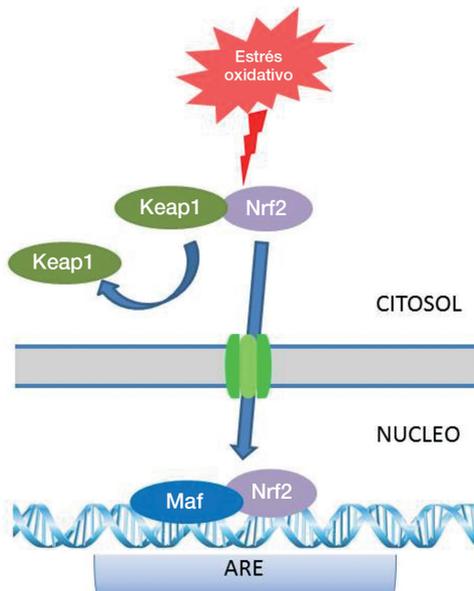
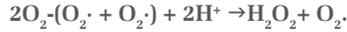


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción del factor de transcripción nuclear NRF2

Superóxido dismutasa (SOD)

La familia de las isoenzimas de la superóxido dismutasa cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno según la reacción:



Estas isoenzimas protegen al espermatozoide de los daños provocados por un exceso de $\text{O}_2\cdot$ (4). En el tracto reproductor masculino se han identificado tres isoformas de la superóxido dismutasa: SOD1 / Cu-ZnSOD / eSOD; SOD2 / MnSOD / SOD mitocondrial; SOD3 / EC SOD / SOD extracelular (3). Se ha comprobado que los niveles de mRNA de SOD1 son elevados a lo largo de todo el epidídimo (5). Su acción está complementada con la de otros enzimas capaces de transformar el H_2O_2 en H_2O (GPX, CAT, etc.). Se ha postulado también que las SODs están implicadas en el aumento de los niveles de H_2O_2 que se produce en la eyaculación y que permite estimular la cascada de reacciones de hiperactivación y capacitación del espermatozoide (4, 6).

Catalasa (CAT)

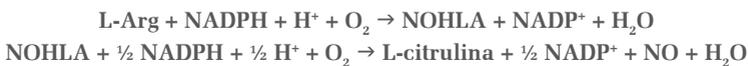
La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua:



Como en el caso de la SOD su expresión puede regularse también a través de la vía de señalización de NFR2-ARE (3). A diferencia de las SODs su expresión no se limita al epidídimo sino que se ha comprobado que se produce en la mayoría de tejidos del tracto genital masculino, exceptuando las vesículas seminales. La CAT utiliza únicamente H_2O_2 como sustrato y su actividad es realmente importante ante concentraciones elevadas de H_2O_2 por lo que su función se relaciona como respuesta ante el estrés oxidativo y no tanto a la regulación de los niveles fisiológicos de H_2O_2 (3, 5).

Óxido nítrico sintasa (NOS)

Esta enzima con función oxidorreductasa es capaz de transformar la L-arginina en óxido nítrico (NO) en una catálisis orgánica de oxidorreducción (reacción RedOx), sin gasto de energía o ATP según el siguiente esquema:



El óxido nítrico está relacionado con la función eréctil del varón, la movilidad espermática, la reacción acrosómica, etc. Además el NO está considerado como un agente neutralizante

de ROS puesto que puede inactivar e incluso inhibir la producción del anión superóxido a concentraciones bajas. También evita la prooxidación de complejos ferrosos que junto con el H_2O_2 pueden provocar la peroxidación de lípidos de membrana celular (2,7).

Se han caracterizado tres isoenzimas de NOS en mamíferos que incluyen la NOS neuronal (nNOS; NOS1), la NOS inducible (iNOS; NOS2) y la NOS endotelial (eNOS; NOS3). Se ha localizado la producción y actividad de NOS tanto en espermatozoides como a nivel de epidídimo y testículos (3,8). A diferencia de los enzimas regulados vía NRF2-ARE, la expresión de NOS1 y NOS3 es constitucional mientras que la producción de NOS2 parece estar relacionada con procesos inflamatorios (8).

Glutación S-Transferasa (GST)

Esta familia de enzimas cataliza la conjugación del glutatión con sustratos xenobióticos como por ejemplo agentes quimioterápicos. Dicha unión, generalmente inactiva estos metabolitos que de forma natural suelen producir ROS *in vivo* y facilita su excreción.

En humanos el conjunto de las GSTs está integrado por una gran familia de enzimas que a su vez se divide en tres grandes grupos: GST mitocondrial GSTK1, las microsomales MGST1-MGST3 y las isoformas citosólicas GSTA1-GSTA5, GSTZ1, GSTM1-GSTM5, GSTO1-GSTO2, GSTP1 y GSTTT1-GSTT4 (3).

Peroxirredoxina (PRX)

Las Peroxirredoxinas son una familia de proteínas ácidas con una o dos Cisteínas en su centro activo que les permite reaccionar directamente con el H_2O_2 ya que su reactividad SH es suficiente como para que se pueda llevar a cabo la transformación de H_2O_2 a H_2O . Esta capacidad les permite actuar tanto como neutralizantes de las ROS, cuando hay una elevada concentración H_2O_2 , como reguladoras del sistema de señalización ROS-dependiente a concentraciones fisiológicas (3, 9, 10). Se trata de un conjunto de 6 isoenzimas (PRX1 – PRX6) de las cuales se han detectado diversas isoformas tanto en plasma seminal como en el propio espermatozoide. Así, se han localizado PRDX1, PRDX4, PRDX5 y PRDX6 en diferentes compartimentos celulares del espermatozoide: cabeza, acrosoma, vaina mitocondrial y flagelo (10).

Tiorredoxinas (TRX)

Las enzimas tiorredoxinas son proteínas con actividad oxidorreductasa cuya función antioxidante se concentra en la reducción de otras proteínas (como las PRX y las GPX). Del mismo modo que el NRF2-ARE, no actúan directamente neutralizando o transformando ROS sino que modulan enzimas que sí lo hacen. Actúan junto con otra proteína denominada

Tiorredoxina reductasa (TrxR) que es la única proteína conocida capaz de reducir las TRX y mantener así su actividad, usando NADPH como sustrato. Este conjunto de TRX – TrxR – NADPH conforma el sistema tiorredoxina (3). Es un sistema altamente extendido entre los organismos vivos (10).

Además de las isoformas descritas TRX1 y TRX2 se ha comprobado que existen numerosas variables de expresión. Se ha determinado que por splicing diferencial se localizan diversas enzimas específicas de tejido, por lo que se puede hablar de un sistema altamente especializado (3).

Glutación peroxidasa (GPX)

La enzima Glutación peroxidasa (GPX) cataliza la reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Esta enzima usa como cofactor el selenio (4, 11).



Su actividad fue descrita por primera vez en eritrocitos y más tarde se caracterizaron distintas formas en otros tejidos y células. Se trata de una gran familia de enzimas agrupadas en 8 grupos GPX 1- GPX8 según su expresión en uno u otro tejido o bien según su especificidad de sustrato (5, 12). En el tracto reproductivo masculino se han caracterizado 4 de las isoformas de la enzima: GPX1, GPX3, GPX4 y GPX5, cuya producción se ha localizado a nivel de espermatozoides, células epiteliales del epidídimo y fluido luminal (3, 4). A diferencia de la catalasa, las GPX son capaces de actuar a bajas concentraciones de H_2O_2 por lo que se ha postulado que son responsables de una regulación fina de los niveles de peróxido de oxígeno.

Antioxidantes no-enzimáticos

Otro conjunto de moléculas no-enzimáticas que tienen una acción antioxidante y que se encuentran de forma natural en el semen son la vitamina E, la vitamina C, la CoEnzima Q10, la L-carnitina y la Melatonina.

7.2. Suplementación exógena

En los últimos años, se han venido publicando multitud de estudios que evalúan la eficacia de la terapia antioxidante en la infertilidad masculina. Este hecho es indicativo del gran interés que este tipo de tratamientos han despertado en el campo de la medicina reproductiva, sobre todo cuando según algunos autores entre el 30 y el 80% de los casos de infertilidad masculina son debidos al daño producido por estrés oxidativo sobre el espermatozoide. Entre las principales moléculas estudiadas podemos destacar las siguientes:

Ácidos grasos Omega 3

Los ácidos grasos omega 3 son ácidos grasos poliinsaturados esenciales que deben ser ingeridos mediante la dieta ya que participan en gran variedad de funciones biológicas. Los principales ácidos grasos omega 3 son el ácido linolénico (AL), el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son constituyentes de todas las membranas celulares y juegan un papel fundamental en el proceso de fecundación, encontrándose en una elevada proporción en los espermatozoides de mamíferos. En especial el DHA (22:6 n-3) se encuentra en niveles muy elevados en el eyaculado (13-16), habiéndose reportado importantes propiedades antioxidantes así como diferentes aplicaciones en el campo de la medicina (17).

Diferentes estudios correlacionan la calidad seminal del eyaculado con la concentración de DHA en plasma seminal o en espermatozoides (14-16,19). Existen incluso investigaciones que evidencian la necesidad de la presencia de DHA para que los espermatozoides posean capacidad fecundante (20).

Varios son los estudios realizados evaluando el efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 sobre la calidad seminal. Así Conquer (21) realizó un ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego, con grupo control (placebo) con 28 pacientes, en el cual suministraba a pacientes astenozoospermicos diferentes concentraciones de DHA (sin EPA): 0-placebo, 400mg y 800 mg durante 3 meses, evaluando tanto la movilidad espermática como la composición lipídica en plasma seminal, suero y espermatozoides. Encontró que la suplementación con DHA ocasionaba un incremento de los niveles de DHA tanto en suero como en plasma seminal, sin que se produjera un incremento en la concentración de espermatozoides ni una mejora en la movilidad espermática. Aachó la falta de efecto sobre la movilidad a la incapacidad del DHA a incorporarse a los espermatozoides de pacientes con astenozoospermia.

En 2011 Safarinejad (22) realizó un nuevo ensayo clínico, con un mayor número de pacientes (n=238), donde evaluó el efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 (EPA+DHA) sobre la calidad seminal de pacientes oligoasteno- teratozoospermicos (OAT) y sobre la capacidad antioxidante del plasma seminal. Este ensayo clínico fue diseñado como doble ciego, aleatorizado y utilizando también un grupo control con placebo. Tanto la dosis (1.84g /día) como tiempo de tratamiento (32 semanas) fueron superiores al estudio de Conquer. En el grupo de pacientes que habían ingerido omega 3 se observó un incremento estadísticamente significativo tanto de la concentración como de la movilidad espermática, así como un mayor número de espermatozoides con morfología normal. También se apreció una mejora en la capacidad antioxidante evaluada mediante la cuantificación de niveles de Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa. Safarinajed encontró una relación positiva entre ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) en plasma seminal con los parámetros seminales y la

capacidad antioxidante, a la vez que reportó una relación entre la actividad SOD y catalasa con parámetros seminales como concentración, movilidad y morfología.

En otro estudio, Comhaire (23) evaluó el efecto sobre la calidad seminal de la administración conjunta de antioxidantes (N acetil cisteína o vitaminas A + E) con ácidos grasos esenciales (1 g de DHA, 0.25g de ácido gamma linolénico y 0.1 de ácido araquidónico) durante un periodo de 6 meses en 27 pacientes. Encontró una mejora en la concentración de espermatozoides en pacientes oligozoospermicos, sin observar mejoría en la movilidad ni en la morfología espermática de estos pacientes. Sin embargo constató una reducción estadísticamente significativa de la producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS) y de la oxidación espermática, evaluada mediante 8 hidroxil-deoxiguanosina (8-OH-dg).

Vitamina C

El ácido Ascórbico es el principal antioxidante presente en el plasma seminal. Sus valores son 10 veces superiores a los encontrados en plasma sanguíneo (24). Son varios los estudios que valoran los efectos de la administración de vitamina c, tanto en forma aislada como asociada a otros antioxidantes, sobre la calidad seminal. En un estudio publicado por Dawson (25) se evaluó el efecto de su administración en fumadores encontrando una mejoría en concentración, morfología y vitalidad a partir de 200mg/24 horas durante un periodo de 1 mes. La mejoría fue superior cuando las dosis fueron de 1000mg/24horas.

En otro estudio, el grupo de Kodama evaluó el efecto de la combinación de Vitamina E (200mg/24 horas), vitamina C (200mg/24 horas) y GSH (400mg/24 horas) en pacientes infértiles durante dos meses y comprobó que se producía una mejoría en la concentración espermática y una disminución en los niveles de fragmentación de ADN espermático (26).

En un reciente ensayo clínico se ha evaluado el efecto de la administración de vitamina C en pacientes tras varicocelectomía observándose que aquellos varones que recibieron 250mg/24 horas de ácido ascórbico durante 3 meses presentaban una mayor movilidad y mejor morfología espermática que aquellos pacientes que recibieron placebo (27).

Sin embargo, también podemos encontrar ejemplos de ensayos clínicos en los cuales no se observan mejoras en los parámetros seminales tras la administración de vitamina C (28,29) quizás debido a la administración de dosis inferiores a las administradas en otros ensayos o bien a un tiempo de administración más reducido.

Coenzima Q 10

La coenzima Q10 es una molécula que forma parte de la cadena transportadora de electrones y que ha despertado un gran interés en diferentes campos de la medicina debido

a sus propiedades antioxidantes. En un meta análisis realizado por Lafuente (30) donde se incluyeron estudios con diferentes concentraciones de coenzima Q10 y durante diferentes periodos de administración, (200mg/día durante 24 semanas (31), 300mg/día durante 26 semanas (32)), se observa que la administración de coenzima Q10 ocasiona un incremento en la movilidad y concentración espermática. Sin embargo no se aprecia un aumento en las tasas de embarazo.

En cambio en otro estudio donde se administró 200mg/día durante 12 semanas (33) a varones astenozoospermicos no se produjo variación en los parámetros seminales aunque se observó una disminución del estrés oxidativo. Quizás la diferencia con los resultados de otros estudios en los que se utilizaba similar concentración se deba al tiempo de administración.

L-Carnitina

La carnitina es una amina cuaternaria sintetizada a partir de dos aminoácidos esenciales, la metionina y la lisina. La carnitina es responsable del transporte de ácidos grasos al interior de las mitocondrias y de su correspondiente beta oxidación, además de tener propiedades antioxidantes (34). Tanto L-carnitina como acetil L-carnitina se encuentran en altas concentraciones en el epidídimo y juegan un importante papel en el metabolismo y maduración espermática habiéndose encontrado una correlación entre la concentración de L-carnitina y la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (35).

La administración conjunta de 1g de L-carnitina y 0,5g de acetil carnitina al día durante 3 meses en pacientes con prostatitis vesiculitis está asociado a una significativa disminución de la producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS) así como a un aumento en la movilidad progresiva y la viabilidad de los espermatozoides (36).

Por otra parte, la administración de 2g/día de L-carnitina durante tres meses ocasiona una mejoría en los parámetros seminales en concreto en la movilidad y en la concentración espermática siendo este incremento mayor en aquellos varones que presentaban una peor calidad seminal (37). De igual modo, la administración conjunta de al menos 3g/día de L-carnitina conjuntamente con Acetil carnitina produce un incremento en la concentración espermática en pacientes astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos (35).

Vitamina E

La vitamina E es un antioxidante liposoluble capaz de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) de la peroxidación lipídica. Debido a estas propiedades se han realizado diversos estudios evaluando su eficacia en el factor masculino tanto en su uso *in vitro* como *in vivo*.

Así, se ha comprobado en ciertos estudios que su utilización *in vitro* reduce la peroxidación lipídica a la vez que protege a los espermatozoides de una disminución en su movilidad (38-40). Otros efectos reportados de su uso *in vitro* son la disminución en la producción de H_2O_2 así como de la fragmentación de ADN (41).

En su utilización *in vivo*, se ha administrado vitamina E en diferentes dosis y tiempos de tratamiento obteniéndose resultados distintos. Así Kessopoulou administró 600mg/día durante 3 meses sin observar mejoras en la calidad seminal (42). El mismo resultado se obtuvo al administrar distintas dosis de vitamina E (600, 800 y 1200 mg/día) durante un corto periodo de tiempo 3 semanas (43). Sin embargo la administración de 300mg /día de vitamina E durante un mayor tiempo de administración, 6 meses, originó una mejora en los parámetros de movilidad espermática así como una disminución en los niveles de malonaldehído, marcador de peroxidación, en pacientes astenozoospermicos (44).

En los estudios realizados valorando la administración conjunta de vitamina E con otros antioxidantes, los resultados también han sido dispares. Mientras que la administración de 400 mg de vitamina E y 225µg de Selenio durante 3 meses originaba un aumento en la movilidad espermática y una disminución en la peroxidación lipídica (45), en otros estudios en los que se administraban Vitamina C y E no se ha observado modificación de los parámetros seminales clásicos, a pesar de encontrar una disminución en la fragmentación de ADN (29,46).

Selenio

El selenio (Se) es un micronutriente esencial para el desarrollo de un gran número de funciones biológicas y se encuentra en elevadas concentraciones en las muestras seminales. Se ha asociado con la función reproductiva masculina (47,48) y son varios los estudios realizados utilizando Se tanto de forma aislada como en combinación con antioxidantes para valorar su utilidad en la mejora de la calidad seminal.

Iwanier & Zachara evaluaron la administración de 200 µg/día de selenio durante un periodo de 3 meses, sin encontrar mejoras ni en concentración, ni en movilidad o morfología espermática (49). Sin embargo en la administración conjunta de selenio con diferentes vitaminas si se ha reportado una mejora en la calidad seminal. Así, en un estudio realizado por Scott se comprobó que 100 µg de selenio junto con 1mg de vitamina A, 10mg de vitamina C y 15 mg de vitamina E durante 3 meses ocasionó una mejoría en la movilidad espermática (50). De igual modo la administración conjunta con vitamina E durante 3 meses originó el mismo resultado.

Zinc

El zinc (Zn) es un mineral con actividad antioxidante y presente en las muestras seminales. Diversos estudios se han realizado evaluando la suplementación con este mineral. En un

estudio con grupo control en el que se incluyeron 100 varones astenozoospermicos, se administró 250mg de Zn dos veces al día durante 3 meses. Se observó una mejora en la concentración de espermatozoides, en la movilidad progresiva así como en la capacidad fecundante de los espermatozoides (51).

Al igual que en la mayoría de las sustancias antioxidantes estudiadas, también se ha evaluado su administración conjunta con otras sustancias. En un estudio posterior se demostró que la administración conjunta de Zn con ácido fólico en pacientes astenozoospermicos que habían sido sometidos a una varicocelectomía producía una mejora en la calidad seminal (52). También la administración conjunta de Zn con vitamina E y C mejora la movilidad espermática (53).

Ácido Fólico

El ácido fólico, debido a su importante implicación en la síntesis de ADN y ARN así como en otras funciones reproductivas ha sido también objeto de estudio en el campo de la medicina reproductiva. Niveles bajos de ácido fólico en el plasma seminal han sido asociados a la presencia de elevados índices de fragmentación de ADN espermático (54).

Apenas existen estudios en que se analice el efecto aislado del ácido fólico. La mayoría de ellos se han centrado en su administración conjunta con otras moléculas. Raigani reportó que la administración conjunta de 5mg diarios de ácido fólico y 220mg de zinc durante un periodo de 16 semanas no mejoró la calidad seminal (55). Sin embargo, otros autores no coinciden con estos resultados, en dos artículos publicados por Wong y Ebisch (56,57) se aprecia que la administración diaria de 5mg de ácido fólico y 66 mg de Zn durante un periodo de 26 semanas ocasiona un aumento en la concentración espermática.

L- Arginina

La arginina es un aminoácido que también ha sido estudiado como suplemento alimenticio en casos de factor masculino. Dos son los principales estudios que han sido planteados. En uno de ellos se administró 4g/día de arginina vs placebo en 64 pacientes oligozoospermicos durante un periodo de 12 semanas. No se observó una mejora ni en los parámetros seminales ni en las tasas de embarazo en comparación con el grupo placebo (58).

En otro estudio posterior se administró 1660 mg de L-arginina, 150 mg de carnitina, 50 mg acetyl-carnitina y 200 mg de ginseng frente a un grupo que no recibió tratamiento (n=180). La duración del tratamiento fue de 3 meses. Se observó una mejora significativa de la movilidad espermática en el grupo que recibió tratamiento (59).

Autor	Sustancia	Dosis	Duración Tratamiento	Efecto observado
Conquer(2000)	DHA	0,400,800mg/día	3 meses	No mejora movilidad ni concentración
Safarinejad (2011)	DHA+EPA	1840mg/día	32 semanas	Mejora concentración, movilidad y morfología Incremento sistema antioxidante
Comhaire (2000)	N acetil cisteína y vitaminas A + E junto con ácidos grasos esenciales)	1000mg de DHA	6 meses	Aumento de concentración espermática Disminución en la producción ROS
Dawson (1992)	Vitamina C	200 a 100mg/día	1 mes	Incremento en la concentración , morfología y vitalidad
Kodama (1997)	Vitamina E+C+GSH	200 mg vitaminas E y C y 400mg de GSH diarias	2 meses	Incremento en la concentración y disminución en niveles de fragmentación ADN
Cyrus (2015)	Vitamina C	250mg/día	3 meses	Mejora en Movilidad y morfología
Rolf (1999)	Vitamina C y vitamina E	Vitamina C 1000mg/día Vitamina E 800mg/día	56 días	No se observan mejoras en los parámetros seminales
Lafuente (2013)	Coenzima Q10	200 a 300mg/día	12 a 26 semanas	Incremento en la movilidad y la concentración espermática
Vicari (2001)	L- Carnitina+ acetil Carnitina	1g de L-Carnitina 0,5g de Acetil Carnitina	3 meses	Disminución producción de sustancias Ros. Incremento en la movilidad y viabilidad
Lenzi (2003)	L Carnitina	2 g /día	2 meses	Mejora movilidad y concentración espermática
Agarwall (2004)	L- Carnitina+ acetil Carnitina	3 g/día		Incremento en la concentración espermática
Kessopoulou (1995)	Vitamina E	600mg/día	3 meses	No observa mejoras en la calidad seminal
Moilanen (1995)	Vitamina E	600,800,1200mg/día	3 semanas	No observa mejoras en la calidad seminal
Suleiman (1996)	Vitamina E	300mg/día	6 meses	Incremento en la movilidad espermática y disminución de la peroxidación lipídica
Keske-Ammar (2003)	Vitamina E + Selenio	400mg + 225 µg/día	3 meses	Disminución de la peroxidación lipídica. Incremento en la movilidad
Greco (2005)	Vitamina C + E	1+1g/24h	2 meses	Disminuye fragmentación ADN
Iwanier (1995)	Se	200 µg/día	3 meses	No observa mejoras en la calidad seminal
Scott (1998)	Se+ vitaminas A,C,E	Se (100 µg) Vitamina A 1mg/día Vitamina C 10mg/ día Vitamina e 15mg/día	3 meses	Incremento en la movilidad espermática
Omu (1998)	Zn	500mg/día	3 meses	Incremento de la concentración y movilidad espermática así como de la capacidad fecundante de los espermatozoides
Azizolla (2013)	Zn+ Ac fólico	Zn 66mg/día Ácido Fólico 5mg/día	6 meses	Mejora de parámetros seminales
Raigani (2014)	Ac. Fólico + Zinc	Ac. Fólico (5mg/día) Zinc (220mg/día)	16 semanas	No mejora los parámetros seminales
Wong (2002)	Zn + Ac Fólico	Ácido Fólico (5mg/día) Zn (66mg/día)	26 semanas	Incremento en la concentración espermática
Ebisch (2006)	Zn + Ac Fólico	Ácido Fólico (5mg/día) Zn (66mg/día)	26 semanas	Incremento en la concentración espermática
Pryor (1998)	Arginina	4g/día	12 semanas	No mejoran los parámetros seminales ni tasa de embarazo
Morgante (2010)	Carnitina+Acetil carnitina+ L- Arginina+ Ginseng	Carnitina (150mg/día) Acetil Carnitina(50mg/día) L-Arginina (1660 mg/día) Ginseng (200mg/día)	3 meses	Aumento de la movilidad espermática

Tabla 1: Resumen de los resultados de distintos ensayos clínicos con sustancias antioxidantes

8. Conclusiones

No cabe duda que los hábitos de vida y la exposición a determinados contaminantes tienen un impacto importante sobre la fertilidad. Entender cuáles de estos factores pueden perjudicar la fertilidad de un paciente debería ser un objetivo del clínico para intentar dar las máximas oportunidades de concebir a los pacientes. Un entendimiento del impacto de ciertos hábitos sobre la salud reproductiva, junto con una actitud de modificación activa de estas conductas, facilitarán que tanto hombres como mujeres controlen mejor ciertos aspectos de su propia fertilidad.

En este libro se ha realizado una revisión de los factores más relevantes, pero también hay estudios que valoran los efectos de la nutrición, la obesidad, los diferentes tipos de medicación, de estimulantes como la cafeína, la radiación, el uso de ropa ajustada, los baños calientes o saunas, o incluso la falta de programación regular de visitas con el médico como tratamiento preventivo. La interacción de cada uno de estos factores puede dificultar el entendimiento de sus posibles efectos en la fertilidad masculina. Por otro lado, debido a una respuesta diferente de cada organismo hacia estas sustancias, es complicado determinar cuál es la cantidad máxima recomendada de sustancias como el alcohol, el tabaco u otros, para que no afecten a la fertilidad. El estudio de la función masculina debería conjugar por tanto el examen seminal con una correcta evaluación de tóxicos ambientales y/o laborales, drogas de abuso y hábitos de vida que pueden influir en la fertilidad del varón. Por otra parte podemos destacar que la terapia antioxidante parece mejorar la calidad seminal tras su administración por un periodo de 3 a 6 meses, siendo la movilidad espermática la que con mayor frecuencia mejora en la mayoría de los estudios, así como una reducción de las sustancias oxígeno reactivas. Sin embargo la etiología del factor masculino es muy variada con lo cual no se puede asegurar que este tipo de tratamiento sea efectivo en todos los pacientes. Por todo ello, sería necesaria la realización de ensayos clínicos bien diseñados que nos permitan definir tanto el tipo de pacientes susceptibles de beneficiarse de estos tratamientos como las dosis y tiempo de administración a utilizar, ya que la mayoría de los estudios publicados no alcanzan un alto nivel de evidencia científica como queda demostrado en la revisión de antioxidantes e infertilidad masculina de la Cochrane de 2014.

En resumen, sería muy aconsejable antes de cualquier tratamiento específico de reproducción asistida, asesorar y recomendar hábitos de vida saludable:

- disminuir las exposiciones innecesarias a factores medioambientales nocivos,
- eliminar el tabaco, drogas, etc.,

- realizar ejercicio moderado que además ayuda a disminuir el posible estrés asociado a un tratamiento de Reproducción Asistida,
- alimentación saludable y equilibrada aumentando la ingesta de frutas y verduras.

El control y el seguimiento de la capacidad fértil del varón, del estudio espermático y sus alteraciones se debe llevar a cabo por profesionales que visitan, evalúan, diagnostican y tratan a ambos miembros de la pareja que consulta por procesos de infertilidad. Aunque no siempre se pueda establecer una acción directa sobre el tóxico es importante detectar la situación reproductiva del paciente, y para ello existen especialistas andrólogos/urólogos que recogerán la anamnesis y la historia clínica teniendo en cuenta el entorno profesional (contacto con pinturas, diluyentes, metales, etc.), el entorno social (lugar de residencia) y los hábitos tóxicos (tabaco, alcohol, drogas, etc.). Ante la sospecha de riesgo tóxico no es descartable solicitar la determinación tóxica en sangre o en muestra seminal. No cabe duda que la educación social se inicia en la escuela recomendando hábitos de vida saludables sobre todo en la dieta, en la que se debería eliminar la moda de los “fast food” ricos en grasa saturada, aumentar la ingesta de fibra y saber detectar aquellos elementos tóxicos en el entorno.

La figura 1 muestra un esquema de actuación que resume el papel de las diferentes organizaciones de cara a controlar e intentar mejorar las condiciones medioambientales. Estos circuitos deberían garantizar que la contaminación ambiental no supere los niveles máximos establecidos, lo que debería traducirse en una disminución del estrés oxidativo de las células espermáticas, garantizándose mejores condiciones de fertilidad para ambos miembros de la pareja.



Fig. 1. Esquema de actuación para la optimización de la calidad seminal y disminución de la infertilidad masculina

9. Referencias Bibliográficas

Introducción

1. William King. Conferencia de la Asociación Británica para el Avance de la Ciencia . 1863
2. Rouhi, Maureen «Top Pharmaceuticals: Thalidomide». Chemical & Engineering News .2005
3. Teramoto S, et al. Genetic toxicology of 1,2-dibromo-3-chloropropano DBCP –Mutat Res. 1989 Jul 221(1) 1:9
4. Krause W. Drugs compromising male sexual health. Springer. Berlin / Heidelberg / New York .2008.
5. Kumar S, et al. Environmental & lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. Indian J. Med.Res. 2014 <nov.140 Suppl: S29-35

Capítulo 1

1. Kavlock RJ, Daston GP, De Rosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of Elath and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect. 1996; 104:715–40.
2. Nash JP, Kime DE, Van der Ven LTM, Wester PW, Brion F, Maack G, et al. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical etinilestradiol causes reproductive failure in fish. Environ Health Perspect. 2004; 112:1725–33.
3. Olea N , Fernández MF, Martín P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobioticos estrogenicos I. Estrogenos naturales. Rev. Salud Ambient 2001;1(1): 6-11
4. McLachlan JA. Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. Environ Health Perspect. 1993; 101: 386-7
5. Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. Development effects of endocrine-disrupting chemical in wildlfe and humans. Environ Health Perspect. 1993; 101:378-84

6. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:961-6.
7. Travison TG, Araujo AB, O'Donnell AB, Kupelian V, McKinlay JB. A population-level decline in serum testosterone levels in American men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:196-202.
8. Jeng HA. Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. *Front Public Health.* 2014; 2:55.
9. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996 ; 65:1009-1014.
10. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reprod.* 2001;16:972-978
11. Fernandez MF, Olmos B, Granada A, López-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, et al. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect.* 2007;115 Suppl 1:8-14.
12. López-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, Molina-Molina JM, Puertollano MC, Rivas A, et al. Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Additives and Contaminants.* 2007; 24(1):95-102
13. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007; Aug-Sep;24(2):139-77.
14. Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids. *J Agric Food Chem.* 1997; 45:3541-4.
15. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect.* 2008; 116:39-44.
16. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 2007; 24:178-98.
17. Al-Hiyasat AS, Darmani H. In vivo effects of BISGMA-a component of dental composite on male mouse reproduction and fertility. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 78:66-72.

18. Furuya M, Adachi K, Kuwahara S, Ogawa K, Tsukamoto Y. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by bisphenol-A. *Life Sci.* 2006; 78:1767–76.
19. Knez J, Kranvogel R, Breznik BP, Voncina E, Vlasisavljevic V. Are urinary bisphenol A levels in men related to semen quality and embryo development after medically assisted reproduction? *Fertil Steril.* 2013; 101:215
20. Xiao GB, Wang RY, Cai YZ, He GH, Zhou ZJ. Effect of bisphenol A on semen quality of exposed workers: a pilot study. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2009; 27:741–743.
21. Vrooman LA, Oatley JM, Griswold JE, Hassold TJ, Hunt PA. Estrogenic Exposure Alters the Spermatogonial Stem Cells in the Developing Testis, Permanently Reducing Crossover Levels in the Adult. *PLoS Genet.* 2015; Jan 23;11(1):e1004949
22. Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, Redmon JB, et al. Are environmental levels of bisphenol A associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect.* 2010; 118:1286–91.
23. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, et al. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol.* 2010; 30:532–9.
24. Meeker JD, Yang T, Ye X, Calafat AM, Hauser R. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(2):252–7.
25. ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry). Toxicological Profile for Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services (2002).
26. CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated Tables. Centers for Disease Control and Prevention, Washington, DC. (2015)
27. Pan Y, Jing J, Dong F, Yao Q, Zhang W, Zhang H, Yao B, Dai J. Association between phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in 1066 Chinese men of reproductive age. *J Hazard Mater.* 2015; 300:729-736.
28. Bloom MS, Whitcomb BW, Chen Z, Ye A, Kannan K, Buck Louis GM. Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population. *Hum Reprod.* 2015; 30(11):2645-57

29. Prados J, Stenz L, Somme E, Stouder C, Dayer A, Paoloni-Giacobino A. Prenatal Exposure to DEHP Affects Spermatogenesis and Sperm DNA Methylation in a Strain-Dependent Manner. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0132136
30. Lottrup G, Andersson AM, Leffers H, Mortensen GK, Toppari J, Skakkebaek NE, Main KM. Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *Int J Androl*. 2006; 29(1):172-80
31. Srivastava S, Singh GB, Srivastava SP, Seth PK. Testicular toxicity of di-n-butyl phthalate in adult rats: effect on marker enzymes of spermatogenesis. *Indian J Exp Biol*. 1990; 28:67-70.
32. Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, et al. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology*. 2003; 14:269-77.
33. Duty S, Calafat AM, Silva MJ, Brock JW, Ryan L, Chen Z, et al. The relationship between environmental exposure to phthalates and computer-aided sperm analysis motion parameters. *J Androl*. 2004; 25:293-302.
34. Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 2006; 17:682-91.
35. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, et al. Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure, sperm aneuploidy and reproductive hormones. *Reprod Toxicol*. 2013; 42:232-41.
36. Wirth JJ, Rossano MG, Potter R, Puscheck E, Daly DC, Paneth N, et al. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Syst Biol Reprod Med*. 2008; 54:143-54.
37. Cai H, Zheng W, Zheng P, Wang S, Tan H, He G, Qu W. Human urinary/seminal phthalates or their metabolite levels and semen quality: A meta-analysis. *Environ Res*. 2015; 142:486-494.
38. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *J Androl*. 2009; 30:287-297.
39. Mendiola J, Jørgensen N, Andersson A, Calafat A, Silva M, Redmon J, et al. Associations between urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormones in fertile men. *Int J Androl*. 2010; 14:1-10.
40. Chang WH, Li SS, Wu MH, Pan HA, Lee CC. Phthalates might interfere with testicular function by reducing testosterone and insulin-like factor 3 levels. *Hum Reprod*. 2015; 30(11):2658-70

41. Turusov V, Rakitsky V, Tomatis L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence and risks. *Res Rev.* 2002; 110:125–8.
42. Bhatia R, Shiao R, Petreas M, Weintraub JM, Farhang L, Eskenazi B. Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child Elath and development studies. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:220–4.
43. Guillette LJ Jr, Moore BC. Environmental contaminants, fertility, and multiocytic follicles: a lesson from wildlife? *Semin Reprod Med.* 2006; 24:134–41.
44. Rignell-Hydbom A, Rylander L, Giwercman A, Jönsson BAG, Nilsson-Ehle P, Hagmar L. Exposure to CB-153 and p,p0-DDE and male reproductive function. *Hum Reprod.* 2004; 19:2066–75.
45. De Jager C, Farias P, Barraza-Villarreal A, Avila MH, Ayotte P, Dewailly E, et al. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p0-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study. *J Androl.* 2006; 27:16–27.
46. Fernandez MF, Molina-Molina JM, Lopez-Espinosa MJ, Freire C, Campoy C, Ibarluzea J, Torne P, Pedraza V, Olea N. Biomonitoring of environmental estrogens in human tissues. *Int J Hyg Environ Health.* 2007; 210(3-4):429-32.
47. Aneck-Hahn NH, Schulenburg GW, Bornman MS, Farias P, de Jager C. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *J Androl.* 2007; 28:423–34.
48. Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect.* 2003; 111:1505–1511.
49. Aguilar-Garduño C, Lacasaña M, Blanco-Muñoz J, Rodríguez-Barranco M, Hernández AF, Bassol S, et al. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. *Toxicology* 2013; 307:55–65.
50. Dirican EK, Kalender Y. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol.* 2012; 64:821–830.
51. Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, Aguilar-Garduño C, Blanco-Muñoz J, Pérez-Méndez O, et al. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 243:19–26.

52. Melgarejo M, Mendiola J, Koch HM, Moñino-García M, Noguera-Velasco JA, Torres-Cantero AM. Associations between urinary organophosphate pesticide metabolite levels and reproductive parameters in men from an infertility clinic. *Environ Res.* 2015 ; 137:292-8.
53. Perry MJ, Venners S, Chen X, Liu X, Tang G, Xing H, et al. Organophosphorous pesticide exposures and sperm quality. *Reprod Toxicol.* 2011; 31:75–79.
54. Kania-Korwel I, El-Komy MH, Veng-Pedersen P, Lehmler HJ. Clearance of polychlorinated biphenyl atropisomers is enantioselective in female C57Bl/6 mice. *Environ Sci Technol.* 2010; 44:2828–35.
55. Norstrom K, Czub G, McLachlan MS, Hu D, Thorne PS, Hornbuckle KC. External exposure and bioaccumulation of PCBs in humans living in a contaminated urban environment. *Environ Int.* 2010; 36:855–61.
56. Aly HA, Domenech O, Abdel-Naim AB. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47:1733–8.
57. Hauser R, Williams P, Altshul L, Calafat AM. Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalates in relation to human sperm motility. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:425.
58. Hauser R, Altshul L, Chen Z, Ryan L, Overstreet J, Schiff I, et al. Environmental organochlorines and semen quality: results of a pilot study. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:229–33.
59. Bonde JP, Toft G, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Giwercman A, Spano M, et al. Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect.* 2008; 116:269–77.
60. Virtanen HE, Adamsson A. Cryptorchidism and endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 355: 208–220
61. Amaral Mendes JJ. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:781–8.
62. Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod.* 2005; 20:604–10.
63. Jönsson AG, Richthoff J, Rylande L, Giwercman A, Lars H. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* 2005; 16:487–93.

64. Dankers AC, Roelofs MJ, Piersma AH, Sweep FC, Russel FG, Van den Berg M, et al. Endocrine disruptors differentially target ATP-binding cassette transporters in the blood-testis barrier and affect Leydig cell testosterone secretion in vitro. *Toxicol Sci.* 2013;136:382-91
65. Delbes C, Levacher C, Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 2006; 132:527–38.
66. Jones HB, Garside DA, Lu R, Roberts JC. The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in Vitro and in vivo. *Exp Mol Pathol.* 1993; 58:179–93.
67. Sharpe RM. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett.* 2001; 120:221–32.
68. Desdoits-Lethimonier C, Albert O, Le Bizec B, Perdu E, Zalko D, Courant F, et al. Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum Reprod.* 2012; 27:1451–9.
69. Foster PM. Mode of action: impaired fetal Leydig cell function – effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Crit Rev Toxicol.* 2005; 35:713–9.
70. Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, Sar M, Gaido KW, Foster PM. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci.* 2003; 73:431–41.
71. Heindel JJ, Powell CJ. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992; 115:116–23.
72. Bulger WH, Nuccitelli RM, Kupfer D. Studies on the in vivo and in Vitro estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites role of hepatic monooxygenase in methoxychlor activation. *Biochem Pharmacol.* 1978; 27:2417–23.
73. Rodriguez H, Bustos-Obregon E. An Vitro model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in Mouse seminiferous tubules. *Andrologia* 2000; 32:1–5.
74. Contreras HR, Bustos-Obregón E. Morphological alterations in Mouse testis by a single dose of malathion. *J Exp Zool* 1999; 284:355–359.
75. White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994; 135:175–82.

Capítulo 2

1. Kurzrock EA, Jegatheesan P, Cunha GR, Baskin LS. Urethral development in the fetal rabbit and induction of hypospadias: a model for human development. *J Urol*. 2000 Nov; 164(5):1786–92.
2. Salazar-Martinez E, Romano-Riquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health*. 2004; 3(1):8.
3. Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res*. 2008 Oct; 108(2): 177–84.
4. Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect*. 2009 Nov; 117(11):1786–90.
5. Sathyanarayana S, Beard L, Zhou C, Grady R. Measurement and correlates of ano-genital distance in healthy, newborn infants. *Int J Androl*. 2010 Apr; 33(2):317–23.
6. Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, McKinnell C, Drake AJ, Sharpe RM. Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology*. 2008 Oct; 149(10):5280–7.
7. Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, et al. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl*. 2010 Apr; 33(2):279–87.
8. Mendiola J, Stahlhut RW, Jørgensen N, Liu F, Swan SH. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environ Health Perspect*. 2011 Jul; 119(7):958–63.
9. Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. *PLoS ONE*. 2011; 6(5):e18973.
10. Dean A, Sharpe RM. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jun; 98(6):2230–8.
11. Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014 Apr; 21(8):5457–64.

12. Parra MD, Mendiola J, Jørgensen N, Swan SH, Torres-Cantero AM. Anogenital distance and reproductive parameters in young men. *Andrologia*. 2015 Feb 3;
13. Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberg JG, et al. A mixture of the “antiandrogens” linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biol Reprod*. 2004 Dec;71(6):1852–61.
14. Mitchell RT, Mungall W, McKinnell C, Sharpe RM, Cruickshanks L, Milne L, et al. Anogenital distance plasticity in adulthood: implications for its use as a biomarker of fetal androgen action. *Endocrinology*. 2015 Jan;156(1):24–31.
15. Welsh M, Saunders PTK, Finken M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1479–90.
16. Gray LE, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl*. 2006 Feb;29(1):96–104; discussion 105–8.
17. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR, et al. Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol*. 2004 Apr;18(2):241–64.
18. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci*. 2000 Dec;58(2):339–49.
19. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect*. 2005 Aug;113(8):1056–61.
20. Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RHN, et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Hum Reprod*. 2015 Apr;30(4):963–72.
21. Bustamante-Montes LP, Hernández-Valero MA, Flores-Pimentel D, García-Fábila M, Amaya-Chávez A, Barr DB, et al. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. *J Dev Orig Health Dis*. 2013 Aug;4(4):300–6.
22. Bornehag C-G, Carlstedt F, Jönsson BAG, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, et al. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect*. 2015 Jan;123(1):101–7.

23. Torres-Sanchez L, Zepeda M, Cebrián ME, Belkind-Gerson J, Garcia-Hernandez RM, Belkind-Valdovinos U, et al. Dichlorodiphenyldichloroethylene exposure during the first trimester of pregnancy alters the anal position in male infants. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1140:155–62.
24. Miao M, Yuan W, He Y, Zhou Z, Wang J, Gao E, et al. In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*. 2011 Oct;91(10):867–72.
25. Papadopoulou E, Vafeiadi M, Agramunt S, Mathianaki K, Karakosta P, Spanaki A, et al. Maternal diet, prenatal exposure to dioxins and other persistent organic pollutants and anogenital distance in children. *Sci Total Environ*. 2013 Sep 1;461-462:222–9.
26. Vafeiadi M, Agramunt S, Papadopoulou E, Besselink H, Mathianaki K, Karakosta P, et al. In utero exposure to dioxins and dioxin-like compounds and anogenital distance in newborns and infants. *Environ Health Perspect*. 2013 Jan;121(1):125–30.
27. Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. *Curr Urol Rep*. 2008 Mar;9(2):137–42.
28. Hsieh MH, Eisenberg ML, Hittelman AB, Wilson JM, Tasian GE, Baskin LS. Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenital distance. *Hum Reprod*. 2012 Jun;27(6):1577–80.
29. Jain VG, Singal AK. Shorter anogenital distance correlates with undescended testis: a detailed genital anthropometric analysis in human newborns. *Hum Reprod*. 2013 Sep;28(9):2343–9.
30. Thankamony A, Lek N, Carroll D, Williams M, Dunger DB, Acerini CL, et al. Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ Health Perspect*. 2014 Feb;122(2):207–11.
31. Barrett ES, Parlett LE, Sathyanarayana S, Liu F, Redmon JB, Wang C, et al. Prenatal exposure to stressful life events is associated with masculinized anogenital distance (AGD) in female infants. *Physiol Behav*. 2013 Apr 10;114-115:14–20.
32. Park JY, Lim G, Oh KW, Ryu DS, Park S, Jeon JC, et al. Penile length, digit length, and anogenital distance according to birth weight in newborn male infants. *Korean J Urol*. 2015 Mar;56(3):248–53.
33. Buck JJ, Williams RM, Hughes IA, Acerini CL. In-utero androgen exposure and 2nd to 4th digit length ratio-comparisons between healthy controls and females with classical congenital adrenal hyperplasia. *Hum Reprod*. 2003 May;18(5):976–9.

34. Mendiola J, Melgarejo M, Moñino-García M, Cutillas-Tolín A, Noguera-Velasco JA, Torres-Cantero AM. Is anogenital distance associated with semen quality in male partners of subfertile couples? *Andrology*. 2015 Jul;3(4):672–6.
35. Mendiola J, Jørgensen N, Andersson A-M, Stahlhut RW, Liu F, Swan SH. Reproductive parameters in young men living in Rochester, New York. *Fertil Steril*. 2014 Apr;101(4):1064–71.
36. Eisenberg ML, Lipshultz LI. Anogenital distance as a measure of human male fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Mar;32(3):479–84.
37. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3777–82.
38. Eisenberg ML, Hsieh T-C, Pastuszak AW, McIntyre MG, Walters RC, Lamb DJ, et al. The relationship between anogenital distance and the androgen receptor CAG repeat length. *Asian J Androl*. 2013 Mar;15(2):286–9.
39. Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J Urol*. 2012 Feb;187(2):594–8.
40. Castaño-Vinyals G, Carrasco E, Lorente JA, Sabaté Y, Cirac-Claveras J, Pollán M, et al. Anogenital distance and the risk of prostate cancer. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt B):E707–10.
41. Eisenberg ML, Shy M, Walters RC, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and azoospermia in adult men. *Int J Androl*. 2012 Oct;35(5):726–30.
42. Eisenberg ML, Shy M, Herder D, Walters RC, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and the efficacy of varicocele repair. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt C):E927–30.

Capítulo 3

1. World Health Organization (WHO) Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th Edition. Geneva, World Health Organization, 2010.
2. Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. *The Lancet*. 2002;360(9341):1233-1242.
3. 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(3):368-378.

4. Sava F, Carlsten C. Respiratory Health Effects of Ambient Air Pollution. *Clinics in Chest Medicine*. 2012;33(4):759-769.
5. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet Oncology*. 2013;14(13):1262-1263.
6. Jevtic M, Dragic N, Bijelovic S, Popovic M. Cardiovascular diseases and air pollution in Novi Sad, Serbia. *Int J Occup Med Environ Health*. 2014 Apr;27(2):153-64.
7. Yang C, Chen A, Chen R, Qi Y, Ye J, Li S, et al. Acute effect of ambient air pollution on heart failure in Guangzhou, China. *Int J Cardiol*. 2014 Dec 15;177(2):436-41.
8. Rubes J, Selevan SG, Sramc 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
9. Rubes J, Rybar R, Prinosilova P, Veznik Z, Chvatalova I, Solansky I, Sram RJ. Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res*. 2010, Jan 5;683(1-2):9-15
10. European Environment Agency (EEA). Europe's environment. The fourth assessment. Denmark. ISBN 978-92-9167-932-4. EEA, Copenhagen, 2007
11. Mohallem SV, de Araújo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de Andre PA, Saldiva PHN, et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. 2005 Jun;98(2):196-202.
12. Watanabe N, Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environmental Health Perspectives*. 1999;107(7):539-44.
13. Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett*. 2005 Jan 15;155(1):51-8.
14. Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, et al. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol*. 2007 Mar;19(3):275-81.
15. Pires A, de Melo EN, Mauad T, Nascimento Saldiva PH, de Siqueira Bueno HM. Pre- and postnatal exposure to ambient levels of urban particulate matter (PM(2.5)) affects mice spermatogenesis. *Inhal Toxicol*. 2011 Mar;23(4):237-45.

16. Srám R. Impact of air pollution on reproductive health. *Environ Health Perspect.* 1999 Nov;107(11):A542–3.
17. 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 Oct;20(10):2776–83
18. 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 Sep;108(9):887–94.
19. Perreault SD, Rubes J, Robbins WA, Evenson DP, Selevan SG. Evaluation of aneuploidy and DNA damage in human spermatozoa: applications in field studies. *Andrologia.* 2000 Sep;32(4-5):247–54.
20. De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, et al. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod.* 2003 May;18(5):1055–61.
21. 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 Jun;34(6):e139–43.
22. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Polańska K, Radwan P, Jakubowski L, Ulańska A, Hanke W. The Relationship between exposure to air pollution and sperm disomy. *Environ Mol Mutagen.* 2015 Jan;56(1):50-9
23. 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 Dec;40(6):346–51.
24. 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 May;32(5):430–4.
25. Hammoud A, Carrell DT, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Peterson CM. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril.* 2010 Apr;93(6):1875–9.
26. Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, et al. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect.* 2010 Feb;118(2):203–9.

27. 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 Apr;187:145–52.
28. Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect*. 2006 Mar;114(3):360–5.
29. Faure AC, Viel J-F, Bailly A, Blagosklonov O, Amiot C, Roux C. Evolution of sperm quality in men living in the vicinity of a municipal solid waste incinerator possibly correlated with decreasing dioxins emission levels. *Andrologia*. 2014 Sep;46(7):744–52.
30. Radwan M, Jurewicz J, Polańska K, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Exposure to ambient air pollution-does it affect semen quality and the level of reproductive hormones? *Ann Hum Biol*. 2016 Jan;43(1):50-6.
31. Deng Z, Chen F, Zhang M, Lan L, Qiao Z, Cui Y, An J, Wang N, Fan Z, Zhao X, Li X. Association between air pollution and sperm quality: A systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut*. 2016 Jan;208(Pt B):663-9
32. Fathi Najafi T, Latifnejad Roudsari R, Namvar F, Ghavami Ghanbarabadi V, Hadizadeh Talasaz Z, Esmaeli M. Air pollution and Quality of Sperm: a Meta-analysis. *Iran Red Crecent Med J*. 2015 April;17(4):e26930
33. Wijesekara GU, Fernando DM, Wijerathna S, Bandara N. Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility. *Ceylon Med J* 2015 Jun; 60(2): 52-6
34. Taha EA, Sayed SK, Ghandour NM, Mahran AM, Saleh MA, Amin MM, Shamloul R. Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Cent European J Urol*. 2013;66(1):84-92
35. Kado NY, Okamoto RA, Kuzmicky PA, Kobayashi R, Ayala A, Gebel ME, et al. Emissions of toxic pollutants from compressed natural gas and low sulfur diesel-fueled heavy-duty transit buses tested over multiple driving cycles. *Environ Sci Technol*. 2005 Oct 1;39(19):7638–49.
36. Jeng HA, Yu L. Alteration of sperm quality and hormone levels by polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particulate particles. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2008 Jun;43(7):675–81.
37. Risom L, Moller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005; 592: 119-137

38. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, et al. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl.* 2007 Aug;28(4):613–20.
39. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P and Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999, 14,1039–1049
40. Larson K, De Jonge C, Barnes A, Jost L and Evenson D. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15,1717–1722.
41. Zini A, Fisher, MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D and Jarvi K. Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 2002; 60,1069–1072.
42. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR and 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; 79,1597–1605.
43. Medio ambiente, salud y economía, tres en uno. Agencia Europea de Medio Ambiente; 2013; Available from: <http://www.eea.europa.eu/es/articles/medio-ambiente-salud-y-economia>.
44. Air Implementation Pilot. Lessons learnt from the implementation of air quality legislation at urban level. EEA Report, n° 7/2013. European Environment Agency; 2013; Available from: <http://www.eea.europa.eu/publications/air-implementation-pilot-2013>.
45. El medio ambiente en Europa. Estado y perspectivas 2015. Informe de síntesis. Agencia Europea de Medio Ambiente; 2015.
46. Decisión n° 1386/2013/UE relativa al Programa General de Acción de la Unión en materia de Medio Ambiente hasta 2020 «Vivir bien, respetando los límites de nuestro planeta». Diario Oficial de la Unión Europea; 2013; Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013D1386&from=EN>.
47. Contaminación atmosférica. La contaminación atmosférica perjudica la salud humana y el medio ambiente. Agencia Europea de Medio Ambiente; 2015; Available from: <http://www.eea.europa.eu/es/articles>.
48. Programa Aire Puro para Europa. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. 2013; Available from: http://ec.europa.eu/environment/air/clean_air_policy.htm.

49. Revisión de la Política Europea de Calidad del Aire. Comisión Europea; 2013; Available from: http://ec.europa.eu/environment/air/review_air_policy.htm.
50. Air Quality Guidelines. Global Update 2005. World Health Organization; 2006; Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf.

Capítulo 4

1. ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys.* 1998;74:494–522.
2. DIRECTIVA 2013/35/UE, de 26 de junio DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, sobre las disposiciones mínimas de salud y seguridad relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de agentes físicos (campos electromagnéticos) (vigésima Directiva específica con arreglo al artículo 16, apartado 1, de la Directiva 89/391/CEE), y por la que se deroga la Directiva 2004/40/CE. (DOUE L 179, de 29 de junio de 2013).
3. The Australian Standard (AS/NZS). Radio frequency radiation Part I: Maximum exposure levels (100kHz to 300 GHz). . AS. 1998;2772.1.
4. The Australian Standard (AS/NZS). Siting of Radio communications Facilities: Part 2: Guidelines for Fixed, Mobile and Broadcasting Services Operating at Frequencies above 30 MHz. AS. 1998;3516.2.
5. Jha AN, Sharma T. Enhanced frequency of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutat Res.* 1991 Aug;260(4):343-8.
6. Cardoso RS, Takahashi-Hyodo S, Peitl P, Jr., Ghilardi-Neto T, Sakamoto-Hojo ET. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2001;21(6):431-9.
7. Thierens H, Vral A, Morthier R, Aousalah B, De Ridder L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis.* 2000 May;15(3):245-9.
8. Wakeford R. The risk of childhood leukaemia following exposure to ionising radiation--a review. *J Radiol Prot.* 2013 Mar;33(1):1-25.
9. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact.* 2012 Apr 5;196(3):59-67.

10. Metz-Flamant C, Bonaventure A, Milliat F, Tirmarche M, Laurier D, Bernier MO. [Low doses of ionizing radiation and risk of cardiovascular disease: A review of epidemiological studies]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2009 Oct;57(5):347-59.
11. Adams MJ, Hardenbergh PH, Constine LS, Lipshultz SE. Radiation-associated cardiovascular disease. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Jan;45(1):55-75.
12. Schultz-Hector S, Trott KR. Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Jan 1;67(1):10-8.
13. Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan JA, Hamra GB, et al. Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). *BMJ*. 2015;351:h5359.
14. Spycher BD, Lupatsch JE, Zwahlen M, Roosli M, Niggli F, Grotzer MA, et al. Background ionizing radiation and the risk of childhood cancer: a census-based nationwide cohort study. *Environ Health Perspect*. 2015 Jun;123(6):622-8.
15. Little MP, Tawn EJ, Tzoulaki I, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, et al. A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. *Radiat Res*. 2008 Jan;169(1):99-109.
16. Grewenig A, Schuler N, Rube CE. Persistent DNA Damage in Spermatogonial Stem Cells After Fractionated Low-Dose Irradiation of Testicular Tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015 Aug 1;92(5):1123-31.
17. Kumar D, Salian SR, Kalthur G, Uppangala S, Kumari S, Challapalli S, et al. Semen abnormalities, sperm DNA damage and global hypermethylation in health workers occupationally exposed to ionizing radiation. *PLoS One*. 2013;8(7):e69927.
18. Clifton DK, Bremner WJ. The effect of testicular x-irradiation on spermatogenesis in man. A comparison with the mouse. *J Androl*. 1983 Nov-Dec;4(6):387-92.
19. Sheiner EK, Sheiner E, Hammel RD, Potashnik G, Carel R. Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health*. 2003 Apr;41(2):55-62.
20. Moller AP, Surai P, Mousseau TA. Antioxidants, radiation and mutation as revealed by sperm abnormality in barn swallows from Chernobyl. *Proc Biol Sci*. 2005 Feb 7;272(1560):247-53.

21. Moller AP, Bonisoli-Alquati A, Mousseau TA, Rudolfson G. Aspermy, sperm quality and radiation in Chernobyl birds. *PLoS One*. 2014;9(6):e100296.
22. Kumar D, Salian SR, Kalthur G, Uppangala S, Kumari S, Challapalli S, et al. Association between sperm DNA integrity and seminal plasma antioxidant levels in health workers occupationally exposed to ionizing radiation. *Environ Res*. 2014 Jul;132:297-304.
23. Fischbein A, Zabludovsky N, Eltes F, Grischenko V, Bartoov B. Ultramorphological sperm characteristics in the risk assessment of health effects after radiation exposure among salvage workers in Chernobyl. *Environ Health Perspect*. 1997 Dec;105 Suppl 6:1445-9.
24. Bonde JP. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian J Androl*. 2010 Mar;12(2):152-6.
25. Bartoov B, Zabludovsky N, Eltes F, Smirnov VV, Grischenko VV, Fischbein A. Semen Quality of Workers Exposed to Ionizing Radiation in Decontamination Work after the Chernobyl Nuclear Reactor Accident. *Int J Occup Environ Health*. 1997 Jul;3(3):198-203.
26. Boitrelle F, Ferfourri F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, et al. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod*. 2011 Jul;26(7):1650-8.
27. Franco JG, Jr., Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, et al. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2012 Feb;35(1):46-51.
28. Hourcade JD, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:9.
29. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2004 May;81(5):1289-95.
30. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*. 2006 Nov;21(11):2876-81.
31. ICRP. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. 2007(37):2-4.

32. Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril*. 2008 Jan;89(1):124-8.
33. Agarwal A, Singh A, Hamada A, Kesari K. Cell phones and male infertility: a review of recent innovations in technology and consequences. *Int Braz J Urol*. 2011 Jul-Aug;37(4):432-54.
34. Zuo WQ, Hu YJ, Yang Y, Zhao XY, Zhang YY, Kong W, et al. Sensitivity of spiral ganglion neurons to damage caused by mobile phone electromagnetic radiation will increase in lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro model. *J Neuroinflammation*. 2015;12:105.
35. Wang X, Liu C, Ma Q, Feng W, Yang L, Lu Y, et al. 8-oxoG DNA glycosylase-1 inhibition sensitizes Neuro-2a cells to oxidative DNA base damage induced by 900 MHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(3):1075-88.
36. Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol*. 2011 Jul;12(7):624-6.
37. Khurana VG, Teo C, Kundi M, Hardell L, Carlberg M. Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiologic data. *Surg Neurol*. 2009 Sep;72(3):205-14; discussion 14-5.
38. Hardell L, Carlberg M, Soderqvist F, Mild KH, Morgan LL. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med*. 2007 Sep;64(9):626-32.
39. Stronati L, Testa A, Moquet J, Edwards A, Cordelli E, Villani P, et al. 935 MHz cellular phone radiation. An in vitro study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*. 2006 May;82(5):339-46.
40. Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomed Pharmacother*. 2008 Feb;62(2):104-9.
41. Gherardini L, Ciuti G, Tognarelli S, Cinti C. Searching for the perfect wave: the effect of radiofrequency electromagnetic fields on cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):5366-87.
42. Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, Sabanegh E, et al. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertil Steril*. 2009 Oct;92(4):1318-25.
43. Liu K, Li Y, Zhang G, Liu J, Cao J, Ao L, et al. Association between mobile phone use and semen quality: a systemic review and meta-analysis. *Andrology*. 2014 Jul;2(4):491-501.

44. Agarwal A, Durairajanayagam D. Are men talking their reproductive health away? *Asian J Androl.* 2015 May-Jun;17(3):433-4.
45. De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One.* 2009;4(7):e6446.
46. Tas M, Dasdag S, Akdag MZ, Cirit U, Yegin K, Seker U, et al. Long-term effects of 900 MHz radiofrequency radiation emitted from mobile phone on testicular tissue and epididymal semen quality. *Electromagn Biol Med.* 2014 Sep;33(3):216-22.
47. Rago R, Salacone P, Caponecchia L, Sebastianelli A, Marcucci I, Calogero AE, et al. The semen quality of the mobile phone users. *J Endocrinol Invest.* 2013 Dec;36(11):970-4.
48. Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl.* 2005 Jun;28(3):171-9.
49. News release: safety guidelines for hand held cellular telephones. Federal Communications Commission. 1999.
50. Fejes I, Zavaczki Z, Szollosi J, Koloszar S, Daru J, Kovacs L, et al. Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl.* 2005 Sep-Oct;51(5):385-93.
51. Zilberlicht A, Wiener-Megnazi Z, Sheinfeld Y, Grach B, Lahav-Baratz S, Dirnfeld M. Habits of cell phone usage and sperm quality - does it warrant attention? *Reprod Biomed Online.* 2015 Sep;31(3):421-6.
52. Adams JA, Galloway TS, Mondal D, Esteves SC, Mathews F. Effect of mobile telephones on sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int.* 2014 Sep;70:106-12.
53. Dama MS, Bhat MN. Mobile phones affect multiple sperm quality traits: a meta-analysis. *F1000Res.* 2013;2:40.
54. Mailankot M, Kunnath AP, Jayalekshmi H, Koduru B, Valsalan R. Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(6):561-5.
55. Liu Q, Si T, Xu X, Liang F, Wang L, Pan S. Electromagnetic radiation at 900 MHz induces sperm apoptosis through bcl-2, bax and caspase-3 signaling pathways in rats. *Reprod Health.* 2015;12:65.

56. Kesari KK, Kumar S, Behari J. Effects of radiofrequency electromagnetic wave exposure from cellular phones on the reproductive pattern in male Wistar rats. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011 Jun;164(4):546-59.
57. Kesari KK, Behari J. Microwave exposure affecting reproductive system in male rats. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010 Sep;162(2):416-28.
58. Dasdag S, Ketani MA, Akdag Z, Ersay AR, Sari I, Demirtas OC, et al. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urol Res.* 1999 Jun;27(3):219-23.
59. Avendano C, Mata A, Sanchez Sarmiento CA, Doncel GF. Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* 2012 Jan;97(1):39-45 e2.
60. Yildirim ME, Kaynar M, Badem H, Cavis M, Karatas OF, Cimentepe E. What is harmful for male fertility: cell phone or the wireless Internet? *Kaohsiung J Med Sci.* 2015 Sep;31(9):480-4.
61. Dasdag S, Tas M, Akdag MZ, Yegin K. Effect of long-term exposure of 2.4 GHz radiofrequency radiation emitted from Wi-Fi equipment on testes functions. *Electromagn Biol Med.* 2015 Mar;34(1):37-42.
62. Shokri S, Soltani A, Kazemi M, Sardari D, Mofrad FB. Effects of Wi-Fi (2.45 GHz) Exposure on Apoptosis, Sperm Parameters and Testicular Histomorphometry in Rats: A Time Course Study. *Cell J.* 2015 Summer;17(2):322-31.
63. Saygin M, Asci H, Ozmen O, Cankara FN, Dincoglu D, Ilhan I. Impact of 2.45 GHz microwave radiation on the testicular inflammatory pathway biomarkers in young rats: The role of gallic acid. *Environ Toxicol.* 2015 Aug 13.
64. Atasoy HI, Gunal MY, Atasoy P, Elgun S, Bugdayci G. Immunohistopathologic demonstration of deleterious effects on growing rat testes of radiofrequency waves emitted from conventional Wi-Fi devices. *J Pediatr Urol.* 2013 Apr;9(2):223-9.

Capítulo 5

1. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Agarwal A. Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review. *Arch Med Sci* 2009;5, 1A:S3-S12
2. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004; 432: 48-52.

3. Skakkeboek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16: 972-8.
4. Skakkeboek NE, Jørgensen N, Main KM, et al. Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006; 29: 2-11.
5. Jørgensen N, Asklund C, Carlsen E, et al. Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. *Int J Androl* 2006; 29: 54-61.
6. Hauser R. The environment and male fertility: recent research on emerging chemicals and semen quality. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 156-67.
7. Swan SH. Does our environment affect our fertility? Some examples to help reframe the question. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 142-6.
8. Fisch H, Goluboff ET. Geographic variations in sperm counts: a potential cause of bias in studies of semen quality. *Fertil Steril* 1996; 65: 1044-6.
9. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001; 16: 1012-9.
10. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 414-20.
11. Homan GF, Davies M, Norman R: The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update* 2007, 13:209-223.
12. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:66.
13. 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.
14. 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.
15. Redman LM: Physical activity and its effects on reproduction. *Reprod Biomed Online* 2006, 12:579-586.

16. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J: Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: Systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011, 95:116–123.
17. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzick D, Overstreet JW, Redmon JB, Sparks A, Wang C, Swan SH: Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* 2010, 93:1104–1111.
18. 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.
19. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine: Smoking and infertility. *Fertil Steril* 2008, 90(5 Suppl):S254–S259
20. Augood C, Duckitt K, Templeton AA: Smoking and female infertility: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 1998, 13:1532–1539
21. 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):143-160.
22. 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.
23. 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.
24. Said TM, Ranga G, Agarwal A. Relationship between semen quality and tobacco chewing in men undergoing infertility evaluation. *Fertil Steril* 2005; 84: 649-53.
25. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007; 22: 188-96.
26. Soares SR, Melo MA: Cigarette smoking and reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008, 20:281–291.
27. 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 Apr 21. In press.

28. 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.
29. Robbins WA, Elashoff DA, Xun L, et al. Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 371-7.
30. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski L, Hawuła W, Ulańska A, Hanke W. Lifestyle factors and sperm aneuploidy. *Reprod Biol*. 2014 Sep;14(3):190-9
31. 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.
32. 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.
33. Vilorio T, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M: Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril* 2007, 88:523–525.
34. 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.
35. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S: What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 2006, 67:2–8.
36. Terzioglu F. Investigation into effectiveness of counseling on assisted reproductive techniques in turkey. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 2001, 22:133–141.
37. Ramlau-Hansen CH, 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.
38. Vogt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Fertil Steril* 1986; 45: 106-10.
39. 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.

40. American Lung Association: <http://www.lung.org/stop-smoking/aboutsmoking/facts-figures/whats-in-a-cigarette.html>.
41. Muthusami KR, Chinnaswamy P: Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* 2005, 84:919–924.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Tsujimura A, Matsumiya K, Takahashi T, et al. Effect of lifestyle factors on infertility in men. *Arch Androl* 2004;50: 15-7.
46. 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.
47. 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.
48. 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
49. 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
50. 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.
51. Gold MS: Cocaine and crack: Clinical aspects. In *Substance Abuse: A Comprehensive Textbook: Third Edition*. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; 1997:218–263.
52. 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.

53. 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.

Capítulo 6

1. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):63
2. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*. 2004 Jun;8(6):616-27.
3. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod*. 2001 Dec;16(12):2710-7.
4. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A3. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1518-27.
5. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008 May-Jun;14(3):243-58.
6. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*. 2009 Apr;129(4):357-67.
7. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*. 2006 Sep;86(3):503-12. Epub 2006 Jul 24.
8. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997 Apr;20(2):61-9.
9. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998 Nov;59(5):1037-46.
10. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003 Apr;79(4):829-43.
11. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004 Jan;19(1):129-38.

12. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl.* 2004 Jan-Feb;25(1):5-18.
13. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am.* 2002 Nov;29(4):817-27.
14. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 1996 Dec;48(6):835-50.
15. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 2014 Apr;32(1):1-17.
16. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev.* 2008 Oct-Dec;1(1):15-24.
17. Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2009 Nov;19(5):638-59.
18. De Lamirande E, Lamothe G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med.* 2009 Feb 15;46(4):502-10.
19. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 2004 Sep-Oct;10(5):387-99.
20. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010 May;48(5):425-35.
21. Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Nov 24;12:112.
22. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007 Sep-Oct;33(5):603-21.
23. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987 Nov;81(2):459-69.
24. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989 Jul;41(1):183-97.

25. Fretz PC, Sandlow JL. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am.* 2002 Nov;29(4):921-37.
26. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999 Jun;161(6):1831-4.
27. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biol Reprod.* 1995 Nov;53(5):1146-50.
28. Li YC, Hu XQ, Xiao LJ, Hu ZY, Guo J, Zhang KY, et al. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism. *Front Biosci.* 2006 Sep 1;11:2465-82.
29. Da Ros CT, Telöken C, Tannhauser M, Hartmann A. Does intratesticular testosterone administration modify the evolution of transitory testicular ischemia in pre-pubertal rats?. *J Urol.* 1998 May;159(5):1752-4.
30. Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, Reddy MC, Roy KR, Reddy GV, et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol.* 2006 Oct;22(3):493-500.
31. Allen JA, Diemer T, Janus P, Hales KH, Hales DB. Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine.* 2004 Dec;25(3):265-75.
32. Cao L, Leers-Sucheta S, Azhar S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Jan;88(1):61-7.
33. Zirkin BR, Chen H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod.* 2000 Oct;63(4):977-81.
34. Syed V, Hecht NB. Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase and up-regulate a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology.* 1998 Aug;139(8):3503-11.
35. Homma-Takeda S, Hiraku Y, Ohkuma Y, Oikawa S, Murata M, Ogawa K, et al. 2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite. *Free Radic Res.* 2002 May;36(5):555-66.

36. Koizumi T, Li ZG. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health*. 1992 Sep;37(1):25-36.
37. Hsu PC., Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology*. 1997 Sep 26;122(1-2):133-43.
38. Marchlewicz M, Wiszniewska B, Gonet B, Baranowska-Bosiacka I, Safranow K, Kolasa A, et al. Increased lipid peroxidation and ascorbic Acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals*. 2007 Feb;20(1):13-9.
39. Mattison DR The effects of smoking on fertility from gametogenesis to implantation. *Environ Res*. 1982 Aug;28(2):410-33.
40. Agarwal A, Sekhon LH. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? *Indian J Urol*. 2011 Jan;27(1):74-85.
41. Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, et. al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 May 7;12:33.
42. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, et al. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl*. 2007 Jul-Aug;28(4):613-20.
43. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003 Jul-Aug;9(4):331-45.
44. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2004 Feb;81(2):349-54.
45. Desai N, Sharma R, Makker K, Sabanegh E, Agarwal A. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1626-31.
46. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl*. 1992 Sep-Oct;13(5):368-78.
47. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int*. 2005 Mar;95(4):503-7.

48. Agarwal A, Prabhakaran SA, Sikka SC. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence based analysis. *AUA Update series* 2007; 26:1-12.
49. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril.* 2000 Mar;73(3):459-64.
50. Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod.* 1997 Mar;3(3):169-73.
51. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1995 Jan;103(1):17-26.
52. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2011 Jan;13(1):36-42.
53. Lewis SE, Simon L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum Fertil (Camb).* 2010 Dec;13(4):201-7.
54. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod.* 2013 Jun;28(6):1707-15.
55. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000 Apr;15(4):830-9.
56. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999 Jan;4(1):31-7.
57. Hammadeh ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W, Fischer Hammadeh C. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2008 Jun;277(6):515-26.
58. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003 Jun;79 Suppl 3:1597-605.
59. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012 Jun 29;10:49.

60. Agarwal A, Allamaneni SS, Nallella KP, George AT, Mascha E. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. *Fertil Steril*. 2005 Jul;84(1):228-31.

Capítulo 7

1. Bermejo P, Cuadrado I, Ortega JC, De las Heras B. Evaluación de la actividad antioxidante de suplementos dietéticos utilizados para mejorar la fertilidad masculina. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción humana* 2014;31(3): 21-25
2. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*. 2000 Feb 18;86(3):347-54
3. Yu B, Huang Z. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Res Int*. 2015;2015:513196
4. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 May 16;250(1-2):70-9.
5. Vernet P1, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Mar 15;216(1-2):31-9.
6. Lifeng Yan, Jining Liu, Shengmin Wu, Shenghu Zhang, Guixiang Ji, Aihua Gu. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *J Assist Reprod Genet*. 2014 May; 31(5): 549–554.
7. Donnelly ET, Lewis SE, Thompson W, Chakravarthy U. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol Hum Reprod*. 1997 Sep;3(9):755-62.
8. Donnelly ET, Lewis SE, Thompson W, Chakravarthy U. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol Hum Reprod*. 1997 Sep;3(9):755-62.
9. O'Flaherty C1, de Souza AR. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. *Biol Reprod*. 2011 Feb;84(2):238-47.
10. O'Flaherty C. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 2015 Jul-Aug;17(4):583-90.

11. Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J Androl.* 2004 Sep-Oct;25(5):773-80.
12. Williams AC, Ford WC. Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1309-16. Du Plessis SS
13. Poulos A, Darin-Bennett A, White IG. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 1973; *Comparative Biochemistry* 46, 541-549.
14. Zalata A, Christophe A, Depuydt C, Schoonjans F, Comhaire F. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Molecular human reproduction* 1998; 4, 111-118.
15. Aksoy Y, Aksoy H, AltInkaynak K, AydIn H R I, Özkan A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2006; 75, 75-79.
16. Martínez-Soto, J C, Landeras J, Gadea. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*, 2013; 1(3), 365-375.
17. Hodge W, Schachter H, Barnes D, Pan Y, Lowcock E et al Efficacy of [omega]-3 Fatty Acids in Preventing Age-Related Macular Degeneration:: A Systematic Review. *Ophthalmology* 2006; 113, 1165-1173.
18. Conquer J, Martin J, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. Asthernozoospermic males. *Lipids* 1999; 34, 793-799.
19. Safarinejad M R, Hosseini S Y, Dadkhah F, Asgari M A. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. *Clinical Nutrition* 2010 29, 100-105.
20. Roqueta-Rivera M, Stroud C K, Haschek W M, Akare S J, Segre M, Brush RS et al. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *Journal of Lipid Research* 2010; 51, 360-367.
21. Conquer J A, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpety F. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthernozoospermic males. *Lipids* 2000; 35:149-154.

22. Safarinejad M R. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *Andrologia* 2011; 43, 38-47.
23. Comhaire FH, Christophe A B, Zalata A A, Dhooge W S, Mahmoud A M A, et al. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 2000; 63(3), 159-165.
24. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* (1997) 67,142-147.
25. Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of smokers. *Fertility and Sterility* (1992) 58,1034-1039.
26. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility* (1997) 68,519-524.
27. Cyrus A, Kabir A, Goodarzi D, Moghimi M. The effect of adjuvant vitamin C after varicocele surgery on sperm quality and quantity in infertile men: a double blind placebo controlled clinical trial. *Int Braz J Urol* (2015) Mar-Apr;41(2):230-8
28. Abel BJ, Carswell G, Elton R, Hargreave TB, Kyle K, Orr S et al. Randomised trial of clomiphene citrate treatment and vitamin C for male infertility. *British Journal Of Urology* (1982) 54.780-784
29. Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod.* 1999 Apr;14(4):1028-33
30. Lafuente R, Gonzalez-Comadran M, Sola I, Lopez G, Brassesco M, Carreras R et al. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* (2013) 30:1147-1156
31. Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and Sterility* (2009), May 91(5): 1785-1792
32. Safarinejad MR. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. *J Urol* (2009);182:237-248

33. Nadjarzadeh A, Sadeghi MR, Amirjannati N, Vafa MR, Motevalian SA, Gohari MR et al Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a randomized double-blind placebo Controlled trial. *J Endocrinol invest* 2011; e224-e228
34. Arduini A. Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants. *AM Heart J* (1992) 123:1726—7
35. Agarwall A, Tamer MS. Carnitines and male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* (2004), 8(4):376-384
36. Vicari E and Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatovesiculo-epididymitis. *Human Reproduction* (2001) 16,2338-2342.
37. Lenzi A, Lombardo F, Sgró P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F et al . Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertility and Sterility* (2003), 79(2): 292–300
38. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology* (1998) 9:367-376
39. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction* (1989) 41:183-197.
40. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf F. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze thaw process. *Archives of Andrology* 33:11-15
41. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE . Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertility and Sterility* 72:484-495.
42. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Ruseell JM, Cooke ID et al. A double blind Randomized placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat associated male infertility. *Fertility and Sterility* (1995) 64:825-831
43. Moilanen J, Hovatta O. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. *Andrologia* (1995) 25:15-20
44. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, El-Malik EMA, Nasr MA . Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of Andrology* (1996)17:530-537.

45. Keske-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Ghazzi H, Hammami S, Zghal K et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin e and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Archives of Andrology* (2003) 49:83-94.
46. Greco E, Lacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Susanna F, Tesarik J. *Journal of Andrology* (2005). Vol 6 3:349-353.
47. Hansen JC, Deguchi Y. Selenium and fertility in animals and man—a review. *Acta Vet Scand.* (1996) 37:19–30.
48. Rayman, Margaret P. The importance of selenium to human health. *The Lancet* (2000) , Vol 356 , 9225: 233 - 241
49. Iwanier K, Zachara BA. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoa quality characteristics in subfertile men. *Journal of Andrology*(1995) 16:441-447.
50. Scott R, Macpherson A, Yates RW, Hussain, Dixon. The effect of selenium supplementation on human sperm motility. *British journal of Urology* (1998) 82:76-80.
51. Omu AE, Dashtib H, Othman SA. Treatment of asthenozoospermia with zinc sulphate: andrological, immunological and obstetric outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (1998) ,79(2):179-184.
52. Azizollahi G, Azizollahi S, Babaei H, Kianinejad M, Baneshi MR, Nematollahi-Mahani SN. Effects of supplement therapy on sperm parameters, protamine content and acrosomal integrity of varicocelectomized subjects. *J Assist Reprod Genet* (2013) 30(4): 593-599
53. Omu AE, Al Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriwi MA, Mathew TC. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Medical principles and practice* (2008) 17(2):108-116
54. Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJ, Lindemans J et al. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril.* (2009) 92(2):548-556
55. Raigani M, Yaghmaei B, Amirjannti N, Lakpour N, Akhondi MM, Zeraati H et al. The micronutrient supplements, zinc sulphate and folic acid, did not ameliorate sperm functional parameters in oligoasthenoteratozoospermic men. *Andrologia.* (2014); 46(9):956-62.

56. Wong WY, Merkus H, Thomas C, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility* (2002) 77(3):491–498
57. Ebisch IM, Pierik FH, De Jong FH, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm. *International Journal of Andrology* 2006; 29(2):339–45.
58. Pryor JP, Blandy JP, Evans P, Chaput de Saintonge DM, Usherwood M. Controlled clinical trial of arginine for infertile men with oligozoospermia: *British journal of Urology* (1978), 50:47-50
59. Morgante G, Scolaro V, Tosto C, Di Sabatino A, Piomboni P, De Leo V. Treatment with carnitine, acetyl carnitine, Larginine and ginseng improves sperm motility and sexual health in men with asthenopermia. *Minerva Urologica e Nefrologica* 2010;62(3):213–218

Listado de SIGLAS

- **AEMA:** Agencia Europea de Medioambiente
- **AGDAP o DAGAP:** distancia anogenital desde la inserción proximal superior del pene en el abdomen al centro o límite superior del ano
- **AGDAS:** distancia anogenital desde la base inferior del escroto al centro o límite superior del ano
- **AL:** ácido linolénico
- **ARE:** elemento de respuesta antioxidante
- **BPA:** bisfenol A
- **CAT:** catalasa
- **CB-153:** hexaclorobifenil
- **CDE:** compuestos disruptores endocrinos
- **COV:** compuestos orgánicos volátiles
- **DAF:** dialquilfosfatos
- **DAG:** distancia anogenital
- **DBP:** dibutil ftalato
- **DBCP:** dibromocloropropano
- **DDE:** diclorodifenildicloroetileno
- **DDT:** diclorodifeniltricloroetano
- **DEHP:** di(2-etilhexil) ftalato
- **DEP:** partículas emitidas por motores diesel
- **DES:** dietilestilbestrol
- **DETP:** dietiltiofosfato
- **DHA:** ácido docosahexanoico
- **DMP:** dimetilfosfato
- **DNA:** ácido desoxirribonucleico
- **DSBs:** rotura de la doble cadena de las moléculas de ADN
- **EP:** etilfosfato
- **EPA:** ácido eicosapentanoico
- **FAI:** índice de andrógenos libres
- **FIV:** fecundación in vitro
- **FSH:** hormona folículo estimulante
- **GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina
- **GPX:** glutatión peroxidasa

- **GSH:** glutatión
- **GST:** Glutatión S-Transferasa
- **HAPs:** hidrocarburos aromáticos policíclicos
- **ICNIRP:** International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
- **ICRP:** Comisión Internacional de Protección Radiológica
- **ICSI:** inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- **INSL3:** factor similar a insulina 3
- **LH:** hormona luteinizante
- **MBP:** mono-butil ftalato
- **MBzP:** mono-benzil ftalato
- **MEHHP:** mono-(2-etilhexil-5-hidroxihexil) ftalato
- **MEHP:** mono-(2-etilhexil) ftalato
- **MEOHP:** mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato
- **MMP:** mono-metil ftalato
- **NHANES:** National Health and Nutrition Examination Survey
- **NIEHS:** Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente Americano
- **NRF2:** factor de transcripción nuclear
- **NOA:** azoospermia no obstructiva
- **NOS:** óxido nítrico sintasa
- **OA:** azoospermia obstructiva
- **OF:** organofosforados
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PCBs:** bifenilos policlorados
- **PM:** materia particulada
- **PRX:** peroxiredoxinas
- **PUFAs:** ácidos grasos poliinsaturados
- **REACH:** Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances
- **REM:** radiaciones u ondas electromagnéticas
- **ROS:** especies reactivas del oxígeno
- **SAR:** specific absorption rate
- **SOD:** superóxido dismutasa
- **TDS:** síndrome de disgenesia testicular
- **TRA:** técnicas de reproducción asistida
- **TRX:** tioredoxinas
- **TrxR:** tioredoxina reductasa
- **TZI:** índice de teratozoospermia
- **UFP:** partículas ultrafinas

Notas

Notas

Notas

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción



ASESA

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ANDROLOGÍA,
MEDICINA SEXUAL Y REPRODUCTIVA

JUNTA DIRECTIVA

ASEBIR

Montserrat Boada Pala

María Jose Torello Ybañez

Josep Santalo Pedro

Anna Serra Peruchet

Inmaculada Campos Ramirez

Jose Luis De Pablo Franco

Aranzazu Galan Rivas

Abel Gayo Lana

Maria Dolores Lozano Arana

Laura Marques Soler

Enrique Olaya Vila

Francisco Javier Vendrell Monton

ASESA

Rafael Prieto Castro

Ferran García José

Francisco Cabello Santamaría

Ana Segura Paños

Fernando Meijide Rico

Asier Leibar Tamayo

Joaquim Sarquella Geli

Carmen Luque López

Francisco Juárez del Dago Pendás

Jesús Mateos Blanco

Juan Ignacio Martínez Salamanca

Rafael Lafuente Varea

CON LA COLABORACIÓN DE:



ANGELINI