



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio de los Determinantes de Calidad
Seminal en Pacientes que Acuden a un
Servicio de Reproducción Asistida

Dña. María Encarnación Melgarejo Melgarejo
2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio de los Determinantes de Calidad
Seminal en Pacientes que acuden a un
Servicio de Reproducción Asistida

María Encarnación Melgarejo Melgarejo

2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES DE CALIDAD SEMINAL
EN PACIENTES QUE ACUDEN A UN SERVICIO DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA”**

Directores:

Dr. Jaime Mendiola Olivares

Dr. Alberto Manuel Torres Cantero

Dra. Isabel Tovar Zapata

MARÍA ENCARNACIÓN MELGAREJO MELGAREJO

2016

Programa de Doctorado en Salud Pública

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que a lo largo de la realización de esta tesis doctoral me han ayudado de una manera u otra:

Al Dr. Alberto Torres gracias por darme la posibilidad de formar parte de su equipo y ofrecerme su ayuda en todo momento.

Al Dr. Jaime Mendiola infinitas gracias por su paciencia, aliento, correcciones... y por su implicación absoluta en este proyecto.

A la Dra. Isabel Tovar, gracias por su amistad y apoyo, y por ser un referente para nosotras.

Al departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública por su acogida y amabilidad durante mi estancia allí.

Gracias a la Sección de Hormonas del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca por haberme facilitado tanto mi labor, por su forma de trabajar, y por permitir que esta tesis se elaborará ahí.

A todo el resto de laboratorio de Análisis Clínicos, en especial a mi tutora la Dra. Teresa Casas, gracias por cuidar siempre del buen ambiente de trabajo, y por enseñarme tantas cosas profesionales y personales.

A todos mis compañeros de residencia, Raquel , Ana, Juanan... por hacer del periodo de residencia una época inolvidable.

Gracias a la chupipandi, Cari, Xavi y Julio, por hacerme pasar tan buenos momentos, y por los que quedan por venir.

A mi hermano Jose, fuente constante de apoyo y de consejos “sutiles”.

A “mi Coté”, siempre en lo bueno y en lo malo, y ya para siempre mi familia.

Gracias a Pablo... porque tu forma de ser me hace feliz cada día.

Y en especial gracias a mis padres, Pepe y Encarnita, por dedicar su vida a sus hijos y hacer siempre más de lo que les correspondía. Nunca podré agradecerlos lo suficiente todo lo que hacéis por mí.

A todos vosotros.....Muchísimas gracias

A mis sobrinos,

A Adrián

A Javier

INDICE

1. RESUMEN.....	6
1.1 Resumen.....	6
1.2 Summary.....	10
2. INFORMACION SOBRE LAS PUBLICACIONES.....	13
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
3.1 Parámetros reproductivos.....	17
3.1.1 <i>Calidad seminal</i>	17
3.1.2 <i>Espermatogénesis</i>	19
3.1.3 <i>Perfil hormonal</i>	20
3.1.4 <i>Control hormonal de la espermatogénesis</i>	21
3.2 Exposición a disruptores endocrinos.....	24
3.2.1 <i>Concepto de disruptor endocrino</i>	24
3.2.2 <i>Plaguicidas organofosforados</i>	25
3.3 Estrés oxidativo.....	24
3.3.1 <i>Definición estrés oxidativo</i>	25
3.3.2 <i>Estrés oxidativo e infertilidad masculina</i>	25
3.4 Distancia anogenital y parámetros reproductivos.....	26
3.4.1 <i>Definición y características de la distancia anogenital</i>	26
3.4.2 <i>Relación con los parámetros reproductivos masculinos</i>	27
4. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS.....	29
4.1 Justificación del estudio.....	29
4.2 Objetivos generales y específicos.....	30
4.3 Conclusiones finales.....	31
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
6. COPIA DE TRABAJOS PUBLICADOS.....	38

1. RESUMEN

1.1 Resumen

Introducción: Diversos estudios muestran una disminución en la concentración espermática en las últimas décadas. Además, también se ha descrito un descenso de los niveles de testosterona, incremento en la incidencia de cáncer de testículo, criptorquidia e hipospadias, junto con el aparente aumento en la demanda de técnicas de reproducción asistida. Estas alteraciones se han relacionado con exposiciones a tóxicos y contaminantes ambientales, estilos de vida o ciertos factores nutricionales, pero que en gran medida aún son desconocidos, permanecen inexplorados o no han sido suficientemente estudiados.

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el estudio de la fertilidad masculina, abordando el problema desde la perspectiva de posibles factores medioambientales y hábitos de vida que pudieran alterar la calidad seminal y los niveles de hormonas reproductivas. Los objetivos específicos son:

1. Analizar la asociación entre los niveles ambientales de plaguicidas organofosforados, medidos por sus metabolitos urinarios (dialquilfosfatos) y su relación con los parámetros reproductivos (calidad seminal y niveles hormonales) en varones de parejas que acuden a un servicio de infertilidad.
2. Evaluar la correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo (óxido nítrico y malondialdehído), y la capacidad antioxidante total (TAC), ambos medidos en suero y en semen, y sus asociaciones con parámetros reproductivos en dichos varones.

3. Examinar las asociaciones entre la distancia anogenital (DAG) y la calidad seminal y su uso como un posible biomarcador clínico de la capacidad reproductiva en esta población de varones.

Metodología:

Población de estudio: El estudio se llevó a cabo en varones de entre 25 y 38 años, procedentes de la consulta de esterilidad del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. De los 220 pacientes a los que se les invitó a participar en el estudio 162 aceptaron. De ellos 141 volvieron para un análisis seminal, 122 accedieron a realizarse un análisis sanguíneo, 119 fueron capaces de obtener una muestra de orina, 116 devolvieron los cuestionarios cumplimentados y 91 accedieron a realizarse un examen físico que incluyera la medición de DAG.

Espirmiograma: Se analizaron la concentración, el porcentaje de espermatozoides móviles y la morfología espermática siguiendo los criterios de la OMS. Además, se calcularon el recuento total y el recuento total de espermatozoides móviles. Las horas de abstinencia se calcularon para posteriores análisis.

Examen físico: El peso corporal y la altura fueron medidos y se calculó el índice de masa corporal (IMC). Además se midieron las dos distancias anogenitales por duplicado. La distancia anogenital larga (DAG_{AP}) que comprende desde la base del pene hasta el centro del ano, y la distancia anogenital corta (DAG_{AS}), medida desde la base posterior del escroto hasta el centro del ano.

Análisis hormonal: Se determinaron las concentraciones serológicas de las siguientes hormonas: testosterona (T), estradiol

(E₂), prolactina (PRL), hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

Plaguicidas organofosforados: Las muestras de orina fueron enviadas para su análisis al Instituto de Prevención y Medicina Ocupacional de Alemania. Allí se determinaron los seis metabolitos urinarios de los organofosforados, los dialquilfosfatos: dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMTP), dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP) y dietilditiofosfato (DEDTP).

Estrés oxidativo: Se analizaron las concentraciones de óxido nítrico (ON) en plasma seminal, y las de malondialdehído (MDA) y capacidad antioxidante total (TAC) tanto en suero sanguíneo como en plasma seminal.

Resultados y conclusiones:

El aumento de la exposición ambiental a plaguicidas organofosforados se asoció con una disminución del recuento de espermatozoides y su movilidad, así como a una alteración de los niveles de hormonas reproductivas. Nuestros resultados sugieren que estos compuestos tendrían un papel importante en la disrupción endocrina en varones de parejas potencialmente infértiles.

Encontramos una asociación inversa significativa entre los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo y el recuento espermático, la movilidad y el porcentaje de morfología normal. Además, el estrés oxidativo estaría relacionado con la alteración de los niveles de hormonas reproductivas en dicha población.

Una DAG_{AS} alargada se asoció con un aumento de la concentración espermática, recuento total, y el recuento total de espermatozoides móviles en estos varones. La DAG podría resultar de interés como posible biomarcador clínico de la capacidad reproductiva en varones, aunque son necesarios más estudios para corroborar estos resultados.

1.2 Summary

Introduction: Several studies have shown a secular decline in sperm concentration over the last decades. In addition, increased incidence of testicular cancer, cryptorchidism and hypospadias, and a decrease in testosterone levels have been reported, along with the growing demand for assisted reproduction techniques. These conditions have been associated with exposure to environmental toxins and pollutants, lifestyle or certain nutritional factors but largely, are still unknown, remain unexplored or have not been enough characterized.

The overall aim of this work is to perform an in-depth investigation of male fertility, exploring several potential risk factors, such as environmental factors and lifestyle habits that could affect semen quality and serum reproductive hormone levels. The specific objectives are:

1. To analyze the association between environmental levels of organophosphate pesticides, measured by their urinary metabolites (dialkylphosphates) and its relationship to reproductive parameters (semen quality and hormone levels) in male partners of couples seeking for infertility treatment.
2. To evaluate the correlation between biomarkers of oxidative stress (malondialdehyde and nitric oxide), and total antioxidant capacity (TAC), both measured in serum and semen, and their associations with reproductive parameters in these men.
3. To examine associations between the anogenital distance (AGD) and semen quality and its use as a potential clinical biomarker of reproductive capacity in this population of males.

Methodology

Study population: This study was carried out in men attending infertility services of the “Virgen de la Arrixaca” University Hospital in the Murcia Region (Southern Spain), 25-38 years old. Of the 220 men who were offered participation in the study, 162 accepted. Of these, 141 returned for semen analysis, 122 agreed to have a blood drawn, 119 were able to obtain a urine sample, 116 delivered the completed questionnaires and agreed for a physical examination including AGD.

Semen Analysis: Sperm concentration, the percentage of motile sperm and morphological analysis were determined following the WHO criteria. In addition, total count and total motile sperm count were calculated. Time of abstinence (hours) were calculated for further analysis.

Physical examination: Body weight and height were measured and body mass index (BMI) was calculated. Besides, the two AGD measurements were assessed in duplicate. The long anogenital distance, AGD_{AP}, was measured from the cephalad insertion of the penis to the center of the anus. The short anogenital distance, AGD_{AS}, was measured from the posterior base (first fold) of the scrotum to the center of the anus.

Hormone analysis: Blood serum concentrations of the following hormones were determined: Testosterone (T), Estradiol (E2), Prolactin (PRL), Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH).

Organophosphate pesticides: Urine samples were analyzed in the Institute for Prevention and Occupational Medicine of the German Social Accident Insurance (Germany). Six urinary metabolites of

organophosphate (dialkylphosphates) were determined: dimethylphosphate (DMP), dimethylthiophosphate (DMTP), dimethyldithiophosphate (DMTP), diethylphosphate (DEP), diethylthiophosphate (DETP) and diethyldithiophosphate (DEDTP).

Oxidative stress: The concentration of nitric oxide (ON) was analyzed in seminal plasma, and malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) in both, blood serum and seminal plasma.

Results and conclusions

An increasing environmental exposure to organophosphate pesticides is associated with decreased sperm count and motility, and altered reproductive hormone levels. Our study suggests that these compounds might have an important role in disrupting endocrine function in male partners of couples seeking for infertility treatment.

We found a significant inverse association between biomarkers of oxidative stress and sperm count, motility and the percentage of morphologically normal sperm. In addition, oxidative stress may be correlated to altered levels of reproductive hormones in potentially infertile men.

Significant positive associations between AGD_{AS} measures and sperm concentration, total sperm count, and total sperm motile count were detected in these men. AGD could be of interest as a potential clinical biomarker of reproductive capacity in males, although further studies are needed to confirm these results.

2. INFORMACION SOBRE LAS PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral ha sido realizada según la modalidad de compendio de publicaciones en revistas científicas indexadas en bases de datos internacionales de reconocido prestigio, tales como el *Journal Citation Reports* (JCR). La normativa específica se incluye en el Artículo 20 del Capítulo II del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Murcia. A tal efecto, es necesario tener publicados o aceptados un número mínimo de tres trabajos y el visto bueno de la comisión de rama de conocimiento y la autorización de la Comisión General de Doctorado.

La presente tesis ha obtenido todas las autorizaciones necesarias y las publicaciones que la componen son las siguientes:

Artículo 1:

“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”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 7/11/2014; aceptado el 7/1/2015.
- Factor de impacto (JCR, 2014): 4.373
- Área temática y posición: Public, environmental & occupational health; 15/165 (D1/Q1).

Aportación de la doctoranda al trabajo: En primer lugar realicé y coordiné toda la recogida de datos asociada al trabajo de campo (gestión de citas, aplicación de criterios de exclusión/inclusión, recogidas de

cuestionarios epidemiológicos y exámenes físicos y muestras biológicas), incluido el procesamiento y análisis de dichas muestras (hormonas, etc.). En segundo lugar realicé la mecanización de datos, así como la limpieza y puesta a punto de las bases de datos para los análisis estadísticos. En tercer lugar llevé a cabo, también bajo supervisión, los análisis estadísticos descriptivos, uni y multivariantes relacionados con el objetivo de conocer la existencia de asociaciones entre los niveles urinarios de plaguicidas organofosforados y alteraciones reproductivas (calidad seminal y niveles hormonales) en varones de parejas con problemas de infertilidad. También generé las tablas y gráficos relacionados con los resultados principales. En cuarto lugar realicé búsquedas en bases bibliográficas para actualizar e interpretar la discusión de los resultados y lideré la elaboración y redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

Artículo 2:

“Mendiola J, Melgarejo M, Moñino-Garcia M, Cutillas-Tolin A, Noguera-Velasco JA, Torres-Cantero AM. Is anogenital distance associated with semen quality in male partners of subfertile couples? *Andrology*. 2015;3:672-6”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 26/3/2015; aceptado el 5/5/2015.
- Factor de impacto (JCR, 2014): 2.298
- Área temática y posición: *Andrology*; 4/7 (Q3).

Aportación de la doctoranda al trabajo: En primer lugar realicé y coordiné toda la recogida de datos asociada al trabajo de campo (gestión de citas, aplicación de criterios de exclusión/inclusión, recogidas de

cuestionarios epidemiológicos y exámenes físicos y muestras biológicas), incluido el procesamiento y análisis de dichas muestras (calidad seminal, etc.). En segundo lugar realicé la mecanización de datos, así como la limpieza y puesta a punto de las bases de datos para los análisis estadísticos. En tercer lugar llevé a cabo, también bajo supervisión, los análisis estadísticos descriptivos, uni y multivariantes relacionados con el objetivo de conocer la relación entre la distancia anogenital (biomarcador de exposición al ambiente hormonal prenatal) y la calidad seminal en varones de parejas con problemas de fertilidad. También generé las tablas relacionadas con los resultados principales. En cuarto lugar realicé búsquedas en bases bibliográficas para actualizar e interpretar la discusión de los resultados y co-lideré la elaboración y redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

Artículo 3:

“Melgarejo M, Mendiola J, Moñino-Garcia M, Cabezas-Herrera J, Tovar-Zapata I, Noguera-Velasco JA, Torres-Cantero AM. Associations between oxidative stress biomarkers in different body fluids and reproductive parameters in male partners of subfertile couples”. Rev Int Androl. 2016; in press.

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 23/03/2015; aceptado el 26/1/2016.
- Factor de impacto (JCR, 2014): 0.227
- Área temática y posición: Andrology; 7/7 (Q4).

Aportación de la doctoranda al trabajo: En primer lugar realicé y coordiné toda la recogida de datos asociada al trabajo de campo (gestión de citas, aplicación de criterios de exclusión/inclusión, recogidas de

cuestionarios epidemiológicos y exámenes físicos y muestras biológicas), incluido el procesamiento y análisis de dichas muestras (parámetros de estrés oxidativo, hormonas, etc.). En segundo lugar realicé la mecanización de datos, así como la limpieza y puesta a punto de las bases de datos para los análisis estadísticos. En tercer lugar llevé a cabo, también bajo supervisión, los análisis estadísticos descriptivos, uni y multivariantes relacionados con el objetivo de conocer la relación entre los niveles de estrés oxidativos y calidad seminal y niveles hormonales séricos en varones de parejas con problemas de fertilidad. También generé las tablas y gráficos relacionados con los resultados principales. En cuarto lugar realicé búsquedas en bases bibliográficas para actualizar e interpretar la discusión de los resultados y lideré la elaboración y redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 Parámetros reproductivos

3.1.1 *Calidad seminal*

El líquido seminal es una mezcla de secreciones procedentes del testículo, donde se producen los espermatozoides, de la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretral y uretral. El análisis del semen, seminograma o espermiograma, es el examen diagnóstico más importante y sencillo para iniciar un estudio de infertilidad masculina, aunque por sí solo, excepto en el caso de que no existan espermatozoides en el eyaculado, no puede determinar si un hombre tiene capacidad para concebir descendencia.

Se entiende por calidad seminal el resultado de la comparación de los valores que muestran ciertas características seminales con respecto a unos valores de referencia, generalmente los proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO).

Las características de los espermatozoides (principalmente movilidad y morfología), el recuento espermático (recuento total y concentración), y la composición del fluido seminal son los parámetros característicos de la calidad seminal (1).

3.1.2 *Espermatogénesis*

Los espermatozoides, las células germinales masculinas, se desarrollan en los túbulos seminíferos de los testículos a lo largo de la vida del varón, desde la pubertad hasta la edad adulta. El proceso de desarrollo de estas células se denomina espermatogénesis, y comprende cuatro fases principales: espermatogoniogénesis, meiosis,

espermiogénesis y espermiación. En humanos la espermatogénesis tiene una duración de 74 días (2).

Espermatogoniogénesis: En esta fase las células germinales de los túbulos seminíferos se multiplican, dando lugar a las espermatogonias. Se pueden distinguir tres tipos de espermatogonias por su morfología, su posición en la zona basal del epitelio germinal, y la capacidad de tinción de su núcleo: Tipo Ap (claro), Tipo Ad (oscuro) y Tipo B (3)(4). Las Tipo A son la reserva de las células madres de la espermatogénesis, que posteriormente se diferenciarán a las de Tipo B, hasta dar lugar a las espermátidas. Las espermatogonias están en continuo estado de división mitótica, usualmente incompleta, dando lugar a un sincitio de células, que sólo se romperá en los estadios avanzados de las espermátidas (5).

Meiosis: El estadio de meiosis se manifiesta por cambios en la disposición de la cromatina en el núcleo tras la última división de las espermatogonias (6). El proceso de meiosis comprende dos divisiones en donde las células antes de la primera división se denominan espermatocitos primarios y antes de la segunda división se denominan espermatocitos secundarios (7). Estas dos divisiones de cada espermatocito resultan en cuatro células haploides llamadas espermátidas.

Espermiogénesis: Durante esta etapa las espermátidas redondas se van elongando y van perdiendo casi la totalidad de su citoplasma. Se suceden tres procesos: condensación de la cromatina nuclear, formación del capuchón acrosomal y desarrollo e implantación de las estructuras del flagelo (8).

Espermiación: Durante este proceso las espermátidas maduras son liberadas a la luz de los túbulos seminíferos pasando a llamarse espermatozoides. Este proceso es mediado por las células de Sertoli (9). Una vez liberados los espermatozoides son transportados a través de los conductos eferentes hacia el epidídimo, donde llevarán a cabo una serie de transformaciones y acabarán de madurar (10).

3.1.3 Perfil hormonal

La evaluación endocrinológica se realiza en todos los hombres con parámetros seminales anormales o con alteraciones clínicas de baja androgenización, aunque se recomienda realizarla en todos los varones infértiles. Básicamente se miden la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la testosterona. En los casos de hipogonadismo hipogonadotrófico, además hay que valorar la prolactina (PRL) y la tirotrópina (TSH).

Hormonas gonadotropas (FSH y LH): Son glicoproteínas que se producen en las células gonadotrópicas de la adenohipófisis y de aquí van al torrente sanguíneo para alcanzar a sus órganos diana, que son las gónadas (ovario y testículo). Ambas favorecen la maduración de las gónadas y la formación de esteroides y así, capacitan al organismo para su reproducción.

Esteroides sexuales u hormonas esteroideas: Son el estrógeno, la progesterona y los andrógenos. La función principal de las hormonas esteroideas es el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y regulación del sistema reproductor. Tienen que ir unidas a una proteína plasmática, para ser transportadas por la sangre. Ejercen su efecto regulador, tanto en el hipotálamo como en la adenohipófisis, ya

que el gonadotropo tiene receptores tanto para estrógenos como para progesterona y andrógenos. Los esteroides pueden modular la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y así formar una cadena de retroalimentación con las gónadas.

Prolactina (PRL): La prolactina es una hormona peptídica segregada por las células lactotropas de la adenohipófisis. Puede ser inducida por fenómenos de estrés. En los varones el comportamiento de la prolactina puede afectar la función adrenal, el equilibrio electrolítico, desarrollo de senos y galactorrea, decremento del líbido e impotencia, y las funciones de la próstata, vesículas seminales y testículos.

3.1.4 Control hormonal de la espermatogénesis

La regulación gonadal comienza en el hipotálamo, el cual sintetiza y libera, de forma pulsátil, el decapeptido GnRH. La GnRH actúa directamente en las células gonadotropas que son células específicas de la pituitaria anterior que sintetizan y segregan las gonadotropinas FSH y LH, que son posteriormente liberadas al torrente sanguíneo.

Una vez en el torrente sanguíneo se dirigen al testículo, y cada una de ellas a una diana diferente. La LH es la hormona crucial en el inicio de la espermatogénesis y actúa sobre las células intersticiales o de Leydig aumentando la secreción de testosterona. Una parte de la testosterona es convertida en dihidrotestosterona (DHT) mediante la enzima 5α -reductasa y liberada al torrente sanguíneo para el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, así como el control del anabolismo de diferentes tejidos como el hueso y el

musculo. Otra parte de la testosterona se dirige de forma paracrina hacia las células de Sertoli de los túbulos seminíferos.

En cambio, la FSH actúa sobre las células de Sertoli provocando en ellas una serie de cambios que permiten el mantenimiento de la espermatogénesis (11). En concreto, la FSH estimula la secreción de la proteína ligadora de andrógenos (ABP), que se unirá a la membrana plasmática de los espermatoцитos actuando como un receptor para la testosterona.

Este eje hipotálamo-pituitaria-gónadas está regulado por un proceso de retroalimentación. La testosterona inhibe la secreción de LH y FSH, mientras que la LH estimula la síntesis de testosterona y la FSH controla la espermatogénesis.

3.2 Exposición a disruptores endocrinos

3.2.1 Concepto de disruptor endocrino

El concepto de disruptor endocrino se acuñó en 1991 durante la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, USA), donde un grupo de 21 científicos de diversas disciplinas se reunió para discutir la evidencia de cómo distintos compuestos químicos podrían estar afectando a la reproducción y al desarrollo de los animales y a la salud humana. En ella se concluyó que los disruptores endocrinos eran sustancias químicas, sintetizadas por el hombre y liberadas al medio ambiente, así como algunas naturales, que presentaban un efecto sobre el sistema endocrino de los hombres y animales. Incluían compuestos persistentes, organohalogenados y bioacumulables como algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), compuestos de síntesis, y algunos metales (12).

Los disruptores endocrinos se comportan como hormonas, alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, es decir, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos u progestágenos, u hormonas tiroideas, a través de mecanismos de acción diversos. En general son mayoría los compuestos que son agonistas o antagonistas de las hormonas sexuales femeninas (13), por lo que también se les denomina comúnmente estrógenos ambientales o xenoestrógenos.

Entre los disruptores endocrinos más comunes se encuentran:

- *Compuestos organoclorados:* Formados por un esqueleto de átomos de carbono, en el cual, alguno de los átomos de hidrógeno han sido sustituidos por átomos de cloro unidos covalentemente al carbono. Suelen utilizarse por su acción insecticida o plaguicida, aunque otros son subproductos de la industria. Entre los más estudiados se encuentran el bisfenol-A (BPA) y derivados, los ftalatos, los bifenilos policlorados (PCBs), las dioxinas, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos, y el aldrín.
- *Compuestos organofosforados:* Son compuestos orgánicos degradables, que contienen enlaces fosforo-carbono. Se utilizan comúnmente para el control de plagas.
- *Metales pesados:* Los metales pesados tóxicos más conocidos son el mercurio, el plomo, el cadmio y el arsénico, y en raras ocasiones, algún no metal como el selenio. A veces también se habla de contaminación por metales pesados incluyendo otros elementos tóxicos más ligeros, como el berilio o el aluminio.
- *Sustancias perfluoroalquiladas:* son un gran grupo de compuestos que consisten en una cadena alquílica hidrofóbica de longitud variable (total o parcialmente fluorada), con un grupo final

hidrofílico. Debido a su carácter anfíptico tienen amplios usos en la industria, que incluyen revestimiento antimanchas de tejidos, revestimientos de papel para el consumo de alimentos, espumas extintoras, abrillantadores de suelos y fórmulas de insecticidas.

- *Resorcinol*: producto de partida de diversos productos, desde fármacos hasta colorantes como la fluoresceína.
- *Componentes de las plantas*: como fitoestrógenos, micoestrógenos, etc.

3.2.2 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son compuestos ampliamente usados para el control de plagas, tanto a nivel doméstico como en agricultura, especialmente desde que el uso de los plaguicidas organoclorados, como el DDT se prohibió debido a su amplia toxicidad y persistencia (14).

Son ésteres de ácido fosfórico o tiofosfórico, capaces de fosforilar el sitio activo de la acetilcolinesterasa, dando lugar a la acumulación de acetilcolina y la consecuente sobrestimulación de los receptores muscarínicos o nicotínicos (15). Son compuestos liposolubles y volátiles, características que facilitan su absorción. Su toxicidad es variable y depende de la vía de entrada al organismo. El cuadro de intoxicación genera unos síntomas característicos, conocido como síndrome colinérgico, y que presenta cambios en el estado de consciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora (16).

Según su toxicidad [dosis letal (LD) 50] se clasifican en: de baja toxicidad ($LD_{50} > 50$ mg/kg), como Malathion, Merphos o Proxim; toxicidad media ($LD_{50} > 500$ mg/kg), entre los que se encuentran

Chlorpyrifos, Formothion y Quinalphos y de toxicidad alta ($LD50 < 50$ mg/kg), como Bomyl, Phosphamidon o Fenamiphos.

A nivel reproductivo, diversos estudios han demostrado que estos compuestos pueden alterar el eje hipotálamo-pituitario-testicular (17)·(18)·(19) y afectar a la calidad seminal y/o los niveles de hormonas reproductivas séricas (20)·(21)·(22).

3.3 Estrés oxidativo

3.3.1 Definición estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que conlleva un aumento de los radicales libres.

Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera alta inestabilidad. Cuando se producen en exceso reaccionan químicamente con las macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) y alteran las funciones celulares, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular (23).

De todos los radicales libres, las especies reactivas de oxígeno (EROs) son las más importantes, y entre ellas destacan el oxígeno molecular (O_2), el radical anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^-), y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, destacan el radical peroxilo (ROO^-), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados (24).

Entre los mecanismos de defensa para neutralizar a los radicales libres podemos encontrar dos tipos de antioxidantes, tipo enzimático y no enzimático. Las enzimas más importantes son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, y representan la primera barrera frente a la producción de radicales libres. Los de tipo no enzimático comprenden diversas moléculas como el glutatión, ubiquinol, vitamina E, vitamina C, betacarotenos, flavonoides y oligoelementos.

Cuando los radicales libres atacan a los lípidos se dañan las estructuras ricas en ellas, como las membranas celulares y las lipoproteínas. Este proceso se conoce como peroxidación lipídica, y genera numerosos subproductos como el malondialdehído (MDA). En el caso de las proteínas se oxidan los aminoácidos dando lugar a una pérdida de las funciones de las proteínas (transportadores, mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo, etc.). Cuando la molécula dañada es el ADN se producen serias consecuencias, como mutaciones, carcinogénesis o la pérdida de expresión por daño al gen específico.

3.3.2 Estrés oxidativo e infertilidad masculina

Cantidades controladas de EROs son necesarias para diversas funciones del espermatozoide, como la capacidad de fertilización, la reacción acrosómica, la hiperactivación, la motilidad y la capacitación (25). Sin embargo, cantidades excesivas se consideran tóxicas para el espermatozoide, y han sido identificadas como uno de los factores de riesgo asociados con la infertilidad masculina.

La capacitación es el proceso mediante el cual los espermatozoides adquieren capacidad para fecundar el óvulo y para lo que es necesario cantidades controladas de EROs. La capacitación tiene lugar en el tracto femenino y es un fenómeno necesario para la inducción del movimiento hiperactivo del espermatozoide, la capacidad de interactuar con la zona pelúcida, la reacción acrosómica y el inicio de la fusión con el ovocito.

Se ha observado que la incubación de espermatozoides con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno, óxido nítrico o anión superóxido estimula la capacitación espermática. Por otro lado, también se ha implicado a las EROs en la interacción del espermatozoide con el ovocito, ya que la peroxidación lipídica, causada por bajos niveles de EROs, conduce a la modificación de la membrana celular, facilitando así la adherencia del espermatozoide al ovocito (26).

Sin embargo, el exceso de EROs daña la membrana del espermatozoide, disminuyendo así su movilidad y capacidad de interaccionar con el ovocito. Además, las EROs dañan el ADN de los espermatozoides comprometiendo la contribución genómica paterna al embrión (27).

3.4 Distancia anogenital

3.4.1 Definición y características de la distancia anogenital (DAG)

La distancia anogenital (DAG) es una medida antropométrica utilizada inicialmente para sexar animales y presenta un dimorfismo sexual en mamíferos. Estudios en humanos también han confirmado que esta distancia es casi el doble en varones que en mujeres (28).

Existen dos variantes de la DAG: la primera, distancia ano genital alargada (DAG_{AP}) comprende desde la inserción del pene hasta el centro del ano, y la segunda, distancia anogenital acortada (DAG_{AS}), medida desde la base posterior del escroto hasta el centro del ano (29).

Actualmente la DAG se usa comúnmente en estudios de toxicidad animal como un indicador de la exposición antiandrogénica prenatal. Durante la séptima u octava semana de gestación sucede el periodo conocido como "Ventana de Masculinización Programada", dentro de la cual los andrógenos deben actuar para garantizar el correcto desarrollo del sistema reproductivo masculino. En este periodo es cuando la exposiciones a tóxicos ambientales podrían alterar el balance de las acciones androgénicas y estrogénicas, actuando como disruptores endocrinos, y afectando el desarrollo de los testículos y causando anomalías o alteraciones en el tracto reproductivo masculino, incluyendo la DAG.

3.4.2 Relación con los parámetros reproductivos masculinos

Según la hipótesis del síndrome de disgenesia testicular (TDS), la exposición a disruptores endocrinos durante la etapa prenatal conduciría a variaciones sutiles de los niveles hormonales que provocarían alteraciones funcionales y morfológicas del sistema o tracto reproductor masculino posnatalmente (30). La afectación de la función de las células de Sertoli daría lugar a una alteración importante de la diferenciación de las células germinales, que clínicamente se manifestaría como baja calidad seminal o incluso la Otransformación maligna hacia el cáncer testicular. Por otra parte, la disminución de la función de las células de Leydig conduciría a una

insuficiencia androgénica, que se manifestaría clínicamente como hipospadias y/o criptorquidia (31).

La exposición prenatal a disruptores endocrinos es difícil de determinar, aunque diversos estudios han mostrado una asociación entre las exposiciones fetales y los desórdenes en el sistema reproductivo masculino (32)(33).

La DAG ha sido recientemente propuesta como un biomarcador del correcto desarrollo genital tanto en adultos como en niños. Un acortamiento de la DAG se ha asociado con exposición a disruptores endocrinos (34) y relacionado con manifestaciones del TDS, como hipospadias y criptorquidia (35), así como con alteraciones en la calidad seminal (29), de los niveles de hormonas reproductivas (36) e incluso con el aumento de riesgo de cáncer de próstata (37).

4. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS

4.1 Justificación del estudio

La infertilidad es un problema de salud que afecta a entre un 4-17% de las parejas en edad reproductiva, y de ellas alrededor de 40% de los casos se deben a un factor masculino (38)·(39). En España aproximadamente el 15% de las parejas en edad fértil presentan problemas para concebir (40), dando lugar al aumento de las necesidades y demanda de técnicas de reproducción asistida.

En 1992 Carlsen y colaboradores realizaron una revisión de 61 artículos publicados desde 1938 a 1991 en la que se concluía que la concentración de espermatozoides estaba descendiendo aproximadamente 1 millón por mililitro anualmente (1%) durante los últimos 50 años. Distintos estudios realizados en los últimos años corroboran un significativo y progresivo descenso en la concentración seminal (41)·(42), aunque existe controversia al respecto.

Diversos estudios han identificado factores de riesgo que podrían afectar o estar relacionados con la calidad seminal, como por ejemplo la exposición a compuestos tóxicos y/o contaminantes (43)·(44)·(45), alteraciones hormonales (46), temperaturas altas (47), presencia de varicocele (48), uso de teléfono móvil (49), consumo de alcohol o tabaco (50) o dieta (51), aunque muchos de ellos todavía no se han estudiado suficientemente (52).

El principal objetivo de los estudios epidemiológicos sobre la calidad seminal o fertilidad masculina en España han sido los varones sanos jóvenes o voluntarios de entre 25 y 42 años de edad (53)·(54)·(55)·(56). No obstante, hasta donde conocemos, no existen estudios previos en nuestro ámbito más cercano que hayan estudiado

las asociaciones entre estos factores y los parámetros reproductivos en varones de parejas que consultan por problemas de infertilidad, lo cual nos condujo a la realización del presente estudio.

4.2 Objetivos generales y específicos

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el estudio de la fertilidad masculina, abordando el problema desde la perspectiva de posibles factores ambientales y hábitos de vida que pudieran alterar la calidad seminal y los niveles de hormonas reproductivas. También intentamos identificar marcadores que por sí solos pudieran ser pronósticos de una mala calidad seminal. Para ello seleccionamos como población de estudio a varones de parejas que acuden a consultas de infertilidad, ya que es una población relativamente poco estudiada en España y que sería representativa de los problemas de fertilidad masculina.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Analizar la asociación entre los niveles ambientales de plaguicidas organofosforados, medidos por sus metabolitos urinarios (dialquilfosfatos) y su relación con los parámetros reproductivos (calidad seminal y niveles hormonales) en varones de parejas que acuden a un servicio de infertilidad.
2. Evaluar la correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo (óxido nítrico y malondialdehído), y la capacidad antioxidante total (TAC), ambos medidos en suero y en semen, y sus

asociaciones con parámetros reproductivos (calidad seminal y niveles hormonales) en dichos varones.

3. Examinar las asociaciones entre las medidas de distancia anogenital (DAG) y la calidad seminal y su uso como un posible biomarcador clínico de la capacidad reproductiva en esta población de varones.

4.3 Conclusiones finales

1. Encontramos evidencias de que el aumento de la exposición ambiental a plaguicidas organofosforados se asociaría con una disminución del recuento de espermatozoides y su movilidad, así como a una alteración de los niveles de hormonas reproductivas. Nuestros resultados sugieren que estos compuestos tendrían un papel importante en la disrupción endocrina en varones de parejas potencialmente infértiles.
2. Según nuestros resultados el estrés oxidativo estaría relacionado con la calidad seminal en nuestra población de estudio. Encontramos una asociación inversa significativa entre los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo y el recuento espermático, la movilidad y el porcentaje de morfología normal. Además, el estrés oxidativo estaría relacionado con la alteración de los niveles de hormonas reproductivas en dicha población
3. Una DAG_{AS} alargada se asoció con un aumento de la concentración espermática, recuento total, y el recuento total de espermatozoides móviles en estos varones. La DAG podría resultar de interés como

posible biomarcador clínico de la capacidad reproductiva en varones, aunque son necesarios más estudios para corroborar estos resultados.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edit. World Health Organization, Geneva. Press. Geneva; 2010.
2. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat.* 1963 Jan;112:35–51.
3. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril.* 1972;17(6):705–21.
4. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2010;21(6):776–98.
5. Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod.* 1971 Apr;4(2):195–215.
6. Kerr JB. Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *J Electron Microscop Tech.* 1991 Oct;19(2):215–40.
7. de Kretser DM, Huidobro C, Southwick GJ, Temple-Smith PD. The role of the epididymis in human infertility. *J Reprod Fertil Suppl.* 1998 Jan;53:271–5.
8. Holstein A-F, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 14;1:107.
9. Lui W-Y, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2003 Apr;68(4):1087–97.
10. Jones RC. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl.* 1999 Apr;22(2):57–67.
11. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9:411–6.
12. Colborn T, Clement C. Chemically-induced alternations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton: ., editor. 1992.
13. Scaglia HE, Chichizola C. Disruptores endocrinos y función testicular. *Revista Internacional de Andrologia.* 2007. p. 181–92.
14. Turusov V, Rakitsky V, Tomatis L.

- Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environ Health Perspect.* 2002 Feb;110(2):125–8.
15. Gallo M., Lawryc N. Organic phosphorus pesticides. In: Hayes Jr., W.J., Laws Jr., E.R. (Eds.), *Handbook of Pesticide Toxicology: Classes of Pesticides*. Academic Press, New York, pp. .No Title. Hayes Jr., W.J., Laws Jr. ER, editor. 1991. 917– 1123 p.
 16. Weselak M, Arbuckle TE, Foster W. Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2012;10(1-2):41–80.
 17. Aguilar-Garduño C, Lacasaña M, Blanco-Muñoz J, Rodríguez-Barranco M, Hernández a F, Bassol S, et al. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. *Toxicology.* 2013 May 10;307:55–65.
 18. Blanco-Muñoz J, Morales MM, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Bassol S, Cebrián ME. Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Hum Reprod.* 2010 Jul;25(7):1787–95.
 19. Güven M, Bayram F, Unlühizarci K, Keleştimur F. Endocrine changes in patients with acute organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol.* 1999;18:598–601.
 20. Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, Recio R, Morán-Martínez J, Cebrián ME, et al. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Apr 1;196(1):108–13.
 21. Recio-vega R, Ocampo-gómez G, Borja-aburto VH, Moran-martínez J, Cebrian-garcia ME. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality : association between sperm parameters and urinary pesticide levels. 2008;674–80.
 22. Perry MJ, Venners S a, Chen X, Liu X, Tang G, Xing H, et al. Organophosphorous pesticide exposures and sperm quality. *Reprod Toxicol.* Elsevier Inc.; 2011 Jan;31(1):75–9.
 23. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21:361–70.
 24. Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna.* 2001 Jun;18(6):178–85.
 25. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006;18:325–32.

26. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res.* 2009;(April):357–67.
27. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility - A clinical perspective. *Human Reproduction Update.* 2008. p. 243–58.
28. Mendiola J, Roca M, Mínguez-Alarcón L, Mira-Escolano M-P, López-Espín JJ, Barrett ES, et al. Anogenital distance is related to ovarian follicular number in young Spanish women: a cross-sectional study. *Environ Health.* 2012 Jan;11:90.
29. 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.
30. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001;16:972–8.
31. Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Græm N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: Association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3836–44.
32. Bustamante Montes LP, Waliszewski S, Hernández-Valero M, Sanín-Aguirre L, Infanzón-Ruiz RM, Jañas AG. [Prenatal exposure to organochlorine pesticides and cryptorchidism]. *Cien Saude Colet.* 2010 Jun;15 Suppl 1:1169–74.
33. 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;115:8–14.
34. 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.
35. Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. *Curr Urol Rep.* 2008 May 9;9(2):137–42.
36. Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and

- reproductive hormone levels in adult men. *J Urol*. Elsevier Inc.; 2012 Feb;187(2):594–8.
37. 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.
 38. Tuttelman F, Nieschlag E. Clasificación de Andrological Disorders. *Andrology. Male Reproductive health and Dysfunction*, 3rd ed. 2010. 87-92 p.
 39. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Elsevier Ltd; 2011 Apr;25(2):271–85.
 40. SEF (Sociedad Española de Fertilidad). Estudio y tratamiento de la pareja esteril. Adalia. Madrid. 2007.
 41. Jouannet P, Wang C, EUSTACHE F. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *Apmis*. 2001;
 42. Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson A-M, et al. Is human fecundity declining? *Int J Androl*. 2006 Feb;29(1):2–11.
 43. Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med*. 2009;15(7-8):248–62.
 44. Mendiola J. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod Biomed Online*. 2008;16(6):842–50.
 45. Chang H, Shih T, Guo Y, Tsai C, Hsu P. Sperm function in workers exposed to N, N-dimethylformamide in the synthetic leather industry. *Fertil Steril*. 2004;
 46. Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl*. 2007;28(3):397–406.
 47. Bujan L, Mieusset R. Temperature and male fertility. *Contracept Fertil Sex*. 1996 Jun;24(6):429–38.
 48. Gokce A, Demirtas A, Ozturk A, Sahin N, Ekmekcioglu O. Association of left varicocele with height, body mass index and sperm counts in infertile men. *Andrology*. 2013 Jan;1(1):116–9.
 49. 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.
50. Marinelli D, Gaspari L, Pedotti P, Taioli E. Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *Int J Hyg Environ Health*. 2004 Jul;207(3):185–92.
 51. Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, Sarabia-Cos L, Vivero-Salmerón G, Vioque J, et al. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. *Hum Reprod*. 2012 Sep;27(9):2807–14.
 52. Povey a C, Clyma J, McNamee R, Moore HD, Baillie H, Pacey a a, et al. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study. *Hum Reprod*. 2012 Sep;27(9):2799–806.
 53. Corrales JJ, Cordero M, Galindo P, Burgo RM, Hernández J, Manuel Miralles J. Trends in semen quality in a non-industrialized population from the Salamanca area, Spain, during the last 30 years. *Med Clin (Barc)*. 2011 Mar 19;136(7):277–83.
 54. Fernandez MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, Toppari J, et al. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl*. 2012 Feb;35(1):1–10.
 55. Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, Sarabia-Cos L, López-Espín JJ, Vivero-Salmerón G, et al. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology*. 2013 May;1(3):408–13.
 56. López-Teijón M, Elbaile M, Alvarez JG. Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain. *Andrologia*. 2008 Oct;40(5):318–28.

6. COPIA DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

ARTÍCULO 1: ASSOCIATIONS BETWEEN URINARY ORGANOPHOSPHATE PESTICIDE METABOLITE LEVELS AND REPRODUCTIVE PARAMETERS IN MEN FROM AN INFERTILITY CLINIC.

“<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935115000055>”
[Associations between urinary organophosphate pesticide metabolite levels and reproductive parameters in men from an infertility clinic](#)

Publicado por *ENVIRONMENTAL RESEARCH*

ABSTRACT

Organophosphate (OP) pesticides are compounds used for pest control at home or in agriculture activities. Almost all OP pesticides are metabolized to at least one of six possible dialkylphosphates (DAPs). Despite OP are widely used, their potential effects on human reproductive health have not yet been fully characterized. The aim of this study was to evaluate the associations between urinary concentrations of six DAP metabolites and reproductive parameters in men. All men were attending an infertility clinic and provided urine, serum and semen samples on the same day. Six DAP metabolites were measured in urine (dimethylphosphate [DMP], dimethylthiophosphate [DMTP], dimethyldithiophosphate [DMDTP], diethylphosphate [DEP], diethylthiophosphate [DETP], and diethyldithiophosphate [DEDTP]). Sperm quality was assessed by measuring volume, concentration, total sperm count (TSC), motility and morphology, and serum samples were analyzed for reproductive hormones, including follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone, prolactin and estradiol. Pearson correlations were used for unadjusted analyses, and multiple linear regression analysis was performed controlling for appropriate covariates. All men presented detectable concentrations of at least one urinary OP metabolite. After adjustment by important covariates, there was a significant positive association between DEDTP concentrations and LH [$(\beta)=11.4$; 95% CI 0.81-22.1] as well as FSH levels [$(\beta)=3.2$; 95% CI 0.08-6.2].

Sperm concentration and TSC were both significantly inversely associated with DMP, DMDP, DMDTP and Σ DAP in multivariate analysis. Besides, there was a significant inverse association between percentage of motile sperm and DMTP, DMDTP and DEP metabolite concentrations. Our results suggest that exposure of OP pesticides may be associated with decreased sperm counts and motility and altered reproductive hormone levels in male partners of couples seeking for infertility treatment. However, further studies are warranted to confirm and extent these findings.

ARTÍCULO 2: IS ANOGENITAL DISTANCE ASSOCIATED WITH SEMEN QUALITY IN MALE PARTNERS OF SUBFERTILE COUPLES?

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.12059/full>
[Is anogenital distance associated with semen quality in male partners of subfertile couples? - Mendiola - 2015 - Andrology - Wiley Online Library](#)

Publicado por ANDROLOGY

ABSTRACT

Experimental studies have shown that anogenital distance (AGD) at birth reflects androgen concentrations during prenatal development and predicts adult AGD. In male rodents, shortened AGD is associated with compromised reproductive function. The aim of this study was to examine associations between AGD measures and semen quality in male partners of subfertile couples. All men were attending an infertility service and provided a semen sample and completed epidemiological questionnaires on lifestyle and general health. Two variants of AGD [from the anus to the posterior base of the scrotum (AGDAS) and to the cephalad insertion of the penis (AGDAP)] were assessed in 91 men. Semen parameters (semen volume, sperm concentration, total sperm counts, motility and morphology) were determined following WHO guidelines. Associations between AGD measures and semen quality were tested using multiple regression analyses controlling for appropriated covariates. In the multivariable analysis, significant positive association between AGDAS measures and sperm concentration, total sperm count and total sperm motile count were detected (p -values <0.05). This study represents the first analysis of AGD in potential infertile European men showing an association between perineal length and semen parameters. Therefore, AGD may be an important clinical biomarker of potential clinical interest to assess reproductive capability in men

ARTÍCULO 3: ASSOCIATIONS BETWEEN OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN DIFFERENT BODY FLUIDS AND REPRODUCTIVE PARAMETERS IN MALE PARTNERS OF SUBFERTILE COUPLES

"In press"

REVISTA INTERNACIONAL DE ANDROLOGÍA

ABSTRACT

Objective: To evaluate the correlations between oxidative stress (OS) biomarkers and total antioxidant capacity (TAC) in blood serum and seminal plasma, and their associations with semen quality and serum reproductive hormone concentrations in potential subfertile men.

Material and method: This is a cross-sectional study conducted in men (n=122) attending infertility services in the Murcia Region (Southern Spain) between 2012 and 2013. Concentrations of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and TAC were measured in blood and semen. Serum samples were analyzed for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, prolactin and estradiol concentrations. Semen analyses were performed according to World Health Organization criteria. Correlation analysis and multiple linear regression models were performed controlling for important covariates.

Results: There was a significant inverse association between serum MDA concentrations and all sperm parameters, except for seminal volume. Serum TAC concentrations were positively related to sperm count and motility. A positive association was observed between seminal plasma NO levels and the percentage of morphologically normal sperm. With regard to reproductive hormones, serum MDA concentrations were positively related with FSH and LH levels and TAC inversely associated with FSH levels.

Conclusions: Our results suggest that oxidative stress may be associated with semen parameters and reproductive hormone levels in male partners of couples seeking for

infertility treatment. However, further studies are warranted to confirm and extent these findings, in particular, with regard to serum reproductive hormones.