

Universidad de Granada
Facultad de Medicina

Departamento de Radiología y Medicina Física



**EXPOSICIÓN AMBIENTAL A 18 PLAGUICIDAS
ORGANOCORADOS Y SU EFECTO SOBRE
LA CALIDAD SEMINAL EN JÓVENES DEL
SURESTE ESPAÑOL**

Clemente Aguilar Garduño
Tesis Doctoral
2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Clemente Aguilar Garduño
D.L.: GR 3483-2010
ISBN: 978-84-693-5199-4

D. NICOLÁS OLEA SERRANO, Catedrático y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Coordinador de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Dña. **MARIANA F. FERNÁNDEZ CABRERA**, Investigadora Ramón y Cajal del Departamento de Radiología y Medicina Física y del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

Dña. **MARINA LACASAÑA NAVARRO**, Profesora e Investigadora de la Escuela Andaluza de Salud Pública de Granada.

CERTIFICAN:

Que el Licenciado en Biología. **CLEMENTE AGUILAR GARDUÑO** ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada "**EXPOSICIÓN AMBIENTAL A 18 PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD SEMINAL EN JÓVENES DEL SURESTE ESPAÑOL**", que presenta para aspirar al grado de Doctor en Biología. Revisada la misma la encuentran conforme para ser juzgada por el tribunal designado por la Universidad de Granada. Y para que conste y surta efecto donde proceda, firmamos el presente certificado.

Granada, a 7 de mayo del 2010

Prof. Dr. D. Nicolás Olea Serrano

Dra. Dña. Mariana F. Fernández Cabrera

Dra. Dña. Marina Lacasaña Navarro

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA



D. NICOLÁS OLEA SERRANO

Catedrático de Radiología y Medicina Física y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado por el Licenciado en Biología D. **CLEMENTE AGUILAR GARDUÑO** en el Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada. Y para que conste y surta efectos donde proceda, firmo el presente certificado,

Granada 7 de mayo de 2010

Fdo. Prof. Dr. Nicolás Olea Serrano

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título “**EXPOSICIÓN AMBIENTAL A 18 PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD SEMINAL EN JÓVENES DEL SURESTE ESPAÑOL**”, ha sido presentada por el Licenciado en Biología **D. Clemente Aguilar Garduño** para aspirar al grado de Doctor en Biología, habiendo sido dirigido por D. Nicolás Olea Serrano, Catedrático y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, Dña. Mariana F. Fernández Cabrera, investigadora del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, y Dña. Marina Lacasaña Navarro, Profesora de la Escuela Andaluza de Salud Pública de Granada

Granada, a 7 de mayo del 2010

Fdo. Clemente Aguilar Garduño

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias al proyecto de investigación Europeo “Salud Ambiental Reproductiva”, Proyecto No. QLRT-1999-01422, que desde un enfoque multicéntrico, se ha realizado en cinco países europeos (Finlandia, Dinamarca, Inglaterra, Francia y España) además de EE.UU. y Japón, y a la Subvención del “Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública” CIBERESP (No. CB/06/02/0049).

Se agradece, igualmente, la ayuda recibida de la Fundación del Hospital Clínico de Granada.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me han facilitado poder finalizar satisfactoriamente mi trabajo de tesis doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Nicolás Olea Serrano y a la Dra. Marieta F. Fernández Cabrera por la oportunidad que me dieron al integrarme a trabajar en su grupo de investigación y ofrecerme la oportunidad de venir a España a continuar con mi formación académica. Por haber valorado mi trabajo, por confiar en mi forma de hacer y por haber tenido la paciencia y la sencillez para entenderme, corregirme y conducirme para el mejor desarrollo de este trabajo, con profesionalidad, calidad y respeto.

También quisiera agradecer a la Dra. Marina Lacasaña, codirectora de esta tesis, por su asesoramiento y apoyo constante, y por ser mi compañera, amiga y madre de mis hijas.

A mis hijas Sofía y Ana Marina quienes son mi principal motivación, y a las que he privado de algunas atenciones por mi ocupación en el desarrollo de este trabajo de Tesis.

Resulta verdaderamente difícil citar a tanta gente que de una u otra manera me ha motivado o estimulado para continuar con mis estudios hasta éste grado. No puedo dejar de mencionar, en primer lugar a mi familia más cercana en México, a César, Mariana y Laura, quienes me han motivado de manera determinante.

Quiero agradecer en especial a mi Madre a quien le hubiera dado mucha alegría verme llegar a este momento, y saber que finalmente su esfuerzo continuo y constante, sus consejos para enseñarme los valores y principios desde mi primera infancia, y por apoyarme en todos los aspectos para que me desarrollara académica y profesionalmente, porque estaba segura de que todo ello finalmente serviría para convertirme en una mejor persona.

Vayan también mis más sinceros agradecimientos a mis hermanos Javier, Arcelia, Carolina, Macarena, Carlos, Verónica, América, Ernesto, Victor, Patricia, Octavio y Rosa, por su apoyo constante, y por la comprensión y estímulo que recibí por su parte y por creer en mi.

He de decir que me siento realmente afortunado por haber tenido la oportunidad de conocer a mis compañeros y compañeras de trabajo, a los que he llegado a apreciar como verdaderos amigos y amigas, quienes no han escatimado en demostrarme, en el día a día, que son ejemplares. Quiero agradecer de manera muy especial a JuanPe, Carmen, María José, Rosa, Reme, Noemí, Jalila, Esperanza, María, José Manuel, Alfredo, Pepi, Ángel, Jorge, Paloma, Irene, Natalia, Bea, Inma López, Nacho Ricci, Carmen, Jesús, Pablo, Rubén y Virginia, por haber compartido cafés, inquietudes, espacios, bromas, reuniones y emociones. Por haberme demostrado su cercanía, atención, comprensión y apoyo sincero, pero sobre todo por su gran calidad humana, generosidad y sencillez.

Asimismo, también quiero agradecer el apoyo y consejos de Mercedes, Manolo, Maribel, Cristina Campoy, José Juan Jiménez, Jorge Rosell y a muchos otros profesionales con los que he tenido la oportunidad de convivir y aprender de ellos.

A mis compañeros y compañeras del Departamento de Salud Pública, de la Universidad Miguel Hernández, que al igual que a los del Hospital Universitario San Cecilio, no puedo dejar de agradecer, pues en su momento me demostraron su aprecio y amistad, y aunque se encuentren en la distancia, los recuerdo a todos con mucho cariño y aprecio: a Inma Ferreros, Isabel, Manuela, Inma Jarrín, Eva, Rosa Ramón, Laura, Arantza, Nuria, Xavi, Javi, Cristina, Eva, Juan Bautista, Ramón y Juana.

Quiero agradecer también de manera muy especial a mis profesores de la Universidad Miguel Hernández: Ferrán Ballester, Paco Bolúmar, Julia del Amo, Ildfonso Hernández, Alberto Torres, Jesús Vioque, Marisa Rebagliato, Jesús Aranaz, Santiago Pérez-Hoyos, Carmen Martínez y Enrique Perdiguero, y tantos otros profesores y amigos de la Facultad de Ciencias de la UNAM como Lupita y José María Villarias que han contribuido de manera definitiva a mejorar mi formación como profesional de la Salud Pública.

Por último quiero especialmente mostrar mi agradecimiento a los jóvenes participantes en el estudio, ya que sin su participación hubiera sido imposible culminar este trabajo de Tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas organoclorados	5
Regulación del uso de plaguicidas organoclorados en un mercado globalizado	8
La exposición a COP y sus efectos sobre la salud reproductiva y la calidad seminal	11
El tejido adiposo blanco y el almacenamiento de los compuestos orgánicos persistentes	12
Efectos reproductivos de los agentes xenobióticos atribuidos a alteraciones epigenéticas	14
El sistema endocrino y la regulación del perfil hormonal masculino	15
Modo de acción estrogénico y androgénico de los disruptores endocrinos (DE)	18
La mecanismos de toxicidad estrogénica o androgénica se pueden agrupar en tres tipos principales	19
Estudios experimentales en animales o in Vitro	20
Estudios en humanos	21
El riesgo de exposición a plaguicidas	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
2.1 Hipótesis	29
2.2 Objetivos	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1.1 DISEÑO	33
3.1.2 Población de estudio	33
Criterios de inclusión	34
Criterios de exclusión	35
Instrumentos de recolección de información	35
Hoja de no respuesta	36
Cuestionario general de exposición previa potencial	36
Estado de salud	37
Condiciones socioeconómicas, estilo de vida y ocupación	37
Historial reproductiva	37
3.2 Exploración andrológica	38
3.3 Análisis de las muestras de semen: Recogida, entrega y preparación de las muestras para su análisis	39
3.4 Parámetros seminales analizados	40
Licuación	40
Aspecto	41
Volumen	41

Viscosidad	41
Acidez (pH)	41
Concentración espermática	42
Número total de espermatozoides (NTE)	43
Elementos celulares diferentes de los espermatozoides	43
Movilidad espermática	43
Morfología espermática	44
Tiempo de abstinencia	47
Tiempo entre la eyaculación y el comienzo del análisis	47
Material de laboratorio	47
Control de calidad	48
Entrega de informes	50
3.5 Muestras de sangre	50
3.5.1 Análisis hormonal	51
3.5.2 Determinación de residuos de plaguicidas en suero	51
El método de extracción utilizado fue el siguiente	52
Purificación de las muestras de suero mediante Sep-Pak	52
Cuantificación mediante Cromatografía de Gases con Detector por Captura de Electrones (CG/DCE)	53
Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)	55
Las condiciones de trabajo del CG fueron	55
3.5.3 Determinación de lípidos totales en muestras de suero	56
3.6 Análisis estadístico	57
Análisis de regresión lineal simple	57
Modelos predictivos de la exposición a plaguicidas organoclorados	58
Modelos de regresión logística múltiple para el NTE y el NTEM	59
Desarrollo de la base de datos	60
3.7 Consideraciones éticas	61
Aprobación por los Comités de investigación, bioseguridad y ética	61
4. RESULTADOS	63
4.1 Características de la población de estudio	65
4.1.1. Características antropométricas, sociodemográficas y del estilo de vida	66
4.1.2 Exploración andrológica	72
4.1.3. Análisis de las muestras de semen	76
4.1.4. Análisis de la morfología del semen	84
4.1.5 Determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre	86
4.2 Exposición a plaguicidas organoclorados	89
Número de residuos detectados por muestra	89

Concentración de residuos de plaguicidas organoclorados	89
4.2.1. Análisis de correlación de la exposición a los plaguicidas organoclorados seleccionados	91
4.3. Regresión lineal simple del NTE y sus determinantes	95
4.3.1. Regresión lineal simple para el NTE	95
4.3.2 Modelos de regresión lineal múltiple para el NTE y la concentración de los plaguicidas organoclorados	104
4.3.2.1 Primer modelo final para el NTE y la concentración de los plaguicidas organoclorados	104
4.3.2.2 Segundo modelo final para el NTE y la concentración de los plaguicidas organoclorados	107
4.3.2.3 Primer modelo final para el NTE y la presencia de los plaguicidas organoclorados	109
4.3.3 Modelos de regresión logística múltiple para el NTE	111
4.3.3.1 Primer modelo final de regresión logística múltiple para el NTE < 40 millones y los plaguicidas organoclorados	111
4.3.3.2 Segundo modelo final de regresión logística múltiple para el NTE < 20 millones y los plaguicidas organoclorados	113
4.3.3.3 Tercer modelo final de regresión logística múltiple para el NTE < 40 millones y los plaguicidas organoclorados	114
4.3.3.4 Cuarto modelo final de regresión logística múltiple para el NTE < 40 millones y los plaguicidas organoclorados	115
4.3.3.5 Quinto modelo final de regresión logística múltiple para la CE <20 millones de espermatozoides y los plaguicidas organoclorados	116
4.4 Análisis de regresión lineal simple para el NTEM, los plaguicidas organoclorados y sus determinantes	118
4.4.1 Análisis de regresión lineal simple para el NTEM y sus determinantes	119
4.4.2 Modelos de regresión lineal múltiple para el NTEM y la concentración de los plaguicidas organoclorados	127
4.4.2.1 Primer modelo final de regresión lineal para el NTEM	127
4.4.2.2 Primer modelo final de regresión lineal para el NTEM y la presencia de plaguicidas organoclorados	128
4.4.3 Modelos de regresión logística múltiple para el NTEM y los plaguicidas organoclorados	131
4.4.3.1 Primer modelo final de regresión logística múltiple para el NTEM y los plaguicidas organoclorados	131
4.4.3.3 Segundo modelo final de regresión logística múltiple para el NTEM y los plaguicidas organoclorados	132
5. DISCUSIÓN	135
6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFÍA	173
8. ANEXOS	197

8.1 Anexo I Cuestionario epidemiológico	199
8.2 Anexo II. Examen físico	211
ÍNDICE DE TABLAS	
Tabla 1. Determinación de la concentración espermática	42
Tabla 2. Porcentaje de recuperación para isómeros del endosulfán	53
Tabla 3. Tiempos de retención (TR) y desviación estándar (DE) de los OC	55
Tabla 4. Medidas de tendencia central para la antropometría y consumo de tabaco	66
Tabla 5. Características antropométricas, sociodemográficas y estilo de vida	67
Tabla 6. Datos sociodemográficos y de estilo de vida de los Padres	70
Tabla 7. Medidas de tendencia central del volumen testicular	72
Tabla 8. Exploración andrológica	75
Tabla 9. Medidas de tendencia central de los parámetros Seminales	76
Tabla 10. Parámetros seminales dicotómicos	79
Tabla 11. Descriptiva de la muestra de semen	82
Tabla 12. Medidas de tendencia central de la morfología espermática	85
Tabla 13. Porcentaje de formas normales menor a 4%	86
Tabla 14. Medidas de tendencia central de la bioquímica Sanguínea	87
Tabla 15. Hormonas en sangre	88
Tabla 16. Hormonas y equivalentes normales	89
Tabla 17. Concentración (ng/ml de suero) de los diferentes grupos de plaguicidas organoclorados, (no incluidos < LC)*	90
Tabla 18. Concentración (ng/ml de suero) de los diferentes grupos de plaguicidas organoclorados, (incluidos < LC)*	91
Tabla 19. Correlación de plaguicidas organoclorados para toda la muestra	93
Tabla 20. Correlación de plaguicidas organoclorados para niveles por encima del LC	94
Tabla 21. Regresión lineal simple entre NTE y variables antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida	96
Tabla 22. Regresión lineal simple entre el NTE y variables sociodemográficas y estilo de vida de los padres	97
Tabla 23. Regresión lineal simple entre el NTE y variables urológicas y seminales	98
Tabla 24. Regresión lineal simple entre el NTE y la morfología espermática	98
Tabla 25. Regresión lineal simple entre el NTE y la morfología espermática dicotómica*	99
Tabla 26. Regresión lineal simple entre NTE y el perfil hormonal	99
Tabla 27. Regresión lineal simple entre NTE y perfil hormonal dicotómico*	100
Tabla 28. Regresión lineal simple entre NTE y el perfil de lípidos	100
Tabla 29. Regresión lineal simple entre NTE y el perfil de lípidos dicotómico*	100
Tabla 30. Regresión lineal simple entre NTE y la movilidad	101

Tabla 31. Regresión lineal simple y el NTE frente a la presencia de plaguicidas	102
Tabla 32. Regresión lineal simple entre el NTE y la concentración de plaguicidas organoclorados	103
Tabla 33. 1er Modelo lineal final para NTE ajustado y la concentración de plaguicidas organoclorados	104
Tabla 34. 2o modelo final alternativo para NTE y la concentración de plaguicidas organoclorados	107
Tabla 35. Primer modelo final para NTE y la presencia de los plaguicidas organoclorados	109
Tabla 36. 1er Modelo de regresión logística múltiple para el NTE <40 millones y la presencia de plaguicidas organoclorados	112
Tabla 37. 2o Modelo de regresión logística para el NTE<20 millones	114
Tabla 38. Modelo de regresión logística para el NTE <40 millones	115
Tabla 39. Modelo de regresión logística con el NTE <40 millones a partir del modelo saturado	116
Tabla 40. Modelo logístico para la CE <20 millones/ml	117
Tabla 41. Regresión lineal simple entre NTEM y variables antropométricas, sociodemográficas y del estilo de vida	120
Tabla 42. Regresión lineal simple entre el número total de espermatozoides móviles y exploración urológica	122
Tabla 43. Regresión lineal simple entre el número total de espermatozoides móviles y la morfología espermática	122
Tabla 44. Regresión lineal simple entre NTEM y la morfología espermática	123
Tabla 45. Regresión lineal simple entre NTEM y el perfil hormonal	123
Tabla 46. Regresión lineal simple entre número total de espermatozoides móviles y el perfil hormonal bajo la mediana	124
Tabla 47. Regresión lineal simple entre NTEM y la concentración de lípidos específicos	124
Tabla 48. Regresión lineal simple entre NTEM y los lípidos específicos dicotomizados*	125
Tabla 49. Regresión lineal simple entre NTEM y la concentración de los plaguicidas organoclorados en suero (ng/ml)	125
Tabla 50. Regresión lineal simple entre NTEM y presencia de los plaguicidas organoclorados	126
Tabla 51. Primer Modelo Lineal Final del NTEM y los plaguicidas organoclorados en ng/ml	127
Table 52. Primer modelo final de regresión lineal múltiple del NTEM y la presencia de los plaguicidas organoclorados	129
Tabla 53. Primer Modelo Final de Regresión Logística Múltiple para NTEM<40 y presencia de plaguicidas organoclorados	131
Tabla 54. Modelo logístico para NTEM<40 y plaguicidas organoclorados presentes o ausentes	133
Figuras	49
8. ANEXOS	197
8.1 Anexo I. Cuestionario epidemiológico	199

8.2 Anexo II. Examen físico	211
8.3 Anexo III. Publicaciones del doctorando relacionadas al tema de calidad seminal	
8.3.1 Fernandez MF, Aguilar-Garduño C , Molina-Molina JM, Arrebolaa JP, Olea N. The total effective xenoestrogen burden, a biomarker of exposure to xenoestrogen mixtures, is predicted by the (anti)estrogenicity of its components. <i>Reproductive Toxicology</i> 26 (2008) 8–12.	213
8.3.2 Lopez-Espinosa MJ, Silva E, Granada A, Molina-Molina JM, Fernandez MF, Aguilar-Garduno C, Olea-Serrano F, Kortenkamp A, Olea N. Assessment of the total effective xenoestrogen burden in extracts of human placentas.	221
8.3.3 Lacasaña M. López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, Aguilar-Garduño C, Blanco-Muñoz J, Pérez-Méndez O, Gamboa R, Bassol S, Cebrian ME. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. <i>Toxicology and Applied Pharmacology</i> 243 (2010) 19–26	229
8.3.4 Blanco-Muñoz J, Mayanin-Morales M, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Bassol S, Cebrián ME. 2010. Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. <i>Hum. Reprod. Advance Access published April 30, 2010</i>	237

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Desde mediados del siglo pasado se conocen los efectos perjudiciales que los compuestos orgánicos persistentes (COPs) y, especialmente los plaguicidas organoclorados (OC), ejercen sobre la reproducción en diferentes especies animales. Además, en el último cuarto del siglo se han caracterizado las principales rutas de exposición a COPs en los seres humanos, poniéndose de manifiesto la universalidad de este fenómeno. A pesar de todo ello, sólo muy recientemente ha surgido el interés por dilucidar los efectos que sobre la salud reproductiva humana tiene la exposición crónica y ambiental a diferentes COPs. Este interés ha venido acompañado por una regulación más estricta del uso de algunos OC, que implica bien su restricción o limitación en el empleo e incluso alcanza la prohibición total (PISSQ, 1982)

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en todo el mundo con varios fines que van desde el incremento de la producción agrícola, al control de vectores, pasando por los terapéuticos. Debido a un empleo tan extendido, hay evidencias de que tanto los individuos directamente expuestos, por ejemplo los que viven aledaños a explotaciones agrícolas, hortícolas y florícolas, como los individuos de la población general contienen residuos de COPs en su organismo (OPS, 1982; Lacasaña y Farias 2002; Porta et al., 2008).

El presente estudio de tesis se incluye dentro de los objetivos del proyecto Europeo del 5º Programa Marco, “Salud Ambiental Reproductiva” [Proyecto No. QLRT-1999-01422], que desde un enfoque multicéntrico se ha realizado en cinco países europeos (Finlandia, Dinamarca, Inglaterra, Francia y España), además de EE.UU y Japón, para investigar el efecto de la exposición a un grupo importante de plaguicidas organoclorados sobre la salud reproductiva masculina. Los compuestos OC se determinaron por cromatografía de gases (GC) con detección por captura de electrones (DCE) y por espectrometría de masas (EM) por ser técnicas analíticas muy recomendadas. Se seleccionaron con criterios comunes y en cada país grupos de jóvenes de edad comprendida entre los 18 y los 23 años, utilizando el reclutamiento militar en aquellos países que era posible.

En los sujetos seleccionados, se recolectaron muestras de semen y sangre para determinar los parámetros indicadores de calidad seminal acordados y los compuestos químicos de interés, además de realizar una exploración urológica a los mismos. Además se les aplicaron cuestionarios estructurados con preguntas sobre variables sociodemográficas, de estilo de vida y de exposición previa potencial a otros determinantes de la calidad seminal, tales como las exposiciones a agentes químicos en el lugar de residencia, su ocupación y la utilización de medicamentos, tanto de los jóvenes como por parte de sus padres y madres, haciendo énfasis en la época relativa a la gestación de estos jóvenes.

El abordaje combinado que se proponía en el estudio internacional supera los principales sesgos atribuidos a estudios previos y presentaba una visión completa y actual de los factores que interactúan con los COPs para alterar la calidad seminal y, con ello, la fertilidad de la población estudiada. Lo cierto es que son pocos los trabajos sobre exposiciones ambientales y efectos endocrinos-disruptores que hayan evaluado exposiciones ambientales a través de la determinación directa de los xenobióticos y la evaluación simultánea de biomarcadores de exposición a plaguicidas y de sus efectos.

El grupo de jóvenes de España tiene características particulares que es necesario comentar. El estudio se realizó en Almería, una provincia de la comunidad autónoma Andaluza del sureste peninsular donde una parte importante de la población en edad reproductiva, pueden estar expuestos a gran variedad de plaguicidas. Recuérdese que esta provincia alberga una actividad agrícola dominada por el cultivo intensivo en invernaderos, además de que no es desdeñable la exposición por el uso doméstico de diferentes COPs y el consumo de alimentos contaminados durante su producción o conservación (Andersen et al., 2002).

Los COPs han sido ampliamente utilizados para el control de vectores y organismos transmisores de enfermedades del hombre y en la protección de los recursos agropecuarios y forestales (PISSQ, 1982). Se han utilizado especialmente para la lucha frente a gran número de enfermedades infecciosas y parasitarias, a las que han estado expuestas las poblaciones, o transmitidas por

vectores como las moscas, mosquitos, moluscos, arácnidos, entre otros. Entre estas enfermedades, algunas han sido, o son aún hoy en día, particularmente peligrosas y muy extendidas en varias regiones del mundo. Ejemplos paradigmáticos son la malaria, la filariosis, la esquistosomiasis, la tripanosomiasis y el dengue entre otras (PISSQ, 1982).

Inicialmente la lucha para controlar estas enfermedades tuvo un carácter curativo, pero con la introducción del DDT en 1942, usado en campañas de higiene se produjo un cambio, pasando a ser empleado para la prevención de enfermedades transmitidas por vectores (Olea, 2003). A partir de esa fecha, y aún en la actualidad en algunos países del mundo, el DDT se ha usado en campañas de control de vectores, aunque con grandes fluctuaciones en su producción y aplicación. Hoy en día existe la tendencia generalizada a reducir su utilización, dadas las legislaciones restrictivas en algunos países, basados en estudios toxicológicos, en la información existente sobre su alta persistencia en el ambiente y en el conocimiento de los efectos adversos en la fauna silvestre y el hombre. Por otra parte, el desarrollo de resistencia al DDT por parte los vectores de enfermedades ha contribuido también a la reducción de su uso (PISSQ, 1982).

Pero lo cierto es que el DDT ha contribuido, como ningún otro plaguicida lo ha hecho, a reducir en ciertas regiones del mundo la incidencia de algunas de las principales enfermedades transmitidas por vectores en las poblaciones, como la malaria y el tifus exantemático. Este éxito inicial del uso del DDT fue el principal motivo para la búsqueda de nuevos COPs con acción insecticida similar (Olea, 2003). Así, el metoxicloro, análogo del DDT, se utilizó ampliamente en el control de plagas domésticas. El lindano fue usado en el combate de moscas, mosquitos y para la eliminación de insectos parásitos del hombre. El clordano y heptacloro se han utilizado de forma limitada para controlar plagas domésticas (Olea, 2003).

Los plaguicidas OC, aldrín, dieldrín y endrín, también se usaron inicialmente para proteger la salud humana. El dieldrín se utilizó más intensamente en el control de mosquitos anofelinos, la mosca tsé-tsé y otros vectores, así como en el control de vectores en zonas tropicales y subtropicales.

Sin embargo, la resistencia desarrollada por las especies citadas el dieldrín tuvo que ser suspendido (Arias-Verdes et al., 1990)).

El uso de plaguicidas OC redujo temporalmente la incidencia algunas enfermedades mencionadas pero no las erradicó del todo y, actualmente algunas han resurgido en varios países y existe preocupación ya que entre los problemas que puede generar el cambio climático, esas enfermedades podrían resurgir en varios otros lugares.

La utilización del DDT en la lucha antivectorial a gran escala comenzó en 1945. La aplicación en el sector agropecuario tuvo un notable impacto pues se logró la reducción de las pérdidas en la producción de cultivos de considerable importancia para la alimentación mundial. El DDT tuvo aplicación en prácticamente todos los cultivos a excepción de las cucurbitáceas, para las cuales era fitotóxico (Árias-Verdes et al., 1990).

El exceso en las dosis y en el número de aplicaciones, así como las aplicaciones “preventivas”, caracterizaron el uso indiscriminado de los COPs en los primeros años. Esto fue debido, en principio, por la falta de conocimientos sobre los efectos adversos atribuidos a estos productos. Contribuyó enormemente su bajo costo (Olea, 2003).

A principios de la década de los 1960, debido a su toxicidad y el refuerzo por la liga de protección del ambiente, el uso del DDT empezó a declinar, especialmente en los países templados y fríos, en donde se probó su elevada persistencia (Árias-Verdes et al., 1990). Pero aún existe una falta notoria de información, a este respecto, en los países de climas tropicales, aunque existen evidencias del conocido como “efecto de destilación global” (Fernández y Grimalt, 2003), según el cual los COPs pueden viajar a través de la atmósfera, desde los sitios tropicales hasta los sitios más fríos, hacia los polos norte y sur, incrementándose su concentración en estos últimos, acumulándose a través de las redes tróficas y biomagnificándose en los niveles superiores de las mismas, en donde se encuentra el ser humano. Este fenómeno justificaría la presencia de este tipo de compuestos en pingüinos de la Antártida y en osos polares en el Ártico. De igual forma se ha detectado la presencia de COP en zonas de montaña

tan remotas como el Aconcagua en los Andes, el Himalaya, los Alpes y los Pirineos en Europa.

Cada vez crece más el cuerpo de la evidencia científica sobre el hecho de que cuando están presentes en combinación varios COPs, pueden producir efectos adversos, aun cuando estos estén presentes en concentraciones por debajo de los niveles de seguridad establecidos por las normas y estándares de las leyes nacionales o de las pautas o recomendaciones de organismos internacionales, como las guías de seguridad de la OMS (Kortenkamp et al., 2006; Ibarluzea et al., 2004). La exposición a mezclas complejas, aún cuando los compuestos individuales se encuentran por debajo de límites de seguridad, representan un riesgo importante, aún no bien caracterizado, para el desarrollo de efectos tales como la alteración de la homeostasis hormonal, del desarrollo y la madurez sexual (masculina y femenina), la aparición de malformaciones congénitas, o el desarrollo de diversos tipos de cáncer, como el de mama y el de testículo (Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2007).

Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas organoclorados

La elevada persistencia, baja volatilidad, alta liposolubilidad y baja velocidad de biotransformación y degradación, de los plaguicidas organoclorados, favorece que estos compuestos químicos permanezcan durante mucho tiempo en el ambiente. Estas características han provocado que los plaguicidas OC sean reemplazados por otros plaguicidas menos persistentes. Este proceso se inició a partir de los años 1970s en varios países aunque aún no ha culminado (Árias-Verdes et al., 1990; Prado-Flores et al., 2002).

La peligrosidad de los COPs es debida, además, por la estabilidad que les confieren sus características físicas, químicas y funcionales en el medio, a través del cual son transportados o distribuidos después de su emisión (PISSQ 1982; ATSDR 2002 a,b,c; Lacasaña y Farias, 2002; Porta et al., 2008).

En el caso particular del DDT, el compuesto comercial es metabolizado y sólo una pequeña proporción persiste como o,p'-DDT. Casi todo se transforma a p,p'-DDE, que es también altamente lipofílico (Árias-Verdes et al., 1990), característica que favorece su bioacumulación y biomagnificación a través de las redes tróficas.

Los plaguicidas OC constituyen un gran número de compuestos manufacturados cuya estructura general corresponde a la de los hidrocarburos clorados, que además de cloro, algunos contienen, en su estructura química, oxígeno, azufre o ambos (Árias-Verdes et al., 1990).

La mayoría de estos compuestos presentan una baja solubilidad en agua, pero son altamente solubles en la mayoría de disolventes orgánicos. En general los COPs presentan baja presión de vapor y alta estabilidad química, así como gran resistencia al ataque de los microorganismos (Árias-Verdes et al., 1990; ATSDR 2002 a,b,c; HSDB 2008 a,b,c). Su escasa solubilidad en agua y su elevada solubilidad en los disolventes orgánicos confieren a los COPs y a sus derivados alta lipofilidad en el tejido graso de los organismos.

Además, su baja presión de vapor, su alta estabilidad física y química, así como su resistencia a la acción de los microorganismos, confieren a los COPs una elevada persistencia en el ambiente, algunos de los cuales están entre los compuestos más persistentes en el medioambiente. Por la estructura química, modo de síntesis y otras propiedades comunes se han propuesto varias clasificaciones (Árias-Verdes et al., 1990):

- a): Plaguicidas OC aromáticos: DDT, Dicofol, Metoxicloro, Clorobencilato,
- b): Plaguicidas OC cicloalcanos: Hexaclorociclohexano (HCH),
- c): Plaguicidas OC ciclodienos: Aldrín, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, Mírex, Endosulfán, Clordano.
- d): Plaguicidas OC terpenos: Canfeclor (Toxafeno)

Entre los plaguicidas OC *aromáticos*, el DDT es prácticamente insoluble en agua a 25 °C, pero es moderadamente soluble o soluble en varios disolventes orgánicos como los hidrocarburos alifáticos, aromáticos, cetonas y alcoholes.

Presenta una baja presión de vapor de $1,9 \times 10,7$ mmHg a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, debido a lo cual no es considerado volátil, aunque puede ser transportado por el aire a partir del suelo en presencia de agua de forma continua. En presencia de la luz ultravioleta, el DDT pierde HCl y se transforma en DDE, el cual carece de acción insecticida. El resto de los plaguicidas aromáticos halogenados tienen comportamientos similares a las del DDT (Árias-Verdes et al., 1990).

De los plaguicidas *OC cicloalcanos*, el hexaclorociclohexano (HCH) es una mezcla de 8 isómeros, de los cuales el isómero conocido como gamma HCH o lindano, está presente en una proporción de 10-18%. Es precisamente el lindano el que proporciona las propiedades insecticidas al HCH, pues los otros isómeros tienen apenas efectos tóxicos agudos para los insectos y otros organismos (Árias-Verdes et al., 1990; ATSDR 2005, b; HSDB 2008 h,i).

Aunque la toxicidad del HCH así como otras propiedades ambientales de sus isómeros no se han estudiado completamente, se sabe que el lindano (o gamma HCH) es ligeramente soluble en el agua (10 mg/L) y es muy soluble en acetona, benceno, cloroformo y etanol. Presenta baja presión de vapor ($9,4 \times 10,6$ mmHg a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Es estable en presencia de luz solar, del oxígeno del aire, del calor y de los ácidos concentrados, pero se descompone en medios alcalinos y libera con facilidad ácido clorhídrico (Árias-Verdes et al., 1990; ATSDR 2005; HSDB 2008 h,i).

Entre los plaguicidas *OC ciclodienos*, el clordano es una mezcla de varios hidrocarburos clorados estrechamente relacionados entre sí, por sus estructuras. Contienen aproximadamente el 70% de cis-clordano, el 25% de trans-clordano, el 1% de heptacloro y el 4% restante de otros compuestos. Es de volatilidad intermedia entre el lindano y el DDT y es prácticamente insoluble en agua, pero es soluble en éteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Árias-Verdes et al., 1990; ATSDR 2002b; HSDB 2008 c,i).

Los ciclodienos son relativamente estables en ácidos, pero en medios alcalinos, liberan fácilmente ácido clorhídrico, en forma semejante al heptacloro. Así, el endosulfán es poco soluble en agua. Se disuelven preferentemente en cloroformo, tetracloruro de carbono, xileno y otros disolventes orgánicos. También

son moderadamente solubles en etanol, y son estables a la humedad, al oxígeno del aire o al calor; y no se degradan en presencia de la luz ultravioleta. El endosulfán es sensible a ácidos y bases y en presencia del agua se hidroliza formando endosulfán diol, el cual carece de acción insecticida (Árias-Verdes et al., 1990; HSDB 2008e).

El aldrín, otro plaguicida OC ciclodieno, presenta una baja presión de vapor ($7,5 \times 10,5$ mmHg a 20 °C). Es poco soluble al agua y es estable en ácidos débiles, bases y al calor. Pero es sensible a la acción de la luz ultravioleta y a los ácidos fuertes. En los seres vivos se transforma a dieldrín, que es más estable. El dieldrín y el endrín presentan características fisicoquímicas similares a las descritas para el aldrín (Árias-Verdes et al., 1990; ATSDR 2002 a; HSDB 2008 d,f).

Por último el mírex forma cristales incoloros y tiene un punto de fusión de 485 °C, y una muy baja presión de vapor. Es insoluble en agua, pero es moderadamente soluble en benceno, tetracloruro de carbono, xileno y otros disolventes orgánicos, además es altamente estable y persistente en condiciones ambientales (Árias-Verdes et al., 1990; ATSDR 1995; HSDB 2008 j).

Regulación del uso de plaguicidas organoclorados en un mercado globalizado

Aunque la mayor parte de los COPs han sido ya retirados del mercado legal, en la mayoría de los países industrializados, su uso fraudulento (Porta et al., 2002), o incluso el uso legal de compuestos como la vinclozolina, un fungicida ampliamente usado en la vid, o para la conservación de cítricos, o del endosulfán empleado en algunas regiones de la Península Ibérica, determina que la exposición actual directa sea posible.

Además, el uso legal en países en los que, a diferencia de lo que ha ocurrido en España, no han sido prohibidos, restringidos o severamente limitados en cuanto a su producción y uso, da lugar a que la exposición directa siga

ocurriendo. Además, posiblemente una de las consecuencias del mercado globalizado es que algunos productos contaminados con COPs entren en los mercados legislados como el español.

Todo lo expuesto anteriormente ha permitido su bioacumulación y biomagnificación en especies situadas en los niveles más altos de las redes tróficas, entre las que se encuentran los seres humanos, y los COPs representan actualmente el grupo de compuestos químicos de síntesis más frecuentemente detectados en las muestras de sus tejidos (Porta et al., 2008).

El caso de España es especialmente preocupante en lo que respecta al empleo de agroquímicos ya que reúne características ambientales y económicas muy particulares. El uso de fitosanitarios (fertilizantes y plaguicidas) en la agricultura española ha permitido entrar en un mundo económico afectado por las reglas de mercado. La agricultura intensiva en algunas áreas geográficas se ha desarrollado tanto que ha modificando los sistemas de producción, consumo de energía, agua y fitosanitarios para incrementar el rendimiento en la producción, se ha equiparado al de actividades industriales, de manera que actualmente se habla de agricultura industrial (Olea, 2003).

La historia del desarrollo industrial muestra tal falta de planificación y problemas en la protección ambiental, que hoy día son ejemplos dramáticos de las consecuencias adversas para la salud humana (García, 1999); es urgente analizar estas experiencias para no caer en los mismos errores del pasado (Olea, 2003).

Los impulsores de la agricultura intensiva se han preocupado más por cumplimiento estricto de las normas establecidas, que por proteger la salud de las personas, directa o indirectamente, expuestas a los fitosanitarios. Las características de la costa mediterránea han propiciado el establecimiento de la agricultura intensiva, ha propiciado la proliferación de extensas áreas de cultivos al aire libre y en invernaderos, en las provincias de Almería y Granada, estos y otros factores como las condiciones físicas del ambiente, con un elevado promedio de horas de sol al año, la ausencia casi total de heladas y la existencia de mantos acuíferos, y la creación de un suelo artificial, han producido las

condiciones adecuadas para incrementar el cultivo agrícola, en tal grado que el suelo exige tratamientos especiales de gran variedad de fitosanitarios, incluidos algunos COPs, de manera que las actividades agrícolas han alcanzado niveles industriales de consumo de fitosanitarios (Olea, 2003).

La Región Andaluza cuenta con una superficie de 87.268 Km² y corresponde al 17,3% de la superficie de España. Es una región agrícola caracterizada por gran diversidad de frutas y hortalizas, que representan cerca del 35% de la producción agrícola, a pesar de que la superficie dedicada a estos cultivos representa sólo el 7,7% de la superficie cultivada (Olea, 2003).

Más del 40% de la producción de hortalizas se realiza en las provincias Andaluzas en la zona próxima al Mediterráneo. En donde, a partir de la mitad del siglo pasado, el cultivo bajo plástico alcanzó altísimos niveles de rendimiento y cosechas extra-tempranas (Olea, 2003).

Las condiciones de humedad, temperatura y abastecimiento de agua son controladas dentro del invernadero. El uso de plaguicidas alcanza el máximo uso en comparación a todos los otros usos agrícolas. Normalmente se usan en promedio 40 Kg/Ha de diversas mezclas de plaguicidas en invernaderos (Olea, 2003).

En Almería en el año de 1997 se produjeron cerca de 2 800 000 Toneladas métricas (Tm) de hortalizas, de las que el 45% fue dedicado a la exportación (Herrera et al., 1998). Este éxito del sistema productivo produjo cambios en la estructura del territorio y del paisaje, llevando a una organización de tipo urbano dentro de un medio agrícola, en el que se mezclan invernaderos y asentamientos humanos, con la generación de grandes grupos de población expuestas a los riesgos de ambos tipos de asentamientos (Olea, 2003).

La expansión demográfica debido a la concentración poblacional ha sufrido los cambios administrativos necesarios. Han aparecido nuevas enfermedades debidas a intoxicaciones agudas y a exposiciones crónicas a esas mezclas de plaguicidas y productos químicos agrícolas. Constantemente aparecen nuevas publicaciones sobre los trastornos sanitarios en la población del sureste español

por la exposición a plaguicidas, documentando intoxicaciones agudas (Olea, 2003).

La exposición a COPs y sus efectos sobre la salud reproductiva y la calidad seminal

Los plaguicidas organoclorados, así como los COPs en general, son como ya hemos indicado, muy persistentes, por lo que la exposición a estos compuestos, a pesar de que algunos han sido prohibidos, restringidos o severamente limitados en algunos países desde hace más de 30 años, continúan representando un riesgo para la salud pública en las poblaciones generales de la mayoría de países a través del mundo, incluidos los más desarrollados (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2003, Bush et al., 1986; Dallinga et al., 2002; Hauser et al., 2003; Richthoff et al., 2003; Phillips et al., 1989).

Diferentes autores han demostrado que algunos COPs son disruptores endocrinos pues modifican los niveles séricos de las hormonas de la pituitaria (sexuales y tiroideas), ocasionando alteraciones en el sistema reproductivo y en el desarrollo. En estos se sugiere que las alteraciones dependen tanto de la intensidad de la exposición, como del tipo de plaguicidas individuales o mezclas a las que se está expuesto (Porta et al., 2008).

Desde el último cuarto del siglo pasado a la fecha se han publicado más de un centenar de estudios sobre los efectos adversos, en la calidad seminal, asociados a la exposición a xenobióticos, sin embargo se han encontrado evidencias contradictorias, que se han atribuido principalmente a inconsistencias en: los diseños, los grupos de estudio, en la falta de estandarización de los métodos de análisis y en la aplicación de los mismos. Por otra parte ha faltado unificación y armonización de criterios, y la definición clara y estandarizada de las variables.

El tejido adiposo blanco y el almacenamiento de los compuestos orgánicos persistentes

El tejido adiposo blanco (TAB) representa entre el 15 y el 25% del peso corporal, porcentaje que puede incrementarse incluso hasta el 50% en casos de obesidad mórbida. Más del 70% de la peso total del TAB está formado por lípidos, por lo que favorece que este tejido represente el mayor reservorio de COPs, entre los que se encuentran los plaguicidas OC por su alta lipofilidad (Covaci et al., 2002).

El TAB es también un órgano endocrino formado por adipocitos, y modula la actividad de factores clave para la transcripción, y el control de la diferenciación, el metabolismo y la función secretora de los mismos. Su metabolismo se regula por innervaciones del sistema simpático y por muchas hormonas, como la insulina, las catecolaminas, las tiroideas y esteroideas, lo que demuestra que el TAB es el principal órgano endocrino del organismo (Mullerova y Kopecky, 2007).

El TAB como un órgano endocrino produce muchas citocinas (adipocinas como la leptina, adiponectina, y visfatina, resistina, o el factor alfa de necrosis tumoral, entre muchas otras moléculas), que actúan de manera paracrina o también como reguladoras del metabolismo de otros tejidos. Afectando al peso corporal, la sensibilidad o resistencia a insulina, la inflamación, la fibrinólisis, la aterogénesis y la presión sanguínea (Mullerova y Kopecky, 2007).

La proliferación de precursores celulares y su diferenciación en adipocitos maduros es controlada por varios factores nucleares de transcripción del receptor gamma, activador o proliferador del peroxisoma (RAPP o PPAR, por su sigla en inglés) el cual representa una de los elementos clave en su regulación. Su activación por varias proteínas transportadoras (como los ácidos grasos y los eicosanoides) inicia la heterodimerización permisiva con el receptor cis del ácido retinoico (RA) ligado a un receptor retinoide X (RRX, en inglés RXR).

Este complejo se une a los elementos de respuesta del RAPP en los promotores de los genes blanco, con la ayuda de coactivadores (como el coactivador 1 del gamma RAPP y CGR-1, o PGC-1, en inglés) que inicia el

proceso de la transcripción para promover la diferenciación del adipocito (Mullerova y Kopecky, 2007).

Los plaguicidas OC pueden actuar, como disruptores endocrinos, uniéndose a los receptores arilo de los hidrocarburos (AhR), RAPP, RAR/RRX y a receptores estrogénicos (RE) y modular la diferenciación, el metabolismo y hasta la función del TAB, así, los contaminantes ambientales, pueden afectar no sólo el papel fisiológico del TAB, sino también afectar el desarrollo de enfermedades relacionadas, como la obesidad, por la interacción directa con la maquinaria transcripcional en los adipocitos (Mullerova y Kopecky, 2007).

Los plaguicidas OC, pueden contribuir con el ciclo del peso con el llamado “efecto yoyó”, un complicado mecanismo basado en la acumulación de estos plaguicidas en su reservorio dinámico, el TAB, y la modulación por los COPs del fenotipo de sus componentes, los adipocitos (Mullerova y Kopecky, 2007).

El “efecto yoyó”, de acuerdo a Mullerova y Kopecky (2007), podría incluir las siguientes etapas:

- a) Una acumulación de contaminantes ambientales en el TAB.
- b) Principalmente los COPs resistentes a la degradación biológica o química.
- c) La acumulación de gran cantidad de COP y sus congéneres e isómeros, con diversos efectos biológicos.
- d) Múltiples interacciones entre esos isómeros, frecuentemente con efectos adversos opuestos, que frecuentemente tienen consecuencias más graves que los atribuidos a los compuestos de los cuales provienen, complicando aún más la evaluación de peligros y riesgos para la salud.
- e) El TAB es un órgano clave para la homeostasis energética, por si sólo libera metabolitos y adiposinas a la circulación, con efectos sistémicos sobre la sensibilidad a la insulina, la participación del combustible en los músculos y otros tejidos. Su papel benéfico se pierde con la obesidad, ya que la acumulación excesiva de TAB participa en el desarrollo de graves enfermedades como la diabetes.

f) Los COPs pueden interferir en el efecto de las proteínas endógenas transportadoras de factores de transcripción nucleares, y participan en la diferenciación, metabolismo y en la función secretora de los adipocitos.

Estos autores han referido otras condiciones que podrían participar en el “efecto yo-yó”:

i) La potencia como plaguicidas OC, o las mezclas o cócteles de ellos en andrógenos, estrógenos u hormonas tiroideas, en cuanto a funciones y metabolismo del TAB.

ii) La interferencia de agentes químicos como dioxinas con la homeostasis del ácido retinoico, y su probable impacto en los receptores retinoides.

iii) La interacción con la actividad transcripcional de los receptores de las actividades proliferadoras del peroxisoma, y con ello la acumulación y acción de los COPs, en el TAB, representa un mecanismo único para explicar, al menos en parte, los efectos de los COPs en el organismo entero, por la modulación de la diferenciación, metabolismo y función del TAB, por lo que los COPs podrían no sólo afectar el papel fisiológico del TAB, sino también el desarrollo de enfermedades relacionadas con la obesidad.

Efectos reproductivos de los agentes xenobióticos atribuidos a alteraciones epigenéticas

Los efectos epigenéticos, según Jones y Takai (2001) son el fenómeno molecular que regula la expresión génica sin la presencia de alteraciones en la secuencia de ADN. Entre las alteraciones epigenéticas más estudiadas está la metilación de los nucleótidos en los sitios CpG, esenciales para la programación del desarrollo en mamíferos (Li et al., 1992; Okano et al., 1999; Holliday 1989; Morgan et al., 2005).

Los mamíferos utilizan la metilación del ADN en los sitios de CpG para: i) regular la transcripción de los genes, lo que altera el posicionamiento

cromosómico; ii) Promueve la desactivación del cromosoma X; iii) controla los genes de programación del desarrollo (“imprinting genes”); y iv) reprime la actividad de los ADN parásitos (Jones y Takai 2001; Morgan et al., 2005; Roemer et al., 1997; Lane et al., 2003; Waterland y Jirtle 2003; Ruden et al., 2005).

Las alteraciones en la metilación del ADN pueden resultar en múltiples enfermedades, por ejemplo infertilidad masculina (Cisneros 2004), autismo (Muhle 2004) e incluso el cáncer (Lund y Lohuzen 2004; Esteller y Hernán 2002).

Diversos agentes químicos, incluidas algunos compuestos tóxicos medioambientales, alteran los patrones de metilación del ADN, produciendo fenotipos epigenéticos específicos (Cisneros 2004; Anway et al., 2005), por ejemplo los efectos transgeneracionales de algunos contaminantes ambientales que producen la alteración de un cromosoma o de una línea germinal.

Se ha estudiado la exposición transitoria, de ratas durante su gestación, concretamente en la etapa de la determinación de las gónadas sexuales, a vinclozolina (un antiandrógeno) o al metoxicloro (un estrógeno), y se ha comprobado que los machos adultos de la primera generación (F1) presentan un fenotipo con una capacidad espermatogénica disminuida (tanto en el número de células como en su viabilidad), lo que conduce a un incremento de la infertilidad (Anway et al., 2005).

El sistema endocrino y la regulación del perfil hormonal masculino

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG), o eje reproductivo, está formado por tres elementos, el hipotálamo que secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la parte anterior de la hipófisis (adenohipófisis) que libera las gonadotropinas (LH y FSH) y las células somáticas de las gónadas (células de Leydig y Sertoli, en los testículos) (Damstra et al., 2002).

La secreción de las gonadotropinas es distintiva; mientras que la LH es liberada por un estímulo muy agudo de la GnRH, la FSH es retrasada y puede requerir varias horas (Damstra et al., 2002). La vida media de la LH es de una hora, mientras que la de la FSH puede durar cinco veces más (Vázquez, 1984).

La secreción diferencial de LH y FSH puede deberse a diferentes factores: a) la frecuencia de pulsos de GnRH; b) la cantidad de receptores de la GnRH en la superficie de las células gonadotrópicas; c) efectos en los reguladores de los esteroides (andrógenos, estrógenos y progesterona) y en los péptidos (activina, inhibina y folistatina) en mamíferos (Padmanabhan y McNeilly 2001; Supornsilchai et al., 2007).

Son muchas las pruebas experimentales que relacionan la estrogenicidad con varios mecanismos biológicos, desde la conducta sexual, hasta la autoregulación de las gonadotropinas (FSH y LH). Así, la FSH estimula la liberación de testosterona por la LH. La LH llega a las células de Leydig en donde estimula a las células intersticiales para secretar testosterona, e induce la espermatogénesis en las células de Sertoli (Van de Graaf y Rhee 1999; Damstra et al., 2002).

A partir del acetato y el colesterol se sintetiza la testosterona. La fuente predominante de producción de estrógenos es la conversión de androstenediona a estrona en los tejidos periféricos, la cual es catalizada por la aromatasa (Evans 1994), una enzima de la familia del citocromo P450, cuya actividad se ha relacionado también con la velocidad del metabolismo del colesterol, y con el metabolismo de la testosterona, además de relacionarse por otra parte con la tasa de hidrólisis de algunos plaguicidas (Harmer et al., 2008).

La presencia de prolactina es esencial en la esteroideogénesis, probablemente por el incremento en el número de receptores de LH de las células de Leydig (Vázquez, 1984). Las células de Sertoli secretan inhibina B, la cual llega a la hipófisis e inhibe la secreción de FSH (Damstra et al., 2002).

La testosterona una vez en el plasma se encuentra en un 97-98% ligada a una proteína, la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y sólo el 2-3% esta activa. Esa unión testosterona-SHBG permite que el esteroide tenga una vida media prolongada (Damstra et al., 2002).

El córtex adrenal (especialmente la zona fasciolada) es el sitio más común de lesiones en el sistema endocrino (Ribelin et al., 1984; Thomas, 1993). Los determinantes principales son: la gran vascularización o el desproporcionado

aumento de irrigación sanguínea. El alto contenido de lípidos y con ello de la susceptibilidad por peroxidación de sus ácidos grasos no saturados, los elevados niveles de enzima P450 que metabolizan xenobióticos a sus respectivos intermediarios y la producción de especies reactivas al oxígeno (Hornsby et al., 1983). Su único papel es la gestión del estrés, las adrenales expresan varias rutas de producción de esteroides en el ovario y los testículos, algunos compuestos químicos de síntesis pueden afectar las adrenales o sus ejes, directa o indirectamente, y de manera parecida en el ovario y los testículos

Por otro lado, Kumar y colaboradores (2007) han demostrado que el hipotiroidismo se asocia a una declinación en los niveles de testosterona en hombres, reducción que es reversible a través de la terapia de remplazo con tiroxina, antes de estos autores no se había descrito en hombres la relación entre los niveles de testosterona sérica y el hipotiroidismo subclínico (TSH < 10 mIU/L) (Kumar et al., 2007). Kumar y colaboradores analizaron en un grupo de hombres de 20 a 54 años de edad con hipotiroidismo subclínico, sus niveles de gonadotropinas esteroides en testículos y los compararon con pacientes con perfiles eutiroideos, determinando los niveles de LH, FSH, prolactina, testosterona, SHBG, progesterona y estradiol (Kumar et al., 2007). Observaron que los pacientes con hipotiroidismo subclínico presentaban reducciones en los niveles de testosterona y de su precursor la progesterona, y sugirieron que la testosterona se redujo por la falta de su precursor, la progesterona. Pero no observaron alteraciones en estradiol en los grupos estudiados, lo que sugiere una mayor velocidad de conversión de testosterona a estradiol en los pacientes con hipotiroidismo subclínico, para mantener los niveles de estradiol. Por otra parte, los niveles de prolactina presentaron un leve incremento significativo en los pacientes con hipotiroidismo subclínico, lo que sugiere una asociación directa del hipotiroidismo y el hipoandrogenismo (Kumar et al., 2007). De acuerdo a lo expuesto, el hipotiroidismo subclínico puede resultar en una deficiencia de testosterona, y por ello cualquier alteración en el perfil hormonal masculino debería tener en cuenta la homeostasis de las hormonas tiroideas.

Modo de acción estrogénico y androgénico de los disruptores endocrinos (DE)

Los compuestos químicos-disruptores endocrinos (DE) son sustancias exógenas al organismo (xenobióticos), naturales o manufacturadas (fabricadas por los seres humanos), que alteran las funciones hormonales a través de diferentes mecanismos. SE conoce muy poco sobre los mecanismos biológicos involucrados y aunque estos quedan fuera del alcance de este estudio epidemiológico los resumiremos a continuación.

La actividad estrogénica y antiestrogénica de los DE se debe a la competencia con los estrógenos endógenos por el enlace con sus receptores (ER), actuando como agonistas menos potentes o inhibiendo la actividad estrogénica endógena, que a su vez puede identificarse a través de ensayos de activación de receptores hormonales y por la comparación de los resultados de la potencia biológica de naturaleza antagonista.

Los principios de acción de los DE como agonistas o antagonistas hormonales son dos: pueden mimetizar hormonas y producir un efecto hormonal, o interferir la unión de las hormonas endógenas a sus receptores, inhibiendo así la respuesta hormonal (a los niveles periférico o central).

A nivel androgénico los DE pueden actuar en dos formas, ya sea impidiendo a los andrógenos unirse a sus receptores, o bien impidiendo la unión del andrógeno a sus receptores (en la hipófisis o el hipotálamo) (Svechnikov et al., 2005).

Existen evidencias experimentales de la actividad como DE de algunos COPs, y de su efecto en los niveles hormonales de los distintos ejes: reproductivo (HHG); adrenal (eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, (HHA)), y metabólico (eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, (HHT)), que han mostrado ser de particular importancia en el mantenimiento de la salud reproductiva.

Algunos plaguicidas, por ejemplo, inhiben la síntesis de esteroides hormonales, interfiriendo en la unión de lecturas fisiológicas para los receptores de esteroides y las proteínas transportadoras (Zaidi et al., 2000). Pueden alterar

también las rutas metabólicas de eliminación de hormonas endógenas, o pueden generar productos metabólicos más potentes, de forma que alteran los niveles hormonales normales. Por otro lado, también pueden afectar las moléculas de ADN que codifican la formación de las células del hipotálamo anterior, o de los sustratos o precursores de los reguladores del eje reproductivo (Chen et al., 2005; Fujii et al., 2001).

Se ha sugerido también que los DE pueden alterar los niveles de neurotransmisores en el encéfalo, afectando los niveles de hormonas reproductivas e inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa encefálica (AChE), la monoamino oxidasa-A (MAO-A) y la monoamino oxidasa-B (MAO-B), estas dos últimas degradadoras principales de dopamina; por lo que se pueden incrementar las concentraciones de acetilcolina, dopamina, ácido gamma aminobutírico, epinefrina, norepinefrina y 5-hidroxitriptamina. La exposición a DE también se ha asociado a una reducción en las concentraciones séricas de LH, progesterona y prolactina (Glisson et al., 1974; Gupta et al., 1984).

Algunos plaguicidas-DE pueden bloquear los receptores de andrógenos, a través de la inhibición de los neurotransmisores colinérgicos, y alterar los niveles séricos de las hormonas, cuya liberación es regulada mediante dichos receptores o neurotransmisores, y así afectan el desarrollo y la maduración de los órganos reproductivos.

Los mecanismos de toxicidad estrogénica o androgénica se pueden agrupar en tres tipos principales:

1) *Toxicidad Tipo I o primaria.* Aparece cuando la glándula adrenal representa el órgano blanco de los DE. La gravedad puede predecirse por las características o propiedades toxicocinéticas del DE específico, como por ejemplo la destrucción adrenocortical por el mitotano (o,p'-DDD) (Colby y Longhurst, 1992; Atterwill y Flack, 1992).

2) *Toxicidad Tipo II o secundaria.* Es debida al estrés químico producido por la exposición a estos compuestos (Walker y Cooper, 1992; Hardley et al., 1990;

Spindel et al., 1984) como por ejemplo, la atrofia testicular por la exposición a ftalatos, que resulta de alteraciones en la producción de hormonas gonadotrópicas, y

3) *Toxicidad Tipo IIIa o IIIb, o toxicidad indirecta*, que resulta cuando:

a) El efecto específico ocurre en un órgano, ajeno al sistema endocrino: Afecta al HHA Tipo IIIa (Rehulka et al., 1987) o, la toxicidad hepática producida por el fenobarbital,

b) Toxicidad Tipo IIIb, debida al incremento en los niveles de cortisol que produce estrés químico pudiendo potenciar los efectos tóxicos de otros agentes, sobre la glándula adrenal (Supornsilchi et al., 2007).

Estudios experimentales en animales o *in vitro*

La mayor parte de los estudios han abordado el efecto estrogénico de los COPs por su capacidad para competir por los receptores de estrógenos. Evidencias recientes sugieren que varias anomalías en el desarrollo sexual masculino son mediadas por la competencia por los receptores de andrógenos, por lo que la presencia de un potente antiandrógeno puede crear un ambiente estrogénico y producir síntomas similares a los de la exposición a estrógenos (Kelce et al., 1997).

Tamura y colaboradores (2001) evaluaron la interacción del fenitrotión con el receptor de andrógenos humanos (AR), después de transfectar transitoriamente células de hepatoma humano con un AR humano dependiente de la luciferasa, como gen “reportero”, tras la exposición a dihidrotestosterona. Observaron que el plaguicida bloquea la actividad del andrógeno- dihidrotestosterona dependiente de la unión al receptor (AR-dependiente), en una relación dosis - competencia.

Visón y Hunteld en 2002, estudiaron en células adrenocorticales generadoras de esteroides de la trucha arcoiris, el efecto de la exposición a atracina, diacínón, endosulfán y mancoceb sobre la concentración efectiva 50 (CE₅₀), inhibiendo la síntesis hormonal en el siguiente orden de manera creciente:

endosulfán, diacínón, mancoceb y atracina; Sin embargo la concentración letal 50 (CL₅₀) fue en el mismo orden: diacínón, endosulfán, mancoceb y atracina.

Sarkar y colaboradores (2000), evaluaron los efectos subcrónicos del quinalfós con dosis subletales (7- 14 mg/kg/día) en ratas macho adultas, en las que determinaron la actividad de la AChE, de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y del metabolismo de las aminas biogénicas (dopamina, noradrenalina y 5- hidroxitriptamina (5-HT)), en el eje HHG. Observaron una reducción en la masa testicular y en la actividad de AChE; y un incremento de los niveles séricos de LH, FSH, prolactina y testosterona; así como una reducción en la actividad de la hipófisis y un incrementó en la actividad de la ACE testicular. En las dosis más altas observaron la alteración en la espermatogénesis, pero no notaron alteraciones en los niveles de dopamina, noradrenalina y 5-HT hipotalámicos, aunque estas dos últimas se elevaron en la hipófisis, efectos que fueron reversibles después de eliminar la exposición.

Estudios en humanos

Son escasos los estudios en humanos que han evaluado la asociación entre la exposición a OC y su efecto sobre el perfil hormonal masculino. Asawasinsopon et al., en 2005, realizaron un estudio transversal en el norte de Tailandia con 97 hombres adultos, en los que evaluaron el efecto de la exposición a DDT y sus metabolitos sobre las hormonas sexuales de los sujetos incluidos. Demostraron una asociación negativa entre los niveles plasmáticos de 17 beta-estradiol (E(2)) y los de p-p'-DDE, y una asociación positiva con los niveles de p,p'-DDE, después de ajustar por edad e índice de masa corporal (IMC).

Como hemos comentado anteriormente, los plaguicidas pueden alterar los niveles de LH y testosterona, afectando la espermatogénesis, inhiben la AChE, y elevan el nivel de acetilcolina en hipófisis e hipotálamo, afectando así la regulación neuroendocrina vía dopamina o 5-HT. Un estudio comparativo entre agricultores orgánicos y tradicionales, que incluía 267 agricultores daneses, no evidenció diferencias significativas en la calidad espermática o en los niveles de

FSH y LH, entre ambos grupos, pero las concentraciones séricas de inhibina B y la razón testosterona/SHBG se incrementaron significativamente en los agricultores tradicionales (Larsen et al., 1998).

En combinación con el andrógeno sintético R1881, otros plaguicidas han mostrado efectos antiandrogénicos; entre ellos la vinclozolina se ha posicionado como uno de los más potentes, mostrando un efecto antagonista. El endosulfán, el dieldrín, se comportaron como antiandrogénicos muy débiles y redujeron del 61 al 78% la respuesta inducida por R1881 a 20 μ M (Anderson et al., 2000). Otros plaguicidas como el p'p'-DDE, procimidona, linurón, metoxicloro y fenitrotión han mostrado tanto *in vitro* (Kelce et al., 1995; Schrader y Cooke 2000; Vinggaard et al., 1999b; Sohoni y Sumpter, 1998; Maness et al., 1998), como *in vivo* (Kelce et al., 1997; Ronis et al., 1995; Lambright et al., 2000; Gray et al., 1999a; Tamura et al., 2001; Andersen et al., 2002), una actividad antiandrogénica.

Se ha evidenciado también que el endosulfán y el dieldrín alteran el metabolismo del estradiol en estudios con enzimas inductoras de la CYP19 (Bradlow et al., 1995; Badawi et al., 2000). Así, Anderson y colaboradores (2002) observaron que el endosulfán induce una débil inhibición de la aromatasa, lo que puede relacionarse a alteraciones en las actividades enzimas de la familia del citocromo P450.

En otro estudio, se evaluó la carga corporal del DDT y DDE, y su asociación con los niveles de hormonas sexuales séricas LH, FSH, 17-estradiol (E(2)), testosterona y la SHBG, en 107 hombres trabajadores de una campaña contra la malaria en Cerdeña (Italia). Los niveles de o,p'-DDT y p,p'-DDE estuvieron por debajo del límite de detección, con un nivel medio de p,p'-DDE sérico, ajustado por lípidos totales, de 396 ppb (rango intercuartil 157-1045). No se observaron asociaciones entre las concentraciones hormonales y los niveles de exposición a p,p'-DDE, ni con la exposición pasada a DDT, probablemente debido a los bajos niveles de p,p'-DDE encontrados (Cocco et al., 2004).

Un estudio transversal en Sudáfrica entre 60 trabajadores del Centro de Control de Malaria en Tzaneen, se evaluó la función sexual, la fertilidad, la historia laboral, mediante la realización de un examen físico y del sistema reproductor, así

como de los parámetros seminales. Se determinaron también los niveles de DDE, DDT y DDD en sangre (Dalvie et al., 2004). Todos estos compuestos de síntesis mostraron pocas asociaciones significativas evaluando la exposición en función de los años de trabajo en el centro-CCM y de los niveles de DDT sérico), con las alteraciones reproductivas. Solamente p,p'-DDT mostró una asociación negativa con el número total de espermatozoides (NTE).

En México, en una población de hombres residentes de una comunidad en donde durante mucho tiempo se aplicó DDT para el control de la malaria, se observó que las concentraciones de p,p'-DDE se correlacionaron positivamente con la concentración de SHBG sérica, y negativamente con la razón testosterona biodisponible/testosterona total (Ayotte et al., 2001). Sin embargo, la concentración de p,p'-DDE se correlacionó negativamente con el volumen de semen y el NTE (Ayotte et al., 2001); lo que fue confirmado después en otro estudio en la misma comunidad (DeJager et al., 2006).

El riesgo de exposición a plaguicidas

La alta diversificación de los patrones de uso en distintas localidades, hace de la exposición a plaguicidas un problema cada vez más complejo, no sólo en explotaciones agrícolas, sino también a nivel global como resultado de la contaminación ambiental y a las rutas biogeoquímicas que siguen desde el lugar de su emisión, hasta su lugar de destino.

A lo expuesto anteriormente, hay que unir la diversificación de los productos emitidos, generada en un intento de no superar los límites de acumulación en las distintas matrices biológicas, establecidos para compuestos específicos por motivos de seguridad, en la población (principalmente la profesionalmente expuesta). El resultado ha sido la exposición de animales, plantas y humanos a cócteles o combinaciones de mezclas cada vez más complejas en cuanto a su composición y concentración.

La exposición puede ocurrir directamente en el lugar de trabajo o a través de productos de consumo, o indirectamente por la contaminación del agua, aire o el suelo. La toxicidad es función no sólo de las características, abundancia, duración y frecuencia de la exposición como decía “El Padre de la Toxicología”, sino también de la complejidad de las mezclas y el riesgo de aditividad o sinergismo de las combinaciones acumuladas, debido a la exposición concurrente y subsecuente a dichos compuestos (Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2008; Kortenkamp et al., 2007).

Los efectos tardíos suponen una mayor complejidad a la hora intentar evidenciar asociaciones causales de exposición y eventos de salud reproductiva de poblaciones humanas, debido a la dificultad para caracterizar la exposición a los plaguicidas utilizados, que casi siempre se presentan junto con la exposición a otros agentes químicos, por lo que se requiere de estudios de seguimiento capaces de caracterizar en detalle las diversas exposiciones, tanto a productos químicos peligrosos, como a otros factores determinantes del estado de salud y enfermedad, tanto de las poblaciones profesionalmente expuestas a plaguicidas, como de la población general.

El paradigma tradicional del desarrollo de la evaluación del riesgo, que busca establecer asociaciones causales para un único agente químico, en base a lo cual se han establecido los límites o estándares de seguridad, respecto a la producción de un evento de salud, cada vez es más cuestionable. Actualmente, la evidencia científica acerca de la presencia de efectos para exposiciones que se encuentran por debajo de los límites umbrales de efecto para varios compuestos químicos en combinación, junto con otros determinantes, pone al descubierto la falta de información y evidencia científica respecto a la exposición de varios agentes xenobióticos en combinación o a cócteles de estos últimos (Ibarluzea et al., 2004; Kortenkamp et al., 2007).

Se hace urgente el desarrollo de una nueva metodología de evaluación del riesgo que tenga en cuenta este nuevo paradigma, por lo que se requiere de un replanteamiento de la metodología tradicional, para contemplar la exposición de cócteles o mezclas complejas, o los múltiples productos en combinación, para

establecer nuevos límites o estándares de seguridad, o identificar los niveles en los que varios compuestos, cuando están presentes todos juntos, no deben superarse, o evitar la exposición a esas combinaciones para prevenir los riesgos de exposición a esos agentes tóxicos.

Además, es necesario monitorizar los niveles permisibles, en diferentes matrices biológicas para determinar la presencia de los compuestos individuales, y reevaluar los niveles de seguridad después del análisis apropiado de las combinaciones presentes de dichos productos, y determinar los componentes de las mezclas complejas, que pueden llegar a representar riesgos o la probabilidad de que se presenten efectos adversos, que hasta hoy no se habían evidenciado, para realizar, a través del desarrollo de este tipo de estudios la evaluación del riesgo de dichos eventos.

Sin lugar a dudas, la demostración de la exposición real constituye el primer paso que cualquier estudio debe plantearse. La confirmación del uso de un plaguicida, su concentración ambiental (agua, alimentos, aire o suelo) y su contenido en tejidos de animales y humanos, son tres factores fundamentales para la caracterización de la exposición.

Es necesaria la cuantificación de factores que pueden interactuar como por ejemplo el contenido total de grasa o lípidos específicos: colesterol, triglicéridos HDL, LDL; y las hormonas del eje reproductivo; así como otras variables potencialmente asociadas como son el nivel socioeconómico, el estilo de vida, el lugar de residencia, e incluso la exposición materna durante la gestación, a factores que se han referido como de riesgo potencial para la fertilidad y especialmente los asociados con la calidad seminal, como el consumo de tabaco y de fármacos en los períodos de riesgo reproductivo, para evaluarlos en conjunto mediante la construcción de modelos predictivos de regresión múltiple, lineal y logística.

Es de gran relevancia también el consumo de dietas con alto contenido de antioxidantes, ya que se ha demostrado que estos también se asocian con la calidad del semen, y aunque aún no se ha demostrado una clara la relación con la dosis (Eskenasi et al., 2005). Así, también es de gran relevancia considerar la

frecuencia de consumo de alimentos y la determinación de algunos micronutrientes, como el zinc, los folatos, y los antioxidantes como las vitaminas C, E y el β -carotenos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La exposición a plaguicidas organoclorados (OC) incrementa el riesgo de alteraciones en los parámetros indicadores de la calidad seminal: número total de espermatozoides (NTE) y número total de espermatozoides móviles (NTEM), debido a su capacidad de modificar la homeostasis de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas masculino (HHGm), en varones en edad fértil. El riesgo es mayor con la exposición combinada a varios plaguicidas OC, aún cuando esta se produzca a bajas concentraciones, y es dependiente de variables socioeconómicas, de estilo de vida, historia de consumo de alimentos y medicamentos, zona de residencia, ocupación, entre otras; teniendo en cuenta, además, otros factores de confusión, covariables y modificadores de efecto potenciales.

2.2 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la asociación entre los parámetros NTE y NTEM, estimados en muestras de semen, y la exposición a mezclas complejas de plaguicidas OC, teniendo en cuenta los niveles séricos de hormonas sexuales y otros determinantes socioeconómicos y de estilo de vida, como confusores y covariables potencialmente asociados.

Objetivos específicos

1. Cuantificar mediante técnicas cromatográficas los plaguicidas OC en sangre de la población de estudio.
2. Determinar los niveles de las hormonas: inhibina B, FSH, LH, SHBG y testosterona en sangre de la población de estudio.

3. Evaluar la asociación entre las concentraciones de OC y el perfil hormonal y los valores de NTE y NTEM.
4. Evaluar el efecto de la exposición a mezclas de plaguicidas OC sobre el perfil hormonal.
5. Evaluar la modificación del efecto debido a la interacción entre el colesterol, los triglicéridos y los HDL y LDL, sobre el perfil hormonal y sobre la calidad seminal.
6. Evaluar los principales determinantes controlando por posibles factores de confusión, covariables y otros modificadores de efecto potencialmente asociados a la calidad seminal, en particular a NTE y NTEM.
7. Construir modelos predictivos basados en regresión múltiple, lineal y logística, para ambas variables.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1 Diseño

Con objeto de responder a los objetivos planteados se ha realizado un estudio epidemiológico transversal. Se trata de un diseño observacional individual en el que se relacionan un grupo de variables formado por el seminograma, el examen físico, la medida sérica de las hormonas y la frecuencia de presentación y los niveles de 18 plaguicidas presentes en la sangre de los individuos participantes, con otro grupo de variables formado por las características sociodemográficas, de dieta, salud y hábitos de vida de los sujetos incluidos. El estudio se realizó entre octubre del 2002 y diciembre del 2003.

Todos los sujetos contactados fueron informados de los objetivos de la investigación propuesta y dieron su consentimiento para participar en el proyecto, firmando la hoja de consentimiento y participación de acuerdo con los requerimientos del Comité Ético del Hospital Universitario San Cecilio. La confidencialidad de los datos se ha mantenido en todo momento, separando la información recogida de los datos de filiación de los participantes.

3.1.2 Población de estudio

La población de estudio la constituyeron un total de 380 jóvenes de la provincia de Almería que fueron informados sobre los objetivos de estudio y accedieron a participar dando su nombre y teléfono para concertar posteriormente una cita. El índice de participación del estudio fue de 73,7%.

Una parte de la población potencialmente elegible no pudo finalmente incluirse en la muestra final, para todas o algunas de las variables del estudio, por las razones siguientes:

1. No acudir a la cita una vez establecida, bien por rechazo a participar en el estudio o por imposibilidad de acudir en el día señalado (25%).

2. No disponibilidad de alguna de las fuentes de información (muestras biológicas, encuesta epidemiológica, examen físico): 19 sujetos (5,0%).
3. Pérdida de las muestras biológicas: por fallos puntuales en el proceso de transporte, identificación, almacenamiento y procesamiento las muestras biológicas obtenidas, que no pudieron ser finalmente procesadas (1,8%).
4. No seguir el protocolo propuesto para la recogida, transporte y almacenamiento de las muestras de semen: 0,5% de los sujetos.
5. No cumplir con alguno de los requisitos de inclusión: 1,4% de los participantes.

Finalmente, el tamaño muestral de este trabajo ha sido de 280 varones (73,7% de participación). De estos, 261 jóvenes (68,68% de la población) realizaron la encuesta epidemiológica en forma correcta. 273 entregaron correctamente una muestra de semen. 224 participantes (58,95% de la población) rellenaron la encuesta epidemiológica, siguieron el protocolo propuesto para la recogida de muestras de semen, se les realizó el examen físico, se dispuso de ambas muestras biológicas (sangre y semen) y se completaron los resultados del análisis químico y seminal. A 253 muestras de sangre se les realizó el estudio hormonal. De estas, a 148 muestras les fue posible la realización del análisis de lípidos. Y a 115 muestras de semen se les realizó el estudio de la morfología espermática. Por último de los 280 participantes, 146 mostraron interés en recoger el informe del seminograma (52%), por lo que se le entregó tal información.

Criterios de inclusión:

La población elegible en el estudio planteado consistía en varones jóvenes, nacidos en la provincia de Almería, de edades comprendidas entre los 18 y 23 años, que consientan participar en el estudio una vez informados, de forma oral y escrita, de los objetivos del mismo y de los requisitos a seguir para su realización, entre los cuales se incluían guardar un periodo de abstinencia sexual de entre 2 a

7 días. Todos los participantes debían desconocer su capacidad reproductiva. Los criterios de inclusión fueron, por tanto:

i) firmar la carta de consentimiento informado, después de que se les explicaron los objetivos generales del estudio y se les dio garantía de seguridad para la toma de muestras biológicas, así como del anonimato y de la posibilidad de abandonar el estudio en el momento que así lo decidieran; ii) tener una edad, entre 18 y 23 años; y iii) vivir en la provincia de Almería en el momento del reclutamiento;

Criterios de exclusión:

Los criterios de exclusión fueron: i) no firmar la carta de consentimiento informado; ii) haber sido diagnosticados con infertilidad o cualquier problema de salud relacionado claramente con ella; iii) padecer algún problema en el sistema endocrino o estar sometidos a algún tratamiento hormonal.

Instrumentos de recolección de información:

Para la realización del estudio se ha contado con las siguientes fuentes de información, obtenidas durante la visita al centro de reclutamiento: a) cuestionario epidemiológico, donde se recogía información sobre características sociodemográficas, de salud, estilo de vida, condiciones de trabajo y antecedentes familiares. La encuesta fue llevada a cabo por un único entrevistador entrenado específicamente para el proyecto; b) examen físico; c) muestra de sangre para el análisis químico de un grupo seleccionado de plaguicidas organoclorados, clasificados como xenoestrógenos, así como el análisis de hormonas endógenas; y d) muestra de semen para la determinación de los parámetros que establecen su calidad.

La recogida de datos sobre los factores demográficos y de exposición de cada participante se realizó mediante un cuestionario diseñado *ad hoc* y llevada a cabo por un encuestador adiestrado. A cada cuestionario se le asignó un código de identificación que era idéntico para todas las muestras biológicas (sangre y semen) del individuo.

Una vez informados del estudio, a los participantes les fue entregado el cuestionario epidemiológico para rellenarlo en su casa, a ser posible con la colaboración de sus padres. El cuestionario incluía información acerca de la edad, historial de fertilidad, salud general, enfermedades previas y crónicas, operaciones y golpes en áreas genitales que acusaran hinchazón o hematoma en el escroto, medicación durante los últimos 3 meses, datos sobre su embarazo y nacimiento, residencia familiar y tiempo viviendo en ella, hábitos y estilo de vida, condiciones de trabajo y exposición a productos tóxicos.

El día de la cita para la realización de las pruebas, los voluntarios entregaban el cuestionario, que era revisado por el encuestador. La entrevista personal realizada mediante la encuesta estaba estructurada en varias secciones:

Hoja de no respuesta:

Se recogió también información, en el caso de que el sujeto decidiera no participar, sobre el motivo de su decisión. La hoja de no respuesta recogía también las variables de identificación y municipio de residencia del individuo.

Cuestionario general de exposición previa potencial:

Se recogió información sobre la salud general de sujeto, su infancia y el periodo del embarazo de su madre cuando lo gestó, así como fecha y lugar de su nacimiento. Se recogió información sobre posibles exposiciones durante estos períodos críticos de la vida del individuo, con especial énfasis en la exposición a contaminantes ambientales.

Se les solicitó que esta sección la completaran en colaboración de los padres, y principalmente de sus madres, ya que en ella se preguntaban datos relacionados con el nacimiento (como peso y talla al nacer), semanas de gestación, residencia de los progenitores, ocupación y hábito tabáquico de los mismos, durante el embarazo.

Estado de salud:

Se recogieron también datos sobre estado de salud en relación al aparato reproductor. Así se realizaron algunas preguntas para conocer posibles tratamientos médico-quirúrgicos realizados en la zona genitourinaria, existencia de complicaciones tales como criptorquidia, hernia inguinal, varicocele, epididimitis, gonorrea, o clamidia; e información general de vida sexual.

Condiciones socioeconómicas, estilo de vida y ocupación:

En esta sección se recogió información sobre lugar de residencia (rural / urbana), nivel de escolaridad, trabajo y características de ocupación (tipo de trabajo, horario, duración, postura), consumo de tabaco, alcohol, sustancias estupefacientes y psicotrópicos, incluyendo edad del comienzo y cantidades diarias/semanales de consumo.

Historial reproductiva:

Se les consultó sobre si el joven había tenido hijos o si había tenido relaciones sexuales resultantes en un embarazo, así como si se presentó alguna complicación para llevarlo a término.

3.2 Exploración andrológica

Todos los participantes se realizaron una exploración física, que fue realizada por un único especialista. Esta exploración urológica recogió información principalmente de la zona genitourinaria, específicamente: vello púbico (índice de Tanner), desarrollo del pene y los testículos (disposición, tamaño y consistencia de estos últimos); el volumen o tamaño testicular se estimó con la ayuda de un orquidómetro Prader de madera (Pharmacia & Upjohn, Denmark).

Se exploró la anatomía genital y la presencia de alteraciones como el varicocele en sus distintos grados, la presencia de criptorquidias e hipospadias, presencia al tacto de: conductos deferentes, quistes a nivel del epidídimo, hidrocele, o alguna tumoración. Se les consultó sobre el historial médico-quirúrgico.

Se midió la longitud de los dedos de la mano derecha, para estimar el cociente 2:4 (índice: anular), dibujando el contorno de la mano sobre papel milimétrico.

Brevemente, se recogió información específica sobre:

- Altura (cm.).
- Peso (Kg).
- IMC: Índice de masa corporal (Kg/cm^2)
- Presencia o ausencia de cicatrices quirúrgicas en el área genital.
- Vello púbico: Estadios de Tanner.
- Anomalías en el pene (normal/anormal).
- Disposición de los testículos derecho e izquierdo: alto en el escroto, bajo en el escroto, en el canal inguinal, o no palpable.
- Tamaño de los testículos derecho e izquierdo. (Medidos con un orquidómetro Prader de madera suministrado por Dinamarca a todos los grupos participantes).
- Consistencia de los testículos derecho e izquierdo: normal, dura o blanda.
- Presencia o ausencia de tumoración en los testículos derecho e izquierdo.

- Epidídimo derecho e izquierdo (normal/anormal).
- Presencia o ausencia de los vasos deferentes derecho e izquierdo por palpación (palpable/no palpable).
- Presencia o ausencia de varicocele derecho o izquierdo en sus diferentes grados: Ausencia de varicocele, detectable sólo por maniobra de Valsalva, palpable sin procedimiento de Valsalva, o visible.
- Presencia o ausencia de hidrocele en testículo derecho e izquierdo.

Las mediciones de la estatura, peso, disposición testicular, y la presencia de alguna anomalía, *por ejemplo*, varicocele e hidrocele, se realizaron con el individuo en pie y en un sitio adecuado para tal efecto.

Para la exploración se utilizó el siguiente material: guantes de látex; calibrador tipo “pie de rey”; un orquidómetro de Prader de madera (Pharmacia & Upjohn, Denmark®); papel milimétrico, y una regla también milimetrada.

3.3 Análisis de las muestras de semen: Recogida, entrega y preparación de las muestras para su análisis

Los participantes proporcionaron una muestra de semen que obtuvieron por masturbación, tras un periodo de abstinencia recomendado y comprendido entre 48 y 168 horas, la muestra fue recogida en un frasco estéril de boca ancha previamente analizado para asegurar su inocuidad para los espermatozoides. La forma de recogida de la muestra fue previamente explicada a todos los participantes y se les entregó el frasco de recogida. Todos los frascos fueron previamente identificados y pesados para el cálculo del volumen eyaculado por pesada de la muestra.

A la hora de la recepción las muestras se recogieron datos de interés para el análisis: problemas en la hora de la recogida, integridad de la muestra, posibles pérdidas o contaminaciones, tiempo transcurrido entre la eyaculación y la entrega, y tiempo de abstinencia en horas.

A los voluntarios con residencia cercana al laboratorio se les permitió obtener la muestra de semen en casa, siempre y cuando esta fuera entregada al laboratorio en un plazo no superior a media hora, tiempo durante el cual la muestra no sufriera cambios de temperatura ni fuera expuesta a la luz. Para aquéllos que no pudieran cumplir estos criterios, se adaptó un lugar adecuado para la obtención de las muestras junto al laboratorio.

El proceso de realización del seminograma se realizó siguiendo los criterios estrictos recomendados por la OMS, de acuerdo a la última edición del manual para el examen de semen (WHO, 1999). Todas las muestras de semen fueron analizadas por un solo técnico especialmente entrenado para este fin, el cual además fue sometido a un control de calidad riguroso coordinado por el grupo del “Rigshospitalet” en Dinamarca para evitar los posibles sesgos intra e inter-observador.

Una vez recibidas las muestras, eran depositadas en una bandeja térmica y temperada a 37 °C durante un periodo de 15-30 minutos hasta completar el proceso de licuación. Durante ese tiempo, las muestras eran homogeneizadas por un movimiento rotatorio sin llegar a ser agitadas. Una vez transcurrido el tiempo necesario para completar la licuación de las muestras se procedió a su análisis siguiendo el protocolo indicado.

3.4 Parámetros seminales analizados

Licuación

La licuefacción fue alcanzada durante un periodo comprendido entre los 15 y 30 minutos después de la eyaculación, antes de realizar el análisis. En los casos en que las muestras no alcanzaron la licuefacción completa en ese periodo de tiempo, se dejaron hasta 60 minutos antes de la realización del proceso analítico. Los resultados de la licuefacción se codificaron como “completa” o “incompleta”.

Aspecto

El aspecto de la muestra se registró durante el periodo de licuefacción y antes de los 60 minutos después de la eyaculación. En caso de que las muestras presentaran un color fuera del rango de los grises opalescentes, fue registrado en el apartado de observaciones de la hoja de datos.

Volumen

El volumen de semen eyaculado fue medido por pesada. Los frascos de recogida fueron pesados antes y después de la eyaculación, asumiendo que un gramo equivale a un mililitro de semen, con un error de pesada de 0,01 g (lo que equivale a 10 μ l).

Viscosidad

La viscosidad o filancia de las muestras fue medida con una pipeta. En los casos en los que la muestra caía de la pipeta formando gotas o un filamento de menos de 2 cm, la viscosidad registrada fue cero. Si formaban un filamento de 2 a 5 cm, se registró una viscosidad de 1. Un valor de 2 si el filamento medía entre 5 y 10 cm, y 3 para las muestras con alta viscosidad, filamentos superiores a 10 cm.

Acidez (pH)

El potencial de hidrógeno, potencial ácido/básico o pH de las muestras fue medido al iniciar el análisis antes de transcurridos 60 minutos después de la eyaculación. La medida del pH se realizó usando papel indicador universal con rango entre 6,4 y 8 (Merck).

Concentración espermática

La medición de la concentración se estimó colocando una gota de 10 μ l sobre un portaobjetos, bajo un cubreobjetos de 22x22 mm, y se observó con un microscopio de contraste de fases a 400x. Se contó el número de espermatozoides encontrados por campo con ese aumento, se realizó una dilución en un medio fijador siguiendo el protocolo propuesto en el manual para el examen de semen de la OMS de acuerdo a la Tabla 1:

Tabla 1. Determinación de la concentración espermática

Espermatozoides por campo de 400x	Dilución
<15	1:5
15-40	1:10
40-200	1:20
>200	1:50

Las diluciones se realizaron por duplicado en un medio fijador aldehído fórmico (HCOH) y bicarbonato sódico (NaHCO₃) (50 g de bicarbonato sódico y 10 ml de formalina al 35% para completar a un litro con agua destilada). Tras ser homogenizadas y fijadas las dos diluciones, se procedió a su recuento, empleando un hemocitómetro de Neubauer mejorado.

El conteo se realizó por duplicado contando como mínimo 200 espermatozoides en cada uno para minimizar al máximo el error sistemático. Para verificar los recuentos se realizó un análisis de correlación de Pearson igual o mayor de 0,95, para evaluar las diferencias entre los dos recuentos empleando la gráfica que incluye el manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano (WHO, 1999) en el apéndice XXII. Diferencias mayores a las esperadas del 95% en las muestras hubieran sido indicativas de errores sistemáticos en el proceso atribuibles a error en la dilución, error en el recuento o bien en una homogenización incorrecta de la muestra de semen.

Una vez verificada la medición correcta de ambos recuentos, se calculó la media de ambas y el resultado se expresó en millones de espermatozoides por mililitro de muestra.

Número total de espermatozoides (NTE)

El número total de espermatozoides en el eyaculado se estimó mediante el producto del volumen de la muestra por la concentración obtenida, y se expresó en millones de espermatozoides en eyaculado.

Elementos celulares diferentes de los espermatozoides

El número de células redondas por mililitro de eyaculado se realizó al mismo tiempo y en la misma forma que el recuento espermático mediante el hemocitómetro de Neubauer mejorado.

Movilidad espermática

Para cuantificar la movilidad espermática se colocó una gota de 10 μL de semen sobre un portaobjetos temperado a 37 °C y sobre ella se depositó cuidadosamente un cubreobjetos de 22x22 mm. Tras dejar estabilizar la preparación durante unos 30-60 segundos aproximadamente se procedió a evaluar la movilidad de los espermatozoides bajo contraste de fases a 400x en un microscopio (Olympus BX50) dotado de pletina térmica a 37 °C. Se contaron varios campos hasta visualizar 200 espermatozoides en cada preparación (con el fin de que el error del recuento sea aceptablemente bajo), identificando las diferentes categorías de movilidad establecidas por la OMS a 37 °C:

- espermatozoides tipo “a” (movimiento progresivo $>25\mu\text{m}/\text{seg.}$),
- espermatozoides tipo “b” (movimiento progresivo $5-25\mu\text{m}/\text{seg.}$),
- espermatozoides tipo “c” (movimiento no progresivo $< 5\mu\text{m}/\text{seg.}$), y

- espermatozoides tipo “d” (inmóviles).

Durante el proceso de recuento de formas móviles se evitó contar los espermatozoides en los campos cercanos a los bordes del cubreobjetos así como aquéllos que se encontraban próximos a alguna burbuja formada al cubrir la preparación. Los recuentos de movilidad en las dos preparaciones de la misma muestra de semen fueron comparados según aconseja la OMS en el apéndice XXII de su manual de laboratorio para el examen del semen humano.

En el caso de encontrar diferencias superiores al 5%, se asumió que hubo un error de recuento, de homogenización o distribución no uniforme de los espermatozoides en el portaobjetos, por lo que hubo que repetir todo el proceso. Durante el estudio de la movilidad se grabaron secuencias de video de todas las preparaciones con el fin de tener la posibilidad de poder usarlas posteriormente para otros estudios comparativos.

Morfología espermática

Se realizaron cuatro frotis en portaobjetos identificados con el código de la muestra, las extensiones se realizaron a partir de 4 μ L de semen cada una y se dejaron secar durante una noche, al día siguiente se fijaron en etanol al 96% durante 60 minutos, y posteriormente dos extensiones de cada muestra de semen fueron enviadas a Finlandia para ser analizadas por un único observador común para todos los grupos de investigación y evitar la variabilidad entre observadores (sesgo ínter-observador), que suele ser bastante importante en estudios sobre la morfología espermática; las otras dos extensiones fueron guardadas para posteriores estudios.

Para el estudio de la morfología espermática se aplicó el protocolo de la OMS (WHO, 1999) y se siguieron los criterios estrictos de Kruger, los cuales en su clasificación requieren que todas los espermatozoides con defectos mínimos o “borderline” sean considerados como formas anormales.

Se observó la presencia de alguna o más anomalías en la cabeza, la pieza intermedia o cuello, y el flagelo (Franken et al., 2000). En el caso de observar

alguna anomalía se consideró al espermatozoide como anormal y se anotó la región o regiones en la(s) que se observó (aron) la(s) alteración(es):

- Cabeza (PCA): Debe haber sólo una y su forma normal ha de ser la de un óvalo regular, con un contorno liso y un acrosoma bien definido que ocupe el 40-70% del área, su tamaño ha de ser de 5-6 μm de largo por 2,5-3,5 de ancho en el caso de una tinción con panóptico rápido. Cualquier cabeza que no se adaptase a esta descripción se consideró anómala. Las anomalías de la cabeza se definieron como cualquier factor que llevara a que ésta no tuviera una forma normal; podemos encontrar que puede ser grande, pequeña, redonda, alargada, achatada, acintada, piriforme, amorfa, vacuolada (>2 vacuolas pequeñas, alguna vacuola grande o alguna situada en la región postacrosómica), con área del acrosoma pequeña (<40% del área de la cabeza), cabezas dobles y todas las combinaciones de estos defectos.

- Pieza intermedia o cuello (PIA): La pieza intermedia debe ser delgada (<1 μm de grosor), tener una longitud aproximada entre 1,5 del diámetro mayor de la cabeza, con una inserción perpendicular al eje menor de la cabeza y bien centrada. Si la pieza intermedia no se acoplaba a esta descripción, el espermatozoide se consideró anormal. Entre las anomalías de la pieza intermedia se pueden citar: cuello doblado, (cuello y cabeza forman un ángulo >90° con el eje longitudinal de la cabeza), inserción asimétrica de la pieza media en la cabeza, pieza media gruesa o irregular, pieza intermedia anormalmente fina, y toda combinación de estos.

- Flagelos (PFA): El flagelo debe estar relativamente derecho, ser uniforme y más fino que la pieza intermedia, desenrollado y aproximadamente de 45 μm de longitud. Entre los defectos del flagelo podemos observar flagelos cortos, múltiples, en horquilla, rotos, doblados (>90°), de espesor irregular, enrollados y cualquier combinación de estos defectos.

- Restos citoplasmáticos (PRC): Si el espermatozoide presentaba restos citoplasmáticos, generalmente a nivel de la pieza intermedia, estos no debían de superar 1/3 del área de la cabeza.

Sólo se contaron células reconocibles como espermatozoides, no teniendo en cuenta las células inmaduras o las cabezas sin cola. Si se encontraba alguna anomalía, ese espermatozoide era considerado como anormal, y se anotaba la región en la que se presentaba la anormalidad.

La tinción de las muestras se realizó con el método del panóptico rápido (eosina/tiacina). En esta técnica se usa como fijador 1,8 mg/l de triarilmetano en metanol. El tiempo de fijación ha de ser de 5 segundos como mínimo y la extensión ha de estar bien seca antes de la fijación.

Seguidamente se sumerge la extensión en una solución de eosina en un amortiguador preservado durante 5 segundos y seguidamente, tras escurrir el exceso de colorante, se sumerge la muestra en una segunda solución de tiacina en las solución amortiguadora durante 5 segundos y se enjuaga ligeramente con agua destilada, antes de realizar la evaluación de la morfología hay que dejar secar bien la extensión.

Al igual que con el resto de mediciones, todas las muestras que se usaron en el estudio de la morfología espermática fueron fijadas y teñidas por un único técnico; y estudiadas por un único observador entrenado, con el fin de evitar el sesgo inter-observador.

Las muestras ya teñidas se estudiaron con un microscopio convencional con objetivo de inmersión a 1000x y ocular provisto de regleta graduada (Olympus BX50) Se estudiaron un total de 200 espermatozoides por muestra y se anotó el número de espermatozoides que no presentaban anomalías (espermatozoides normales) y el de aquellos en los que se observaba una o más anomalías (anormales). Por otra parte se anotó el número de las anomalías observadas (por zonas en las que aparecían). De este modo se obtuvo el porcentaje de formas normales, de formas anormales, los tantos por ciento de anomalías en cabeza, pieza intermedia, flagelo, restos citoplasmáticos y el índice de teratozoospermia (número total de alteraciones encontradas dividido por el número de espermatozoides anormales).

Los criterios más utilizados para la evaluación de la morfología espermática son los propuestos por Kruger en cuanto al buen o mal pronóstico de fecundación

in vitro. Según este criterio encontramos un grupo con mal pronóstico (0-4% de formas normales), un grupo de buen pronóstico (5-14% de formas normales) y un tercer grupo modelo con un porcentaje de formas normales superior al 14%, el cual es el valor de referencia del 14% para las formas normales. Es de esperar que un individuo con un porcentaje de formas normales inferior al 5% probablemente vea comprometidas sus posibilidades de conseguir un embarazo de forma natural) (Kruger et al., 2004).

Tiempo de abstinencia

En el momento de la entrega de la muestra de semen se anotó la fecha y hora de la última eyaculación. De este modo se calculó la duración de la abstinencia en horas.

Tiempo entre la eyaculación y el comienzo del análisis

En el momento de la entrega de la muestra de semen se anotó la hora de recogida de la muestra y al iniciar el análisis se procedía a anotar la hora de inicio. De este modo se calculó el tiempo transcurrido entre la recogida de la muestra y la realización del análisis, expresándose en minutos.

Material de laboratorio

Los materiales empleados para realizar los seminogramas fueron:

- 1) Botes estériles de boca ancha y cierre de rosca de 100 ml;
- 2) Pipetas Pasteur;
- 3) Portaobjetos con borde esmerilado para la preparación de extensiones;
- 4) Cubreobjetos de 22x22 mm;
- 5) Papel indicador de pH;
- 6) Viales Eppendorf de 2 ml;

- 7) Solución fijadora;
- 8) Etanol 96%;
- 9) Micropipeta (BIOHIT proline®) rango 5-50µl;
- 10) Puntas desechables para micro pipeta;
- 11) Microscopio (Olympus® BX-50) con contraste de fases;
- 12) Pletina (Tokay) y bandeja térmica (Labotec ®);
- 13) Balanza de precisión (AND ® EK200G).

Control de calidad

El grupo de trabajo español, al igual que los otros grupos de los países participantes en el proyecto europeo “Environment and Reproductive Health”, se sometió a un control de calidad externo (para la evaluación de la concentración espermática), coordinado por el Departamento de Reproducción del Rigshospitalet de Copenhague, en Dinamarca, para controlar la variabilidad inter-observador en el proceso de análisis del semen.

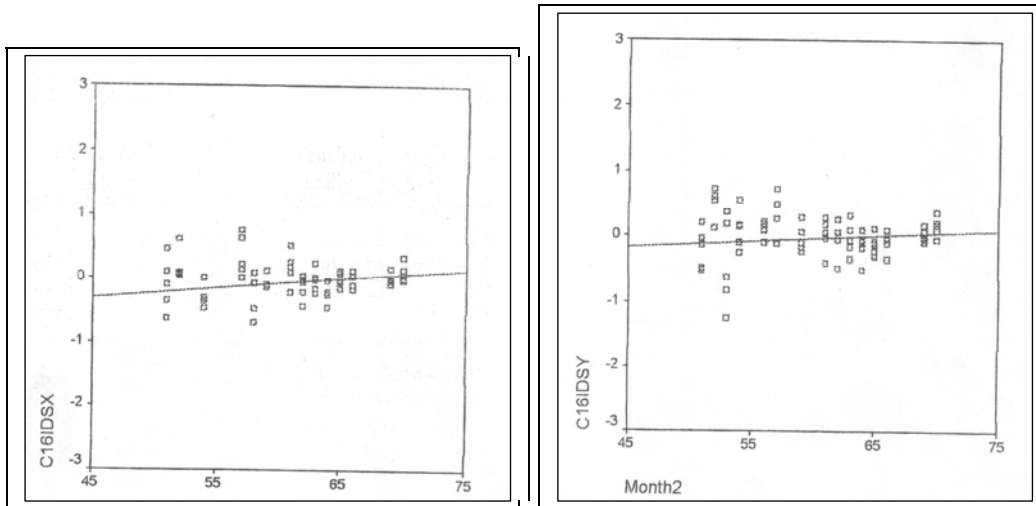
Mensualmente durante el año que duró el estudio de las muestras de semen, se recibieron desde el Hospital Universitario de Copenhague (Dinamarca) cinco viales con 0,5 ml de semen fijado con azida sódica para la evaluación de la concentración espermática. Una vez recibidas, las muestras fueron evaluadas (en un intervalo máximo de dos a cinco días tras la recepción de las muestras) por el observador que realizaba la analítica del semen de los participantes en el estudio.

El tiempo transcurrido entre el envío y la realización de los recuentos fue aproximadamente de una a dos semanas. Antes de realizar los recuentos, las muestras fueron homogenizadas mediante el uso de un vórtex durante ocho segundos. Los resultados eran anotados en una plantilla y enviados de nuevo a Dinamarca para su análisis, indicando los valores de concentración, la presencia de aglutinaciones y la existencia de cabezas y colas sueltas (sólo se deben contar espermatozoides enteros).

Los resultados obtenidos en cada centro eran comparados con los obtenidos en el centro de referencia, que en nuestro caso arrojó los resultados siguientes. La concentración espermática media, estimada en los 16 controles de calidad realizados por nuestro grupo y, comparada con el centro de referencia (Dinamarca) resultó ser del 96%, un 4% menor que el laboratorio de referencia, con un intervalo de confianza de 95% de (87%-106%).

En las gráficas siguientes se puede apreciar un ligero aumento a lo largo del tiempo que no fue estadísticamente significativo ($p=0,2$).

Figura I. Concentración espermática (IC 95%): 96% (87-106)%



Entrega de informes

Se citaron los voluntarios que pidieron un informe de los resultados, una semana después de la realización de los seminogramas y la exploración física. Sólo el 52% de los participantes asistieron a recogerlos. En ese informe se describieron los parámetros indicadores de la calidad seminal, así como las observaciones de interés para el joven realizadas por el urólogo.

Los informes fueron entregados personal y confidencialmente a los interesados y se les explicaron detalladamente. A los jóvenes que presentaban parámetros seminales por debajo de los valores de referencia de OMS, se recomendó se hicieran un segundo seminograma, para lo que hubo una participación baja (60%). Aquéllos que mostraron alguna patología (Azoospermia, oligospermia severa, presencia de quistes) se les remitió al especialista.

3.5 Muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción cubital, por personal profesional entrenado para la extracción de muestras biológicas. Se recogieron de 15-20 ml de sangre, para asegurar un volumen de suero suficiente para realizar las pruebas de química analíticas propuestas en el protocolo del estudio.

Después de recoger las muestras de sangre, se centrifugaron y se obtuvo el suero que fue en seguida trasvasado a viales de congelación debidamente codificados y mantenidos a -70°C hasta su análisis. El volumen de suero obtenido luego de la centrifugación fue de alrededor de 8 ml. Las muestras de suero fueron separadas en tres viales, uno para el análisis de los 18 COP, realizado en el Laboratorio de Investigaciones Médicas de la Universidad de Granada; el segundo vial se envió al Hospital Universitario de Copenhague (Rigshospitalet), en Dinamarca, para el estudio hormonal, y el tercer vial se destinó al estudio de los lípidos totales en suero realizado en el Hospital de Poniente de Almería.

Los materiales utilizados en las extracciones de sangre fueron: jeringas estériles de 20 ml; gasas y agujas estériles para la extracción de sangre; tubos

para la extracción y centrifugado de las muestras de sangre; una centrífuga Nahita®; tubos para la congelación de las alícuotas de suero. Los tubos fueron analizados previamente para determinar su contenido de ftalatos, y fueron enviados desde Copenhague a todos los grupos participantes.

3.5.1 Análisis hormonal

Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención del suero que posteriormente fue trasvasado a viales de congelación codificados y mantenidos a -70 °C hasta su análisis. Todas las muestras se enviaron al Departamento de “Growth and Reproduction” del Rigshospitalet en Copenhague (Dinamarca) donde se centralizó la determinación de los niveles hormonales en sangre.

Las hormonas FSH, LH, testosterona y SHBG se determinaron mediante inmunofluorescencia (Delfia, Wallac, Turku, Finlandia). La inhibina B por ELISA (Serotec, UK). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 3 y 4,5%, para FSH y LH, respectivamente. Para la testosterona y la SHBG fueron del 8 y el 5%. Finalmente, para estradiol e inhibina B entre el 7,5-13% y entre 15-18%, respectivamente.

3.5.2 Determinación de residuos de plaguicidas en suero

El método más utilizado para el análisis de xenobióticos lipofílicos en suero humano es la extracción líquido-líquido, que separa en función de su polaridad los plaguicidas organoclorados presentes en las muestras de suero. Para la extracción se utilizó una mezcla de disolventes compuesta por éter-etílico y hexano. En la técnica se distinguen dos etapas. La primera consiste en la extracción propiamente dicha de los compuestos liposolubles en la que se obtiene un extracto todavía demasiado grosero. En la etapa siguiente se purifica este extracto (Moreno Frías et al., 2001).

El método de extracción utilizado fue el siguiente

1. Se tomaron 4 ml de la muestra de suero humano y se colocó en un tubo de ensayo con tapón de teflón.
2. Se añadieron 2 ml de metanol, para precipitar las proteínas, se agitó y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm.
3. Al sobrenadante, se añadieron 5 ml de éter etílico-hexano 1:1 (v:v) y se agitó con fuerza. La operación de extracción se repitió tres veces.
4. Se separaron las fases orgánicas reduciendo a 2 ó 3 ml en corriente de nitrógeno.
5. Al residuo obtenido se le añadió 0,5 ml de H₂SO₄ de alta pureza. Se agitó fuertemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm separando la fase orgánica.
6. La fase acuosa se extrajo dos veces más con 1 ml de hexano.
7. Se tomaron las fases orgánicas y se desecaron en corriente de nitrógeno.

Purificación de las muestras de suero mediante Sep-Pak

La purificación se realizó mediante cromatografía en columna utilizando cartuchos sep-pack (Waters®) rellenos de sílice. El extracto orgánico obtenido se redisolvió en 5 ml de hexano, se pasó por los cartuchos y se eluyó primero con 10 ml de hexano y luego con 10 ml de la mezcla constituida por hexano:metanol:isopropanol en proporción 45:40:15. Una vez eluido todo el disolvente, se redujo hasta sequedad en corriente de nitrógeno. De esta forma se obtuvo un residuo, que contenía los plaguicidas organoclorados contaminantes del suero ya preparado para ser analizado por GC/DCE.

Con la fase móvil constituida por la mezcla anteriormente dicha se obtuvieron unas recuperaciones mucho mayores para algunos compuestos (por ejemplo endosulfán) que cuando se eluyó sólo con hexano, mientras que otros organoclorados se mantuvieron en porcentajes de recuperación próximos al 90% utilizando como eluyente hexano (Crespo, 2001). Las recuperaciones obtenidas,

para los isómeros del endosulfán y sus metabolitos, con la mezcla (hexano:metanol:isopropanol) y sólo con hexano se representan en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de recuperación para isómeros del endosulfán

Plaguicida	Recuperación (%)	
	Hexano	Hexano:metano:isopropanol
Endosulfán-I	36,51	93,30
Endosulfán-II	7,24	85,15
Endosulfán-éter	15,15	81,98
Endosulfán-lactona	86,45	88,71
Endosulfán-diol	78,92	65,36
Endosulfán-sulfato	4,80	93,20

Cuantificación mediante Cromatografía de Gases con Detector por Captura de Electrones (CG/DCE)

El método utilizado para determinar los plaguicidas OC fue la cromatografía de gases con detector por captura de electrones (DCE), ya que las moléculas de los plaguicidas OC contienen en su estructura átomos de cloro que responden muy bien a dicho detector.

Las condiciones de trabajo fueron: Cromatógrafo de gases Varian-3350 (EEUU) con detector por captura de electrones (^{63}Ni) a una temperatura (T) de 300 °C; sistema Millennium Chromatography Manager como software; inyector a una T de 250 °C; Nitrógeno como gas portador a un flujo de 40 ml/min; volumen de inyección de 1 μl ; programa de T: inicial 130 °C (1 min); rampa de 20 °C/min hasta 150 °C, rampa de 10 °C/min hasta 200 °C, y rampa de 20 °C/min hasta 260 °C (20 min).

Para hacer la cuantificación en el análisis cromatográfico se siguió el método del patrón interno. Para ello, se seleccionó un compuesto químico cuyas características analíticas permitieran un comportamiento similar al de las moléculas a analizar, con un tiempo de retención situado en el punto intermedio del cromatograma realizado con las sustancias problema, con una elevada calidad analítica y un grado de pureza superior a 99%.

La reproducibilidad para el patrón interno *p,p'*-diclorobenzofenona (DCBF) fue muy buena y la curva de calibrado ($y = 3 \times 10^6 x + 3 \times 10^6$) tuvo un ajuste $r^2 = 0,992$. La disolución patrón se preparó a una concentración de 10 µg/ml en hexano y el tiempo de retención medio fue de $10,062 \pm 0,0226$ min.

Los tiempos de retención medios, partiendo de disoluciones del orden de 0,01 (µg/ml), se determinaron para cada uno de los compuestos a estudiar de acuerdo con los métodos propuestos por nuestro grupo de investigación. Para efectuar las curvas de calibrado y el cálculo del factor de respuesta, se utilizó la técnica del patrón interno de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Los valores del ajuste lineal de los datos experimentales pusieron de manifiesto la precisión del método desarrollado.

Las siguientes tablas muestran la media de los tiempos de retención (TR) de los 18 plaguicidas OC analizados, junto con los correspondientes parámetros que definen las curvas de calibrado, coeficientes de correlación (r^2) y límite de detección de los plaguicidas organoclorados en cromatografía de gases.

Con el fin de definir la reproducibilidad del método cromatográfico propuesto, se procesaron muestras de suero en las condiciones antes descritas, de forma repetida, efectuándose diez medidas de cada muestra y calculándose las concentraciones medias y otros parámetros representativos de la reproducibilidad del método cromatográfico.

Con objeto de fijar una base para obtener uniformidad en la adquisición y evaluación de datos analíticos en la determinación de contaminantes ambientales, hay que definir claramente dos conceptos analíticos diferenciados, denominados límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección se define como un número (expresado en unidades de concentración) que describe la concentración menor de un elemento que se puede medir analíticamente. El límite de cuantificación debe establecerse según un criterio estricto, y se sitúa en la región de cuantificación claramente por encima del límite de detección. Así el límite de cuantificación es equivalente al doble de la magnitud de límite de detección.

Tabla 3. Tiempos de retención (TR) y desviación estándar (DE) de los OC

Plaguicida	TR ± DE (min)	Límite detección (ng/ml)	Límite cuantificación (ng/ml)
Aldrín	9,96 ± 0,02	0,5	1,0
Endrín	12,02 ± 0,03	0,5	1,0
Dieldrín	11,60 ± 0,03	0,5	1,0
Endosulfán I	11,13 ± 0,03	0,25	0,5
Endosulfán II	12,21 ± 0,03	1,0	2,0
Endosulfán diol	10,83 ± 0,02	0,25	0,5
Endosulfán lactona	10,49 ± 0,02	0,05	0,1
Endosulfán éter	9,01 ± 0,02	0,05	0,1
Endosulfán sulfato	12,99 ± 0,04	0,25	0,5
<i>p,p'</i> -DDE	11,38 ± 0,03	0,5	1,0
<i>o,p'</i> -DDD	11,51 ± 0,03	0,5	1,0
<i>o,p'</i> -DDT	12,24 ± 0,03	0,5	1,0
<i>p,p'</i> -DDT	12,97 ± 0,03	0,5	1,0
HCB	7,70 ± 0,02	0,5	1,0
Lindano	8,23 ± 0,02	0,5	1,0
Metoxicloro	14,31 ± 0,03	1,5	3,0
Mírex	16,37 ± 0,04	0,5	1,0
Vinclozolina	9,14 ± 0,02	0,5	1,0

Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

Todas las determinaciones basadas en la técnica de cromatografía de gases con detector por captura de electrones fueron confirmadas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Las condiciones de trabajo del cromatógrafo fueron:

Temperatura del horno: 50 °C (2 min), 30 °C/min hasta 185 °C (1 min), 2 °C/min hasta 250 °C y a 30 °C/min hasta 300 °C (5 min);

Temperatura del inyector: 250 °C; Flujo del inyector: 1 ml/min;

Temperatura de la trampa de iones del espectrómetro de masas: 200 °C;

Temperatura del colector: 50 °C;

Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C;

Voltaje de modulación axial 3,8 voltios;

Gas portador helio (pureza 99,99%); y volumen de inyección 2 µL.

3.5.3 Determinación de lípidos totales en muestras de suero

Para expresar los niveles de los COPs en función del contenido lipídico de las muestras, se analizó el contenido de colesterol y triglicéridos de alícuotas de suero, siguiendo la técnica de rutina del servicio de Biotecnología del Hospital de Poniente de Almería. Para la medición del colesterol total se aplicó el método enzimático colorimétrico “colesterol estearasa-Peroxidasa (CHOD-PAP), de Abbott Clinical Chemistry” (Analizador automático multiparamétrico Aeroset®).

El colesterol HDL se midió con el método directo sin precipitación, mediante la liberación por solubilización con un detergente de la partícula HDL del colesterol y posterior reacción con la enzima colesterol estearasa y peroxidasa. El colesterol LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald, según la cual:

$$\text{Colesterol Total} = \text{Colesterol HDL} + \text{Colesterol LDL} + \text{VLDL, siendo,} \\ \text{VLDL} = \text{Triglicéridos}/5, \text{ ó}$$

$$\text{Colesterol Total} = \text{Colesterol HDL} + \text{Colesterol LDL} + \text{Triglicéridos}/5$$

Como control de calidad se usó suero control humano liofilizado valorado a dos niveles, nivel 1 bajo y 2 alto, Lyphochek®, de Bio-Rad. Para expresar los valores de la concentración de residuo químico en función del contenido lipídico de las muestras se ha aplicado el siguiente algoritmo (Hoyer et al., 2001; Philips et al., 1989):

$\text{Lípidos totales en suero (mg/ml)} = 2,27 \times \text{colesterol total (mg/ml)} + \text{triglicéridos (mg/ml)} + 0,623$
--

Esta relación permitió determinar un denominador para expresar la concentración de residuo en función de los lípidos del suero.

$$\text{Concentración de plaguicida (ng/g lípido)} = \frac{10^3 \times \text{Concentración (ng/ml suero)}}{\text{Lípidos totales en suero (mg/ml suero)}}$$

3.6 Análisis estadístico

Antes de evaluar las asociaciones se realizó un análisis exploratorio para revisar la calidad y congruencia de los datos. Se revisaron las distribuciones de cada una de las variables y se realizaron las transformaciones necesarias de las variables usadas para desarrollar los modelos. Una de las condiciones para la selección de la prueba estadística a utilizar en los análisis de regresión lineal y logística múltiples, es la asunción de independencia de las variables, es decir, evaluar la correlación entre las variables de estudio. De esta forma se realizó una exploración de la correlación entre los plaguicidas OC analizados, previa a la construcción de los modelos (Snedecor y Cochran, 1980).

El análisis de correlación de Pearson entre cada plaguicida frente a todos los demás se realizó de manera individual, es decir uno a uno, en dos formas, por una lado la correlación entre todos los individuos participantes en el estudio y, por el otro, el análisis de la correlación existente sólo entre aquellos individuos en los que los plaguicidas fueron detectados por encima del límite de cuantificación.

Análisis de regresión lineal simple, no ajustado o bivariante

Se evaluó la asociación entre el NTE y el NTEM frente a cada una de las determinantes socioeconómicas, de estilo de vida, características seminales y examen andrológico clínico, lípidos, hormonas y los plaguicidas OC medidos a lo largo del periodo de reclutamiento que incluía las cuatro estaciones del año.

El NTE fue transformado en su logaritmo neperiano para reducir la asimetría, pero aún así no se alcanzó una distribución normal, por lo que los análisis de regresión lineal simple y múltiple, se desarrollaron con pruebas no paramétricas. Se empleó la U de Mann Withney para la regresión lineal simple, y la de Kruskal Wallis o ANOVA no paramétrica para la regresión lineal múltiple.

Las variables se presentan mediante los datos geométricos, es decir, el valor de la media y el error estándar fueron des transformados, es decir al dato logarítmico se le aplicó la función contraria, el exponencial, o la función inversa en caso de haberse utilizado otra función para la normalización de la variable.

Se realizó un análisis de regresión lineal simple, para determinar la variabilidad asociada a cada una de las variables independientes o determinantes sobre la variable de resultado, es decir, la explicada por cada una de ellas, con el objetivo de analizar el grado y la magnitud asociación para cada una. El análisis de regresión lineal simple se realizó para explorar aquéllos determinantes de la exposición que explicaran por ellos mismos al menos el 10% de la variabilidad de la exposición y resultaran significativos ($p \leq 0,05$).

Modelos predictivos de la exposición a plaguicidas organoclorados

Para la construcción de los modelos predictivos se empleó un análisis de regresión lineal múltiple con objeto de evaluar la relación entre la variable dependiente seleccionada y los determinantes de la exposición (variables independientes).

Se construyeron varios modelos de regresión lineal múltiple partiendo de modelos saturados, para ajustar por los posibles factores de confusión que, aunque no resultaran asociados de forma significativa en la regresión simple, por definición, ellos podrían haber sido afectados por otros factores al no considerar otras variables, por ejemplo otros confusores, o modificadores de efecto, o serlo ellos mismos.

Se presentaron modelos con grados de confiabilidad de 95 y 90%. Los últimos modelos predictivos, se desarrollaron por resultar de interés por las tendencias presentadas respecto a los factores asociados con una significación marginal.

Para la construcción de los modelos de regresión lineal múltiple es de gran relevancia desarrollarlos a partir de modelos saturados, es decir incluyendo inicialmente todas y cada una de las variables que fueron medidas. El análisis de

regresión lineal simple sólo proporciona resultados orientativos, debido a que representa un tipo de análisis no ajustado el cual, de acuerdo con los principios epidemiológicos y estadísticos, pueden representar efectos erróneos o espurios, debido a que pueden estar influenciados por otros factores de confusión o variables modificadoras de efecto.

Por otro lado, se podrían también obtener resultados espurios por desarrollar modelos que no consideren la inclusión de todas aquellas variables que pudieran ser factores de confusión o modificadores de efecto muy relevantes, aunque en la mayoría de las veces no es posible medir todas las variables que pueden serlo.

Modelos de regresión logística múltiple para el NTE y el NTEM

Los modelos de regresión logística múltiple fueron desarrollados en base a dos criterios, el primero siguiendo los modelos de regresión lineal múltiple introduciendo los predictores identificados en los diferentes modelos construidos para el NTE y el NTEM.

Para el análisis de la presencia o ausencia de OC, se consideraron expuestos a los individuos en cuyas muestras los plaguicidas OC estuvieran presentes por encima del límite de cuantificación, para evaluar la oportunidad relativa (OR) "odds ratio", que es un indicador de la magnitud del efecto probable (Pérez-Hoyos, 2003). En el caso de que alguna variable dicotomizada o policotomizada no resultara asociada significativamente, después de haberse demostrado su asociación en su forma continua, fue introducida de esta forma en los modelos, para obtener modelos mejor ajustados dado que el análisis de regresión logística permite la inclusión de variables en su forma continua (Pérez-Hoyos 2003).

El segundo criterio para construir los modelos de regresión logística fue a partir de modelos saturados, es decir a partir de la inclusión de todas las variables medidas en su forma dico o policotómica, considerando la plausibilidad biológica o porque resultaron estadísticamente significativas en un 20%, o sea con el 80% de confiabilidad.

Desarrollo de la base de datos

La información se registró en cuestionarios precodificados en un programa que permitió controlar por rangos entre los valores posibles. Se conformó una base de datos integrada por las variables de todos los instrumentos a utilizar y los resultados de las mediciones del laboratorio. Para el manejo de las bases se preparó un manual de codificación y captura de datos.

Se realizó un análisis exploratorio para revisar la calidad y congruencia de los datos. Se revisaron las distribuciones de cada una de las variables y se procedió a su corrección si procedía. Aquí se realizaron las transformaciones necesarias de las variables para ser usadas en los modelos.

La interacción estadística potencial de los niveles de xenobióticos (séricos) asociados a la calidad del semen en humanos puede analizarse desde diversos enfoques. Para analizar los datos disponibles de forma más completa se realizó un análisis de regresión lineal y logística múltiple, el primero para analizar el incremento o decremento observado en el NTE y el NTEM, por unidad de cambio en las variables independientes, en su forma lineal o estratificada, según correspondiera, como resultado de la interacción entre los COPs y otros determinantes asociadas con los parámetros seminales.

Para el número total de espermatozoides (NTE) y el NTE móviles (NTEM), se estimaron las oportunidades relativas (OR) para el primer parámetro: i) presentar un NTE menor de 40 millones; y ii) una concentración menor a 20 millones de espermatozoides, y para el segundo parámetro: i) presentar un NTEM menor a 40 y ii) presentar un NTEM menor a 20 millones.

Los parámetros seminales se reclasificaron en dos categorías o más (dico- o policotómicamente) siguiendo los criterios o valores de referencia de la OMS. Para la concentración de esperma (<20 millones/ml) y la movilidad (<50% de movilidad del esperma) y según los criterios estrictos de morfología (<4% de esperma normal) (WHO 1999; Kruguer et al., 1988).

La significación estadística del término de interacción se determina calculando los valores de p en base a la prueba de Wald para el término de

interacción multiplicativo (Hosmer y Lemeshow 1989). Además, las probabilidades de ocurrencia de los bajos parámetros seminales de referencia se calcularon a partir de los modelos de regresión logística e incluyeron los principales determinantes y xenobióticos con plausibilidad biológica y significantes desde el punto de vista estadístico.

3.7 Consideraciones éticas

Aprobación por los Comités de investigación, bioseguridad y ética.

Todos los estudios en humanos se adhieren a la declaración de Helsinki en su última versión. Siguiendo este criterio, nuestro protocolo fue revisado y aprobado previamente por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado, y los datos fueron codificados bajo estrictas normas de confidencialidad y anonimato. Las bases de datos fueron igualmente codificadas y los datos de identificación se mantienen separados. Los datos individuales no son revelados a terceros, excepto cuando fuera aprobado por algún participante.

Además, se garantizaron los procedimientos estrictos de seguridad en todos los procedimientos que involucraron manejo de muestras biológicas.

Todos los participantes potenciales en el estudio fueron informados acerca de los objetivos y características de éste, especialmente del tipo de información y de las muestras biológicas que les serían solicitadas. La participación en el estudio fue voluntaria y se les informó que podrían abandonar en cualquier momento, si así lo deseaban.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características de la población de estudio

Se han descrito con anterioridad y de forma detallada en el trabajo de tesis de Duran (2007), las características antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida, del grupo de jóvenes participantes en este estudio, así como las de sus padres. También se han presentado los resultados de la exploración andrológica el análisis seminal, y los resultados de la bioquímica sanguínea de la serie de jóvenes participantes (Avivar Oyonarte et al., 2010; Avivar et al., 2004). Por esta razón se presenta aquí tan sólo un resumen de las principales características de los participantes, al considerarlas en los análisis estadísticos siguientes.

La información de las variables antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida, fue recogida a través de un cuestionario general estructurado y se presenta en las tablas 4, 5 y 6. La información correspondiente a los resultados de la exploración andrológica, evaluada mediante la exploración urológica clínica, se presenta en las tablas 7 y 8. Las tablas 9 y 10, muestran las características de los parámetros seminales del análisis de las muestras de semen proporcionadas por los jóvenes, y, por último, la información relacionada con el análisis morfológico del semen de un subgrupo de 115 jóvenes se muestra en las tablas 11 y 12.

Los resultados relacionados con las características bioquímicas de los perfiles lipídico y hormonal, determinados en suero, se pueden observar en las tablas 13 y 14. Los datos acerca de la presencia, concentración y correlación de los 18 OC determinados en el estudio, tanto para el grupo de individuos en que alguno de los 18 compuestos fueron detectados, como para aquellos en los que los plaguicidas estuvieron por debajo del límite de cuantificación, se muestran en las tablas 15 a 19.

4.1.1. Características antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida.

Las características antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida son presentadas en las tablas 1 (en su forma continua) y 2 (en su forma policotómica).

Edad

El número de años de los sujetos incluidos en el estudio, cumplidos en la fecha de la toma de las muestras no presentó una distribución normal. La media aritmética de los participantes fue de 20,75 años, con una mediana de 20 en un rango entre 18 y 23 años. Esta variable se utilizó como tal, ya que ninguna transformación logró una distribución normal de la misma (Tabla 4).

Peso

El grupo de jóvenes presentó una media aritmética de peso, en el momento del reclutamiento, de 75 Kg. en un rango entre 48 y 120 Kg. (Tabla 4).

Talla

La estatura en centímetros presentó una media de 177,7 cm, en un rango de 156 a 197 cm. La distribución de estas dos últimas variables (peso y talla) no se considero de interés pues utilizamos el índice de masa corporal (IMC), que se construye teniendo en cuenta el peso y la talla de cada individuo (Tabla 4).

Tabla 4. Medidas de tendencia central para la antropometría y consumo de tabaco

Variable	N	Media	DE*	Mediana	Mínimo	Máximo
Edad	275	20,8	1,7	20,4	18,0	23,0
Peso	266	75,3	10,5	75,0	48,0	120,0
Talla	266	177,7	6,4	178,0	156,0	197,0
IMC	266	23,9	3,0	23,7	16,6	39,6
Cigarrillos/día	86	7,8	5,5	5,5	1,0	20,0
Años que fumó	109	3,6	1,8	3,0	1,0	9,0

*Desviación estándar

Índice de masa corporal (IMC)

El índice de Quetelet (IQ o IMC es calculado mediante la estimación del peso en Kg dividido por la estatura en metros elevada al cuadrado, (Kg/m^2), presentó una media de 23,9 Kg/m^2 , el cual se situó entre los límites de referencia de normalidad según la OMS (18,5-24,99 Kg/m^2) (Tabla 4). Según los criterios de la OMS, el 30% de los jóvenes presentaron algún grado de sobrepeso. Se logró una distribución normal al transformar el IMC a su inverso ($1/\text{IMC}$) (Tabla 5).

Tabla 5. Características antropométricas, sociodemográficas y estilo de vida

Variable/Categoría	N	%
IMC		
Normal, 18,5-24,99	188	71,2
Sobrepeso 25-29,99	68	25,8
Obesidad ≥ 30	8	3,0
Escolaridad		
Primaria	10	3,9
Secundaria	17	6,6
Universidad	231	89,5
Trabajo		
No	216	83,7
Si	42	16,3
Diurno	31	12,0
Nocturno	11	4,3
Residencia		
Rural	38	14,7
Urbana	220	85,3
Consumo de tabaco		
No	172	66,7
Si	86	33,3
Consumo cannabis		
No	202	78,3
Si	56	21,7
Consumo de alcohol		
No	81	31,4
Si	177	68,6
Percepción del estado de salud		
Muy buena salud	90	34,9
Buena salud	164	63,5
Mala salud	4	1,6
Enfermedad crónica		
No	241	89,5
Si	17	6,6
Consumó de medicamentos		
No	169	65,5
Si	89	34,5

Consumo de tabaco

Se clasificaron como fumadores sólo a aquellos jóvenes que lo hacían diaria o habitualmente. Los fumadores esporádicos fueron clasificados en el grupo de no fumadores. De esta manera, 172 individuos (66,7%) se declararon no fumadores y 86 sujetos (33.3%) fumadores. La media y la desviación estándar (DE) del número de cigarrillos consumidos por día fue de $7,8 \pm 5,5$. En relación al tiempo que refirieron haber fumado fue de $3,6 (\pm 1,8)$ años, con una mediana de 3 años (Tabla 4).

Consumo de *Cannabis* y derivados

El 78% de los participantes informaron no ser consumidores de *Cannabis* o algún derivado, mientras que el 22% declararon consumirlo habitualmente (Tabla 5).

Consumo de alcohol

Los sujetos que informaron consumir alcohol diariamente o de forma habitual, fueron clasificados como consumidores de alcohol, mientras que los que bebían esporádicamente se clasificaron como no consumidores. Un tercio de los participantes no consumía bebidas alcohólicas y dos tercios lo consumían habitualmente (Tabla 5).

Nivel de estudios

El nivel de estudios se clasificó en tres categorías de acuerdo con el criterio de si contaban con estudios primarios, secundarios y universitarios. El 89% se encontraban realizando estudios universitarios y 10 individuos, tenían estudios primarios. Otros 17 declararon estudios secundarios (Tabla 5).

Actividad laboral

En cuanto a la actividad laboral, 42 jóvenes (16,3%) refirieron algún trabajo remunerado, 11 de los cuales lo realizaban por un horario nocturno y el 31 restante, con horario diurno, lo que representó 4,3% y 12,0%, respectivamente (Tabla 5).

Residencia de los jóvenes en el momento del reclutamiento

La residencia de los jóvenes fue clasificada en la forma descrita en la sección de Materiales y Métodos resultando que la mayoría de jóvenes vivían en áreas urbanas (85,3%) y sólo el 14,7% residían en zonas rurales (Tabla 5).

Percepción del estado de salud de los participantes

Para clasificar la percepción del estado de salud se establecieron cuatro categorías: muy buena, buena, mala y muy mala. La mayoría de los jóvenes consideraron tener buena salud, 90 (34,9%) la consideraron muy buena, 164 (63,5%) refirieron que su salud era “buena” y sólo 4 individuos (1,6%) reportaron una salud mala. Ninguno consideró tener una salud “muy mala” (Tabla 5).

Enfermedad crónica a lo largo de la vida

La mayoría de participantes refirieron no haber padecido ninguna enfermedad crónica a lo largo de su vida (89,5%) y sólo 17 describieron tener alguna. (Tabla 5).

Otras enfermedades a lo largo de la vida

Entre las enfermedades habituales referidas destacan las infecciones bacterianas (n=61), dolores de algún tipo (n=29) y sólo 3 participantes mencionaron alguna enfermedad relacionada con el metabolismo (Tabla 5).

Consumo de medicamentos en los últimos tres meses.

El uso de medicamentos durante los tres meses previos a la toma de muestras fue referido por 89 participantes. El tipo de fármaco informado fue: antibióticos por 15 sujetos (5,8%), analgésicos por 37 sujetos (14,3%), antihistamínicos por 10 jóvenes (3,9%), los suplementos vitamínicos y antidepresivos por 2 individuos para cada tipo (0,8%), mientras que anti-inflamatorios, antivirales, compuestos hormonales, y antitumorales fueron referidos por un solo individuo para cada grupo (0,4%). Por último el 7,0% no pudo identificar la medicación que había tomado (Tabla 5).

Duración de la gestación de los jóvenes.

La duración de la gestación fue reclasificada según ocurriera el alumbramiento pretérmino y postérmino, <37 semanas o más, respectivamente, siguiendo los criterios de la OMS. La mayoría de los sujetos (92%) nació a término y sólo el 8% informó que había nacido prematuramente (Tabla 6)

Tabla 6. Datos sociodemográficos y de estilo de vida de los Padres

Variable/Categoría	n	%
Alumbramiento del joven		
Término	237	91,9
Pre-término	21	8,1
Residencia de la madre durante la gestación del joven		
Rural	51	19,8
Urbana	207	80,2
Residencia de nacimiento de la madre		
Rural	76	29,5
Urbana	182	70,5
Residencia de nacimiento del padre		
Rural	69	26,7
Urbana	189	73,3
Consumo de tabaco de la madre durante su embarazo		
No	221	85,7
Si	15	5,8
No lo supo	22	8,5
Trabajo de la madre durante la gestación del joven		
No	158	61,2
Si	59	22,9
No lo supo	41	15,9
Tipo de trabajo materno durante la gestación del joven		
Intelectual	13	22,2
Manual	34	57,6
Agrícola	8	13,6
No se especifica	4	6,8

Residencia de la madre durante el embarazo

Durante la gestación del participante, el 80,2% de las madres residía en centros urbanos mientras que sólo el 19,8% vivía en áreas rurales (Tabla 6).

Lugar de nacimiento de la madre

La mayoría de las madres había nacido en áreas urbanas (70,5%) y cerca del 30% en áreas rurales (Tabla 6).

Consumo de tabaco de la madre durante la gestación del participante

El 5,8% de los sujetos informaron que su madre fumaba durante la gestación. El 8,5% no supieron responder a la pregunta de si su madre fumaba (Tabla 6).

Trabajo de la madre durante la gestación del participante.

El 61,2% de los participantes informaron que su madre no trabajó fuera del hogar durante su gestación (Tabla 6).

Tipo de trabajo que realizaba la madre durante el embarazo

Las 59 madres que trabajaban fuera de casa se clasificaron en tres subcategorías: 13 madres se dedicaban a un trabajo intelectual (22,2%), 34 madres a uno de tipo manual (57,6%). Y, finalmente, 8 de ellas (13,6%) realizaban actividades agrícolas (Tabla 6).

El lugar de nacimiento del padre

De acuerdo con el criterio descrito en la Sección de Material y Métodos, la mayoría de los padres nacieron en localidades consideradas urbanas (73,3%) y

sólo poco más de la cuarta parte de los padres (26,7%) habían nacido en núcleos rurales (Tabla 6).

4.1.2 Exploración andrológica

Volumen de los testículos

En la Tabla 7 se muestra los resultados del volumen testicular en su forma continua, determinado como parte de la exploración andrológica, exploración que fue realizada en 265 de los 280 participantes del estudio.

Tabla 7. Medidas de tendencia central del volumen testicular

Variable	N	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Volumen testículo derecho (ml)	264	18,5	4,6	20	10	25
Volumen testículo izquierdo (ml)	265	18,5	4,6	20	8	25

Con la utilización del orquidómetro se pudo constatar que los jóvenes presentaron un volumen testicular medio de 20 ml. Cerca del 3% de los sujetos mostraron un tamaño menor al establecido como volumen de referencia (12 ml) en alguno de los testículo (Tabla 7). En la Tabla 8 se describen otras características de la exploración andrológica.

Cicatriz en la zona inguinal o genital

El 6% de los jóvenes presentaron algún tipo de cicatriz en la zona inguinal o genital, la mayoría por fimosis o hernia inguinal (Tabla 8).

Estadios de Tanner

Casi todos los jóvenes (99%) de la población de estudio presentaron un estadio correspondiente a la madurez sexual, es decir estadios 4 y 5 de Tanner (Tabla 8).

Exploración del pene

Tan sólo 2 individuos presentaron un pene de tamaño inferior a la normalidad y no se detectaron casos de hipospadias (Tabla 8).

Consistencia de los testículos

Casi todos los jóvenes (99%) mostraron una consistencia testicular normal. En tres casos se detectó una dureza particular y/o especialmente blandos en otros tres individuos (Tabla 8).

Presencia de tumores

En uno de los jóvenes participantes se detectó una masa tumoral testicular sospechosa palpable. El participante fue derivado al especialista, siguiendo el protocolo propuesto para los casos de especial consideración (Tabla 8).

Epidídimo

La principal anomalía detectada fue la presencia de quistes en el epidídimo, los cuales se detectaron en el 3% de los jóvenes participantes (Tabla 8).

Vasos deferentes

Los conductos deferentes fueron palpables en 241 de los jóvenes (90,9%), y en sólo 24 individuos (9,1%) no se detectaron claramente (Tabla 8).

Varicocele

La presencia de varicocele (derecho, izquierdo o en ambos lados), en cualquiera de sus distintos estadios, estuvo presente en 27(10,3%) de los jóvenes

participantes; mientras que el resto (89,7%) no presentó esta circunstancia (Tabla 8).

Hidrocele

En nuestra población de estudio, sólo se detectaron dos casos de hidrocele, lo que se corresponde con un 0,7% del total (Tabla 8).

Tabla 8. Exploración andrológica

Variable/Categoría	n	%
Cicatriz		
Presente	15	5,7
Ausente	250	94,3
Estadio Tanner		
Nivel 3	1	0,4
Nivel 4	3	1,1
Nivel 5	261	98,5
Tamaño Pene		
Normal	263	99,3
Anormal	2	0,8
Ubicación del testículo derecho		
Bajo en el escroto	249	94,0
Alto en el escroto	14	5,3
En el canal inguinal	1	0,4
No palpable/ausente	1	0,4
Ubicación del testículo izquierdo		
Bajo en el escroto	242	91,3
Alto en el escroto	22	8,3
En el canal inguinal	1	0,4
No palpable/ausente	0	0
Uno de los testículos fuera del escroto	33	12,5
Ambos testículos fuera del escroto	8	3,0
Consistencia del testículo derecho		
Normal	260	99,2
Blanda	1	0,4
Dura	1	0,4
Consistencia del testículo izquierdo		
Normal	260	98,5
Blanda	2	0,7
Dura	2	0,7
Volumen del testículo derecho		
≥12 ml	255	97,3
<12 ml	7	2,7
Volumen testículo izquierdo		
≥12 ml	250	97,0
<12 ml	8	3,0
Presencia de tumores		
Si	1	0,4
No	264	99,6
Epidídimos		
Normal	256	97,0
Anormal (uno o ambos)	8	3,0
Vasos deferentes		
Palpables	241	90,9
No palpables	24	9,1
Varicocele		
Ausente	238	89,8
Presente	27	10,2
Hidrocele		
Ausente	263	99,3
Presente	2	0,7

4.1.3. Análisis de las muestras de semen

Los parámetros seminales que se presentan en las tablas 9 y 10, corresponden a muestras individuales de semen de los 273 jóvenes estudiados. Se presentan las características macroscópicas, químicas y citológicas, así como otras variables indicadoras de la calidad seminal además del tiempo de recogida y otras características cronológicas.

Tabla 9. Medidas de tendencia central de los parámetros seminales

Variable	N	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Tiempo de abstinencia (hrs)	273	75,3	39,7	67,0	24,0	336,0
Ph	273	7,4	0,3	7,5	6,7	8
Volumen eyaculado (ml)	273	3,1	1,5	3,0	0,4	9,8
Células redondas	273	2,34	3,56	1	0	28
Concentración espermática (CE) (millones/ml)	273	72,0	70,1	51	0	420
NTE (millones) aritmético	273	242,6	575,4	148,8	0	8964
NTE (millones) geométrico	273	117,4	2,7	148,8	0	8964
Movilidad						
“Tipo a”(%)	272	29,9	18,5	28	0	78
“Tipo b”(%)	272	18,0	8,0	17,5	0	51
“Tipo c”(%)	272	10,9	4,8	10,0	0	45
“Tipo d” inmovilidad(%)	272	42,6	15,7	40	12	100
Progresiva “a+b”(%)	272	47,9	17,3	49	0	86
Total “a+b+c”(%)	272	58,6	16,7	60	0	89
NTEM geométrica	272	66,5	4,6	86,1	0	5916,2

Volumen eyaculado

El volumen de eyaculado es de una de las características que componen las dos variables de resultado que se analizan en el presente trabajo. En la Tabla 9, se muestra sólo con fines descriptivos y se reclasifica en categorías de acuerdo a criterios establecidos por la OMS (menor o mayor o igual a 2 ml). En nuestra población de estudio el volumen presentó una media aritmética de 3,0 ml, con una DE de 1,5 y una mediana de 3,1 ml (Tabla 9). Cerca del 80,0% de la población presentó un volumen normal de eyaculado, es decir igual o superior a 2 ml,

mientras que poco más del 20% (60 de los 273 participantes), presentaron un volumen menor a 2 ml (Tabla 9).

Concentración espermática (CE)

La CE, establecida como el cociente entre el número total de espermatozoides (NTE) y el volumen total de semen eyaculado, no presentó una distribución normal, ni utilizando los datos crudos ni con alguna transformación numérica. Al igual que en el caso anterior, esta variable se presenta en la Tabla 9 con fines descriptivos. La concentración espermática para la población total presentó una media aritmética de 72 millones de espermatozoides por mililitro de semen, con una mediana de 51 millones, y un rango de 0 a 420 millones de células (Tabla 9).

Atendiendo a las recomendaciones de la OMS (OMS, 1999), como subclasificación de referencia se construyó una variable dicotómica basada en concentraciones menores y mayores o iguales a 20 millones/ml. El primer grupo estuvo formado por 51 sujetos (18,7%) y en el segundo grupo se clasificaron 222 individuos (81,3%) (Tabla 10). Esta fue una de las variables seleccionadas para realizar la regresión logística multivariante con objeto de determinar la oportunidad relativa (OR) de presentar una concentración menor a 20 millones de espermatozoides, lo que clasificaría a los sujetos de estudio con una mala calidad seminal.

Movilidad espermática

Aunque se ha descrito previamente en la Sección de Material y Métodos, de forma resumida se clasifica la movilidad en 4 categorías, a) movilidad progresiva rápida, b) movilidad progresiva lenta, c) movilidad no progresiva, y d) inmovilidad; además considera las variables aditivas, que son i) la velocidad progresiva a + b, y ii) la movilidad total o movilidad a + b + c.

La movilidad progresiva rápida (>25 $\mu\text{m}/\text{seg}$), o movilidad espermática “tipo a” ó Q+++, no presentó una distribución normal tras haber intentado diversas

transformaciones numéricas; sin embargo dado que esta variable era uno de los determinantes analizados frente al número total de espermatozoides (NTE), se incluyó su transformación logarítmica para reducir la asimetría. La media del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rápida resultó ser del 29,9%, con una mediana del 28% en un rango de 0 a 78% (Tabla 9).

Una vez descrita esta variable, la movilidad “tipo a” fue reclasificada de acuerdo a criterios de la OMS, que establece el punto de corte según la presencia de un porcentaje menor o, mayor o igual al 25%. En nuestra población de estudio, 112 jóvenes (41,2%) presentaron una movilidad “tipo a” inferior al 25% y el resto estuvo por encima (160 sujetos, el 58,8%) (Tabla 10).

La movilidad progresiva lenta, “tipo b”, o Q++ que agrupa a las muestras con espermatozoides con una velocidad de 10-25 $\mu\text{m}/\text{seg}$, tampoco mostró una distribución normal, ni se logró tras diferentes transformaciones empleadas. Presentó una media aritmética del 18,0% y una mediana de 17,5% en un rango de 0 a 51% (Tabla 9).

La movilidad progresiva a+b, es la suma aritmética de la movilidad “tipo a” y la de “tipo b”, y equivale al porcentaje de espermatozoides que tienen capacidad de progresión. La movilidad a+b alcanzó una media del 47,9% ($\pm 17,3$), y una mediana del 49%, en un rango de 0 a 86% (Tabla 9). Esta variable mostró una distribución normal. Nuevamente siguiendo los criterios de OMS, la movilidad progresiva a+b fue reclasificada en dos categorías: i) movilidad progresiva, para aquellas muestras que presentaran un valor menor al 50%, y ii) movilidad progresiva para aquellas con un valor mayor o igual a este porcentaje. Un grupo de 134 sujetos presentaron movilidad progresiva baja (49,3%) y 139 presentaron una movilidad progresiva alta (50,7%) (Tabla 10).

Por último, también se utilizó otra reclasificación siguiendo los criterios de OMS, construida a partir de la movilidad espermática tipo a y la movilidad progresiva a+b, que denominamos movilidad a y a+b bajas. Se construyeron dos categorías: i) una correspondiente a aquellas muestras con una movilidad a <25% y una movilidad progresiva a+b <50%, y ii) otra para los que no cumplieran esta condición. De acuerdo a este criterio presentaron una movilidad a y a+b bajas 104

(38.2%) muestras, mientras que 168 (61,8%) fueron clasificados en la segunda categoría (Tabla 10).

La movilidad no progresiva (<10 $\mu\text{m}/\text{seg}$) o movilidad “tipo c”, presentó una media de 10,9% (4,8%) y una mediana del 10%, con un rango del 0 a 45%, según se muestra en la Tabla 9. La movilidad c, tampoco presentó una distribución normal en su forma cruda o con alguna transformación numérica, por lo que también se analizó con su transformación logarítmica como se hizo para todos los tipos de movilidad.

La movilidad total es el resultado de la suma aritmética de las movilidades tipo a, b y c, y refleja el porcentaje de espermatozoides con algún tipo de movilidad. La movilidad total no presentó una distribución normal, y aunque también se transformó a su logaritmo neperiano, se presentan los datos aritméticos para fines de comparación (Tabla 9). Se construyó también como variable dicotómica en menor o mayor o igual a una movilidad de 50%. Siguiendo este criterio sólo 70 jóvenes (25,6%) presentaron un nivel inferior al 50% de movilidad y 202 participantes (74,3%) mostraron un valor superior, que no debe confundirse con la mediana, la cual divide a la población en el 50% de los individuos (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros seminales dicotómicos

Variable	N	%
CE < 20 millones/ml	51	18,7
≥ 20 millones/ml	222	81,3
NTE < 40 millones	48	17,6
≥ 40 millones	225	82,4
NTEM < 40 millones	79	29,0
< 20 millones	51	18,8
Movilidad “tipo a” < 25 %	112	41,2
≥ 25 %	160	58,8
Movilidad Progresiva (a+b) (%) <50%	134	49,1
≥50%	139	50,9
Movilidad Baja a <25% y a+b <50%	168	61,8
a ≥25% y/o a+b ≥50%	104	38,2
Movilidad Total a+b+c (%) < 50 %	70	25,6
≥ 50 %	202	74,3

La movilidad tipo d, o inmovilidad, es el porcentaje de espermatozoides que no presentan ninguna movilidad. No presentó una distribución normal, pero su transformación en la raíz cuadrada si la tuvo y así fue utilizada en los análisis estadísticos posteriores. No obstante se presentan aquí los datos aritméticos para fines de comparación. El valor medio de la movilidad tipo “d” se sitúa en el 42,6% (15,7), una mediana del 40%, con un rango de 12 a 100% (Tabla 9).

Indicadores de calidad seminal seleccionados

- i) El número total de espermatozoides (NTE) y,
- ii) El número total de espermatozoides móviles (NTEM).

El número total de espermatozoides (NTE) es uno de los mejores marcadores de la calidad seminal de acuerdo a la literatura disponible, por lo que ha sido una de las variables seleccionadas para construir los modelos predictivos de regresión lineal y logística múltiples, tanto en su forma continua como en su forma categórica. El NTE se ha utilizado en este trabajo para evaluar el efecto de los factores de confusión, modificadores de efecto, covariables y otros predictores de la calidad seminal en la serie estudiada.

La variable NTE se expresa en millones de espermatozoides eyaculados. Se estima a partir del producto de la concentración de espermatozoides por el volumen total eyaculado. Esta variable no presentó una distribución normal, ni en su forma cruda o con alguna de sus transformaciones numéricas, pero fue transformada en su logaritmo neperiano para reducir la dispersión y la asimetría y realizar un análisis más robusto.

El NTE presentó una media aritmética y desviación estándar de 242,6 (+575,4) millones de espermatozoides, con una mediana de 148,8 en un rango de 0 a 8964 millones. El NTE presentó una media y desviación estándar geométricas de 117,4 (+2,7) millones de espermatozoides (Tabla 9). Cuando la variable fue reclasificada en un NTE menor o mayor o igual a 40 millones de espermatozoides,

en el primer grupo quedaron incluidos 48 individuos (17,6%), mientras que para el segundo se registraron 225 jóvenes (82,4%) (Tabla 10).

El número total de espermatozoides móviles o NTEM presentó una media aritmética de 158,6 millones de espermatozoides móviles (+15,7), con una mediana de 86,6, en un rango de 0 a 5 916 millones de espermatozoides móviles. Esta variable tampoco presentó una distribución normal, por eso fue transformada a su logaritmo neperiano para todos los análisis con el fin de reducir la asimetría. El NTEM mostró una media y desviación estándar geométricas de 69,7 y (+4,1) millones de espermatozoides móviles, respectivamente (Tabla 9).

Para el NTEM también se construyeron dos variables dicotómicas, aunque no se realizó en base a criterios de la OMS. Se emplearon: i) presentar un NTEM menor 40 millones, o un número mayor o igual a esta cifra, y ii) presentar menos de 20 millones, o una cantidad mayor o igual a esta cifra. En el primer caso resultaron incluidos 79 de los individuos (29%) que presentaron menos de 40 millones en el NTEM y 193 jóvenes presentaron un nivel mayor o igual en el NTEM. En la segunda variable 51 individuos (18,8%) presentaron un nivel por debajo de 20 millones en el NTEM, y 221 presentaron un nivel igual o superior a esta cifra (Tabla 10).

Para estimar el NTEM, la OMS propone un sistema simple para clasificar la movilidad espermática sin necesidad de manipulaciones o algoritmos complejos. La movilidad total o movilidad $a + b + c$, fue la utilizada para constituir el NTEM, ya que de acuerdo con estudios recientes (Crazzolaro, et al., 2007), los mejores marcadores de la calidad seminal serían los generados a partir de varios parámetros y, en este caso, la variable resulta del producto de la movilidad total y el NTE, que a su vez está formado por otros dos, el recuento de espermatozoides y el volumen eyaculado.

Estación del año de recogida de la muestra

De las 273 muestras recogidas, 74 se obtuvieron en primavera (27,1%), 21 en verano (7,7%), 132 en otoño (48,4%) y 46 en invierno (16,9%) (Tabla 11).

Tabla 11. Descriptiva de la muestra de semen

Variable/Categoría	n	%
Estación del año		
Primavera	74	27,1
Verano	21	7,7
Otoño	132	48,4
Invierno	46	16,9
Abstinencia		
< 48 horas	19	7,0
≥ 48 horas	254	93,0
pH		
pH ≥ 7,2	231	84,6
pH < 7,2	42	15,4
Licuefacción completa		
Si	256	93,8
No	17	6,2
Viscosidad Normal		
Nivel 1	17	6,2
Nivel 2	15	5,5
Nivel 3	21	7,7
Volumen eyaculado		
< 2 ml	60	22,0
≥ 2 ml	213	78,0
Aglomeraciones		
Nivel 0	209	76,8
Nivel 1	22	8,1
Nivel 2	31	11,4
Nivel 3	10	3,7

Tiempo de Abstinencia

El tiempo de abstinencia observado para los 273 jóvenes del estudio que dieron la muestra de semen, presentó un valor medio y una desviación estándar de 75,3 ($\pm 39,4$) horas, en un rango de 24 horas a 14 días. La abstinencia no presentó una distribución normal, y fue reclasificada en cuartiles y como variable dicotómica, formada por los que reportaron una abstinencia < ó ≥ 48 horas, atendiendo a las recomendaciones de la OMS. Sólo 19 individuos (7,0%) fueron clasificados en el primer grupo, es decir, aquellos que tuvieron una abstinencia menor a las 48 horas. El resto, 254 pertenecieron al segundo grupo (93,0%). A excepción de dos jóvenes que presentaron una abstinencia entre 24 y <38 horas, la mayoría de ellos presentaron una abstinencia en un rango de 38 a 47 horas (Tabla 11).

Acidez-alcalinidad de las muestras (pH)

El potencial de hidrógeno o potencial ácido-base de las muestras, no presentó una distribución normal. Esta variable se analizó tanto en forma continua, como de manera dicotómica, estableciendo como punto de corte por encima y por debajo ($<$ ó \geq) de pH 7,2. La mayoría de las 231 muestras de semen presentaron un pH superior a 7,2 (84,6%) y sólo 42 jóvenes presentaron un pH ligeramente más ácido (15,4%) (Tabla 11).

Licuación/viscosidad

El semen alcanza normalmente la licuación total durante el tiempo de análisis, pero cuando no es así, podría relacionarse con problemas en la calidad seminal. En 256 sujetos (93,8%) la muestra presentó una licuefacción completa, mientras que en 17 muestras (6,2%) este proceso no fue completo. La viscosidad, como se indicó en la Sección de Material y Métodos, fue reclasificada en 4 niveles: 220 individuos presentaron un valor de 0, establecido como nivel de referencia (80,6%), y coincidió con aquellos cuya muestra caía de la pipeta formando gotas o un filamento de menos de 2 cm. En los niveles 1, 2 y 3 se registraron 17 (6,2%), 15 (5,5%) y 21 (7,7%) muestras, respectivamente (Tabla 11), es decir para aquellos en los que las muestras formaban un filamento de 2 a 5 cm (viscosidad de 1), filamento de entre 5 y 10 cm (nivel 2), y filamentos superiores a 10 cm (nivel 3 o de alta viscosidad).

Aglomeraciones

Las agrupaciones de espermatozoides y otros componentes del semen se conocen como agregaciones o aglomeraciones. Este proceso se reclasificó en 4 niveles, asignando el valor 0 al nivel de referencia o de no aglomeración, que incluyó a 209 muestras, (76,8% del total), y los niveles 1, 2 y 3 fueron asignados a 22 (8,1%), 31 (11,4%) y 10 (3,7%) muestras, respectivamente (Tabla 11).

Presencia de células redondas

Las células redondas son elementos celulares no espermáticos que pueden estar presentes en las muestras de semen; su concentración se expresa en millones/ml. Esta variable presentó una media aritmética de 2,34 y una DE de 3,56, con un rango de 0 a 28 millones/ml (Tabla 9).

4.1.4. Análisis de la morfología del semen

Morfología espermática

A pesar de que la determinación de las características de la morfología espermática son referidas como muy buenos indicadores de la calidad seminal y por ello de la salud reproductiva masculina, estas características sólo se pudieron medir en menos del 50% del total de las muestras (n=115), lo que ha reducido el número total de individuos incluidos en los modelos de regresión lineal y logística múltiples realizados para la variable NTEM. Los resultados de la morfología espermática se presentan en las tablas 12 y 13.

Entre los parámetros medidos se incluyeron los siguientes:

- Porcentaje de espermatozoides normales (PEN),
- Porcentaje de espermatozoides anormales (PEA),
- Porcentaje de cabezas anormales (PCA),
- Porcentaje de restos citoplasmáticos (PRC),
- Porcentaje de flagelos anormales (PFA),
- Porcentaje de crestas intermedias anormales (PIA),
- Índice de teratozoospermia (IT).

Formas normales

El porcentaje de espermatozoides normales (PEN) mostró un valor medio del 13,8%, con una mediana de 13%, en un rango de 0 a 34%. Como esta variable presentó una distribución normal, no preciso de ninguna transformación y así fue utilizada para los análisis posteriores (Tabla 12). De acuerdo a los criterios de la OMS el porcentaje de formas normales fue reclasificado en \leq ó $>$ a 4%, ya que se ha referido que la capacidad reproductora puede verse comprometida en aquellos individuos verse con un $\text{PEN} \leq 4\%$, por lo que la OMS ha recomendado que se utilice ésta como un indicador de una pobre calidad seminal. Según este criterio, 15 jóvenes del estudio (13%) fueron incluidos en la primera categoría (Tabla 13).

Tabla 12. Medidas de tendencia central de la morfología espermática

Variable	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
PEN	115	13,8	8,0	13	0	34
PEA	115	86,3	8,1	87	64	100
PCA	115	92,3	6,9	94,4	62,9	100
PRC	115	3,4	2,9	2,9	0,0	18,9
PFA	115	7,2	6,6	5,4	0,0	39,6
PIA	115	26,0	8,6	26,0	3,4	50
IT	115	1,3	0,01	1,3	0,9	1,7

El porcentaje de espermatozoides anormales (PEA) presentó una distribución normal, y una media aritmética de 86,3% con una DE de 8,1, con un rango de 64 a 100% (Tabla 12).

El porcentaje de cabezas anormales (PCA) tuvo distribución normal, y una media aritmética de 92,3%, una mediana de 94,4%, con un rango de 62,9 a 100 (Tabla 12).

El porcentaje de restos citoplasmáticos (PRC) en la población de estudio tampoco presentó una distribución normal, pero ésta se logró con su

transformación mediante la raíz cuadrada. Presentó una media aritmética de 3,4% y una mediana de 2,9% (Tabla 12).

El porcentaje de flagelos anormales (PFA) en la población de estudio no presentó una distribución normal ni se pudo alcanzar con alguna transformación numérica, por lo que en los análisis posteriores se usaron los datos crudos. La media aritmética fue de 7,2%, la mediana de 5,4% en un rango de 0 a 39,6% (Tabla 12).

El porcentaje de crestas intermedias anormales (PIA) no presentó una distribución normal aunque tampoco una gran dispersión, por lo que los datos crudos fueron utilizados en los análisis estadísticos posteriores.

Por último, el índice de teratozoospermia (IT) no presentó una distribución normal, pero si se logró alcanzarla mediante la transformación en su raíz cuadrada. El valor medio fue de 1,3 y la mediana idéntica (Tabla 12).

Tabla 13. Porcentaje de formas normales menor a 4%

Variable/Categoría	n	%
PEN ≤ 4%	15	13,0
PEN > 4%	100	87,0

4.1.5 Determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre

De acuerdo con el protocolo del diseño del estudio, la muestra de sangre fue obtenida en el momento de la exploración física de los jóvenes y de la recogida de la muestra de semen. La muestra de sangre fue analizada para determinar el perfil lipídico y hormonal, así como la exposición de los sujetos de estudio a los contaminantes medioambientales de interés. En cuanto al perfil lipídico y hormonal, los datos numéricos de sub-muestras de 148 y 253 individuos, respectivamente, son presentados en las tablas 14 y 15. Del perfil de lípidos fueron determinados el contenido de colesterol total, triglicéridos, LDL y HDL, y

para las hormonas se determinaron los niveles de inhibina B, FSH, LH, testosterona y globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG).

Colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos en suero

Los valores de colesterol total, triglicéridos y las lipoproteínas de alta y de baja densidad en sangre, se muestran en la Tabla 14.

El valor medio para colesterol total en los jóvenes participantes fue de 167,4 mg/dl con una mediana de 162 mg/dl. Los triglicéridos presentaron una media de 112,8 mg/dl y una mediana de 97 mg/dl (Tabla 14).

Entre los lípidos de alta y de baja densidad (HDL y LDL, respectivamente), los LDL mostraron una media aritmética de 94,2 mg/dl, con una mediana de 88,5 mg/dl, mientras que la media de los HDL fue de 51,9 mg/dl, con una mediana de 50,0 mg/dl (Tabla 14). En ambos tipos los valores obtenidos para la población de estudio se encuentran dentro de los niveles indicados como dentro de la normalidad, aunque la media de los HDL parece ligeramente por encima de lo establecido (colesterol HDL > 45 mg/dl y colesterol LDL < 130 mg/dl) (Tabla 14).

Ninguno de los parámetros presentó una distribución normal, por lo que los datos numéricos se transformaron a su logaritmo neperiano, con lo cual si se obtuvo esa distribución.

Tabla 14. Medidas de tendencia central de los datos bioquímicos sanguíneos

Variable	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Colesterol total (mg/dl)	145	167,4	31,9	162	110	279
Triglicéridos (mg/dl)	145	110,5	48,7	97	27	253
LDL (mg/dl)	145	94,2	26,1	88,5	46	190,6
HDL (mg/dl)	145	51,9	10,1	50	31	85

Valores de referencia:

Colesterol total < 200 mg/dl y triglicéridos < 200 mg/dl, HDL > 45 mg/dl y LDL < 130 mg/dl

Perfil hormonal masculino

Los niveles séricos de las hormonas del eje reproductivo masculino (Eje hipotálamo, hipófisis, gónadas), así como el perfil hormonal sérico incluyó la determinación de la inhibina B, la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH), la testosterona y la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), cuyos valores se muestran en la Tabla 15.

La inhibina B mostró un valor medio de 174,2 pg/ml y una mediana de 163 pg/ml. No presentó una distribución normal con ninguna transformación numérica pero en el análisis estadístico se utilizó la transformación logarítmica para reducir la asimetría (Tabla 15).

La LH presentó una media aritmética de 4,1 UI/L, con una DE de 10,5 UI/L y una mediana de 3,8 UI/L, con un rango de 6 a 74,0 UI/L. La transformación a su logaritmo neperiano mostró una distribución normal, por lo que en esa forma fue utilizada para los análisis estadísticos posteriores (Tabla 15). La FSH presentó una media de 3,1 UI/L y una mediana de 2,8 UI/L y tampoco presentó una distribución normal ni con alguna transformación.

La SHBG presentó una media aritmética de 30,3 nmol/l y una mediana de 29,5 nmol/L. Su raíz cuadrada mostró una distribución normal, por lo que esta transformación fue incluida en el análisis estadístico posterior (Tabla 15). La testosterona presentó una media aritmética de 24,9 nmol/l y una mediana de 23,8 nmol/l. La distribución normal se obtuvo con la transformación logarítmica de la variable, que fue utilizada en el análisis estadístico posterior (Tabla 15).

Tabla 15. Valores hormonales en muestras de sangre

Variable	N	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Testosterona (nmol/l)	253	24,9	8,4	23,8	9,2	59,0
SHBG (nmol/l)	253	30,3	10,5	29,5	6	74,0
Inhibina B (pg/ml)	253	174,2	66,8	163	1	425
LH (UI/L)	253	4,1	1,8	3,8	1,2	11,0
FSH (UI/L)	253	3,1	1,7	2,8	0,4	10,6

Tabla 16. Valores hormonales y equivalentes normales

Parámetros	SI	Convencional (C)	Factor de Conversión (CF) $CF \times C = SI$
FSH	0.9–15 IU/L 1.5–10.3 IU/L	0.9–15 mIU/mL	—
LH	1.3–13 IU/L 1.93–9.7 IU/L	1.3–13 mIU/mL	—
Inhibina B			
SHBG	13.5–57.4 nmol/L		
Testosterona	10–35 nmol/L	3–10 ng/mL	3.467

(Bjerner et al., 2009).

4.2 Exposición a plaguicidas organoclorados

La concentración de residuo de los plaguicidas OC seleccionados para el estudio fue determinada en una sub-muestra de 224 jóvenes que proporcionaron muestras de sangre para el análisis. Las medidas de tendencia central para estos plaguicidas, ajustadas por lípidos han sido descritas previamente en el trabajo de tesis de Durán (2007). Los resultados de los análisis de los plaguicidas OC, expresados en ng/ml, se muestran de forma resumida en las tablas 12 a 16 y en la Figura 1.

Número de residuos detectados por muestra

Todas las muestras de suero analizadas contenían al menos un plaguicida en concentración cuantificable. La mediana del número de plaguicidas detectados por muestra fue de 11, con un rango comprendido entre 4 y 17. La mayor parte de jóvenes mostró entre 10 y 14 residuos de plaguicidas analizados.

Concentración de residuos de plaguicidas organoclorados

El compuesto detectado con mayor frecuencia fue el *p,p'*-DDE, el cual se detectó en un 97% de las muestras de suero y estuvo presente en 208 individuos. Le sigue la vinclozolina que se detectó 206 sujetos (96%) y el endosulfán diol presente en 197 jóvenes (92%). Por otra parte, el plaguicida menos frecuente fue el *o,p'*-DDT que fue detectado en sólo 43 sujetos (19% de la muestra). Este

compuesto fue seguido por el endosulfán II y el mírex, que se detectaron en 77 y 78 jóvenes (34.4 y 34.8%), respectivamente (Tabla 17).

Las concentraciones de los plaguicidas OC, cuando se incluyeron sólo los individuos que presentaron niveles por encima del límite de detección, sitúan en primer lugar al endosulfán diol que alcanzó el máximo valor medio (12,1 ng/ml suero), seguido por la vinclozolina con 8,5 ng/ml, p,p'-DDT y p,p'-DDE, que mostraron concentraciones de 4,6 y 4,5 ng/ml, respectivamente (Tabla 17).

Tabla 17. Concentración (ng/ml de suero) de plaguicidas organoclorados (no incluidos < LC)*

Plaguicida OC	n (%)	Media	DE**	Mediana	Mínimo	Máximo
Aldrín	168(78)	3,70	0,76	3,33	0,96	33,76
Endrín	132(61)	3,75	1,56	2,30	0,32	64,04
Dieldrín	104(48)	2,69	0,65	2,50	0,46	29,42
Endosulfán I	171(80)	2,05	0,62	1,72	0,48	19,36
Endosulfán II	75(92)	1,68	0,43	1,46	0,78	6,85
Endosulfán diol	197(92)	12,14	1,18	10,59	0,97	76,86
Endosulfán lactona	174(81)	2,07	0,58	2,01	0,29	16,16
Endosulfán éter	84(39)	1,06	0,48	0,81	0,37	7,93
Endosulfán sulfato	144(67)	1,66	1,07	1,23	0,20	53,32
o,p'-DDT	42(20)	1,38	0,47	1,25	0,38	6,26
p,p'-DDT	126(59)	4,57	0,86	4,80	0,37	40,96
p,p'-DDE	208(97)	4,48	0,68	4,30	0,25	25,88
p,p'-DDD	143(67)	3,66	0,77	3,55	0,43	36,58
Lindano	140(65)	2,07	0,63	1,76	0,37	17,72
HCB	173(81)	3,56	0,88	3,29	0,37	30,29
Metoxicloro	131(61)	3,14	0,86	2,71	0,53	53,80
Mírex	75(35)	1,86	0,65	1,44	0,35	26,64
Vinclozolina	206(96)	8,47	0,77	8,93	0,80	43,74

*Datos geométricos

**Desviación estándar

Cuando se presentan los niveles correspondientes a todos los individuos estudiados, es decir, incluidos los individuos que presentaron niveles por debajo del límite de cuantificación (Tabla 18), las concentraciones medias más altas fueron del mismo orden: en primer lugar el endosulfán diol con el valor medio máximo (9,8 ng/ml suero), seguido de la vinclozolina con 7,8 ng/ml, p,p'-DDT y

p,p'-DDE, que mostraron concentraciones de 2,2 y 4,25 ng/ml, respectivamente (Tabla 18).

Tabla 18. Concentración (ng/ml de suero) de plaguicidas organoclorados (incluidos < LC)*

Plaguicida OC	Media	DE**	Mediana	Mínimo	Máximo
Aldrín	2,66	0,99	2,62	0,50	33,76
Endrín	2,71	1,22	1,50	0,32	64,04
Dieldrín	1,32	0,77	0,50	0,46	29,42
Endosulfán I	1,54	0,75	1,47	0,25	19,36
Endosulfán II	1,21	0,29	1,00	0,78	6,85
Endosulfán diol	9,79	1,69	9,56	0,25	76,86
Endosulfán lactona	1,50	0,81	1,68	0,05	16,16
Endosulfán éter	0,37	0,50	0,05	0,05	7,93
Endosulfán sulfato	1,07	1,00	0,50	0,20	53,32
o,p'-DDT	0,64	0,28	0,50	0,38	6,26
p,p'-DDT	2,24	1,23	1,85	0,37	40,96
p,p'-DDE	4,25	0,76	4,15	0,00	25,88
p,p'-DDD	2,19	1,03	2,06	0,43	36,58
Lindano	1,39	0,69	1,19	0,37	17,72
HCB	2,67	1,05	2,31	0,37	30,29
Metoxicloro	1,78	1,00	1,47	0,50	53,80
Mires	0,88	0,53	0,50	0,35	26,64
Vinclozolina	7,77	0,96	8,80	0,50	43,74

*Datos geométricos

**Desviación estándar

4.2.1. Análisis de correlación de los plaguicidas organoclorados seleccionados.

Las correlaciones entre los 18 plaguicidas OC, expresados en ng/ml, incluyendo a todos los individuos se muestra en la Tabla 19. En la Tabla 20 se muestran las correlaciones entre los plaguicidas para aquellos individuos en los que estos fueron detectados y estuvieron presentes en niveles por encima del límite de cuantificación. El análisis de correlación de Pearson fue realizado para cada plaguicida frente a los otros 17 de manera individual. Los resultados de las correlaciones entre plaguicidas derivados del mismo grupo y las del lindano, HCB,

metoxicloro, mírex y vinclozolina, se presentan en cursiva negrilla, y las correlaciones mayores del 40% se presentan en “negrillas subrayadas”.

En la Tabla 19 se puede observar que de las 163 comparaciones posibles, sólo 12 comparaciones superaron el 40% de correlación, y de ellas sólo 5 superaron el 50% y una el 60%. Aldrín con lindano y vinclozolina con 63 y 51%, respectivamente. Endrín con endosulfán I, el o,p'-DDT y metoxicloro con 48, 41 y 40%, respectivamente. El lindano con el HCB y la vinclozolina con 47 y 55% respectivamente. El Endosulfán I con el endosulfán lactona y el metoxicloro con 43% para ambos casos. Como se puede observar, del mismo grupo sólo en los endosulfanes observamos una correlación por encima del 40%.

Entre los resultados del análisis de correlación correspondiente para el grupo en el que estuvieron presentes por encima del límite de cuantificación (Tabla 20), se observa que las correlaciones se incrementaron desde las 12 anteriores hasta en 54 comparaciones, es decir, cerca de la tercera parte del número total de comparaciones. Sin embargo, sólo 18 de ellas superaron el 60%, mientras que únicamente 5 comparaciones fueron de alrededor del 80%, lo que ocurrió para 4 para el mírex y dieldrín, endosulfán sulfato, o,p'-DDT y metoxicloro. Y otra para el endrín y el endosulfán II.

Tabla 19 Correlación entre residuos de plaguicidas OC incluidas las 215 muestras analizadas

Correlacion	Endrín	Dieldrín	Endo. I	Endo. II	Endo. diol	Endo. lactona	Endo. éter	Endo. sulfato	o,p'-DDT	p,p'-DDT	o,p'-DDE	p,p'-DDD	Lindano	HCB	Metoxicloro	Mírex	Vinclozolina
Aldrín	-0.02	0.27	0.20	0.24	0.34	0.14	0.02	0.22	0.05	0.13	0.39	0.29	0.63	0.23	0.08	0.22	0.51
Endrín		0.36	0.48	-0.04	0.09	0.18	0.14	0.12	0.11	-0.04	0.41	0.25	-0.01	0.38	0.40	0.23	-0.06
Dieldrín			0.09	0.03	0.06	0.37	0.34	0.08	0.04	0.08	0.23	0.05	0.05	0.18	0.05	0.12	0.02
Endo. I				0.06	0.24	0.43	0.09	0.37	0.05	-0.01	0.17	0.19	0.12	0.10	0.43	0.39	0.09
Endo. II					0.17	0.11	0.11	0.02	0.13	0.17	0.33	0.03	0.23	0.15	0.10	0.05	0.15
Endo. diol						0.10	0.02	0.41	0.01	-0.07	0.25	0.29	0.36	0.06	-0.02	0.04	0.27
Endo. lactona							0.21	0.17	0.01	0.05	0.05	0.11	0.02	0.00	0.29	0.24	-0.03
Endo. éter								0.15	0.07	-0.03	0.14	0.03	0.17	0.11	0.04	0.00	0.11
Endo. sulfato									0.07	-0.16	0.12	0.19	0.17	0.02	0.29	0.42	0.15
o,p'-DDT										0.13	0.04	0.10	0.06	0.05	0.10	0.16	0.02
p,p'-DDT											0.11	0.11	0.38	0.38	-0.06	0.06	0.18
o,p'-DDE												0.35	0.32	0.36	0.38	0.20	0.27
p,p'-DDD													0.14	0.19	0.25	0.25	0.23
Lindano														0.47	0.09	0.15	0.55
HCB															0.27	0.09	0.23
Metoxicloro																0.54	-0.02
Mírex																	0.20

Tabla 20 Correlación entre residuos de plaguicidas OC consideradas sólo aquéllas por encima del límite de cuantificación

Correlacion	Endrín	Dieldrín	Endo. I	Endo. II	Endo. diol	Endo. lactona	Endo. éter	Endo. sulfato	o,p'-DDT	p,p'-DDT	o,p'-DDE	p,p'-DDD	Lindano	HCB	Metoxicloro	Mírex	Vinclozolina
Aldrín	0.11	0.46	0.17	0.58	0.34	0.25	0.48	0.33	0.54	0.23	0.52	0.30	0.68	0.42	0.15	0.48	0.62
Endrín		0.45	0.61	0.83	0.00	0.63	0.14	0.25	0.40	0.11	0.53	0.35	0.06	0.32	0.46	0.44	-0.04
Dieldrín			0.19	0.54	0.24	0.65	0.62	0.17	0.19	0.02	0.57	0.68	0.03	0.22	0.40	0.79	0.29
Endo. I				0.31	0.31	0.68	0.13	0.57	0.31	0.06	0.33	0.29	0.13	0.15	0.60	0.51	0.03
Endo. II					0.15	0.44	0.26	0.25	0.42	0.23	0.64	0.49	0.28	0.20	0.71	0.36	0.20
Endo. diol						0.22	0.23	0.60	0.10	0.34	0.29	0.36	0.30	0.34	0.14	0.40	0.27
Endo. lactona							0.27	0.32	0.06	0.20	0.35	0.27	-0.01	0.25	0.54	0.50	-0.03
Endo. éter								0.43	0.22	0.02	0.31	0.16	0.37	0.36	0.25	0.16	0.35
Endo. sulfato									0.16	0.08	0.28	0.26	0.40	0.28	0.50	0.79	0.22
o,p'-DDT										0.57	0.41	0.47	0.63	0.62	0.69	0.77	-0.07
p,p'-DDT											0.34	0.12	0.55	0.63	0.17	0.39	0.21
o,p'-DDE												0.49	0.36	0.40	0.41	0.29	0.29
p,p'-DDD													0.11	0.21	0.28	0.28	0.23
Lindano														0.61	0.04	0.36	0.57
HCB															0.27	0.33	0.31
Metoxicloro																0.74	0.03
Mírex																	0.26

4.3. Regresión lineal simple del NTE y sus determinantes.

En la tesis de Duran (2007) se presentaron en detalle y de forma exhaustiva los resultados del análisis de regresión lineal simple con objeto de ver el grado de explicación de cada una de las variables. Por esta razón en esta sección tan sólo se hará referencia a los resultados más llamativos, los cuales fueron de mayor interés al observar los resultados de los modelos de regresión múltiple o modelos ajustados, tanto lineales como logísticos presentados más adelante.

Las tablas 21 a 28 muestran los resultados del análisis de regresión lineal simple entre el NTE y sus principales determinantes. Entre estos se han considerado factores antropométricos, sociodemográficos y del estilo de vida que se han descrito en la literatura como factores asociados a la calidad seminal, como la residencia rural o urbana, la ocupación materna y paterna durante la gestación de los participantes, el consumo de medicamentos y la exposición a otros factores durante los períodos de riesgo en la gestación de los jóvenes participantes.

Las variables incluidas en los modelos de regresión lineal hacen referencia a exposiciones que representan un riesgo para la calidad seminal de los jóvenes participantes o para su salud reproductiva. Dichas exposiciones pueden tener lugar en el lugar de residencia o del trabajo de los jóvenes o sus padres, principalmente durante los períodos mencionados durante la gestación de los participantes o durante el desarrollo y maduración de su sistema reproductor.

Otras variables bioquímicas consideradas, por su relación con la calidad seminal, son las características bioquímicas, el perfil de lípidos y hormonas, y por último las directamente relacionadas con la hipótesis de trabajo, la exposición a POC.

4.3.1. Regresión lineal simple para el NTE

Se realizó un análisis de regresión lineal simple entre NTE y algunas variables antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida, entre las que se

incluyen la edad, el IMC, la percepción del estado de salud, el nivel de estudios y la ocupación de los jóvenes, así como el consumo de medicamentos, tabaco y hachís. Como se puede observar en la Tabla 21 todas las variables antropométricas, sociodemográficas y del estilo de vida, a excepción de la edad y el nivel de estudios, presentan una relación negativa con la NTE. Las primeras se acompañan de una caída importante en el NTE. Entre ellas el tener tan sólo estudios primarios y el consumo de antivirales alcanzaron reducciones de 3,2 y 31,4 millones en el NTE, respectivamente.

Tabla 21. Regresión lineal simple entre NTE y variables antropométricas, sociodemográficas y de estilo de vida

Variable	N	β	EE	P	IC 95%		
Edad	273	1,07	1,04	0,093	-1,01	1,16	
IMC	≤ 25	263	-1,04	1,03	0,140	-1,10	1,01
	<25	188	1,17	1,20	0,389	-1,22	1,68
	≥ 25 a <30	68	-1,17	1,21	0,411	1,70	1,24
	≥ 30	8	-1,09	1,62	0,861	-2,80	2,37
Percepción del estado de salud general	252	-1,29	1,17	0,109	-1,76	1,06	
Estudios		258	1,59	1,19	0,009	1,12	2,24
	Primarios	10	-3,23	1,50	0,004	-7,15	-1,46
	Secundarios	17	-1,08	1,38	0,805	-2,03	1,73
	Universitarios	231	1,68	1,29	0,044	1,01	2,79
Trabajo del joven	diurno	31	-1,42	1,28	0,160	-2,33	1,15
	nocturno	11	-1,17	1,48	0,686	-2,54	1,85
	sin horario o no trabaja	216	1,37	1,24	0,146	-1,12	2,11
Salud del joven	muy buena	90	1,30	1,18	0,116	-1,07	1,81
	buena	164	-1,29	1,17	0,109	-1,76	1,06
	mala	4	-1,30	1,18	0,116	-1,81	1,07
En los 3 meses previos a su participación							
Consumió antivirales	1	-31,43	3,51	0,006	-372,18	-2,65	
Consumió antibióticos	15	-1,50	1,34	0,170	-2,68	1,19	
Consumo de tabaco							
Si		86	-1,30	1,19	0,122	-1,82	1,07
	cigarrillos/día	86	-1,03	1,02	0,057	-1,07	1,00
	Años que ha fumado	109	-1,07	1,04	0,092	-1,15	1,01
Consumo de hachís	56	-1,37	1,06	0,037	-2,00	-1,06	

EE: error estándar

Como se puede observar en la Tabla 22, en el análisis no ajustado en referencia a las variables sociodemográficas de los padres frente al NTE, resultaron de mayor relevancia la residencia materna, paterna y el consumo de tabaco por parte de la madre durante la gestación del participante. Sólo la residencia materna urbana por si misma alcanzó la significación estadística con una reducción de 1,5 millones en el NTE.

Tabla 22. Regresión lineal simple entre el NTE y variables socio-demográficas y estilo de vida de los padres

Variable	N	β	EE	P	IC 95%	
Residencia urbana materna	207	-1,48	1,22	0,050	-2,18	-1,00
Residencia urbana nacimiento del padre	189	-1,00	1,00	0,148	-1,00	1,00
Consumo de tabaco de la madre durante la gestación del participante	15	-1,16	1,15	0,296	-1,51	1,14

EE: error estándar

En la Tabla 23 se muestra el análisis no ajustado de las variables urológicas y seminales frente al NTE. Resultaron con mayor relevancia el volumen testicular, la presencia de aglomeraciones, quistes e hidrocele, así como el tiempo de abstinencia. De entre ellas, no alcanzaron una asociación estadísticamente significativa la variable dicotómica del volumen del testículo derecho <12 ml, la presencia de hidrocele, la estación del año en la que se produjo la toma de muestras (verano u otoño) y el presentar un pH < 7,2. Las demás variables, incluidas el volumen del testículo derecho/izquierdo en ml y el pH, en su forma discreta, resultaron con reducciones importantes en cuanto a la magnitud y significación de su asociación.

Tabla 23. Regresión lineal simple entre el NTE y variables urológicas y seminales

Variable	N	B	EE	p	IC 95%	
Volumen: testículo izquierdo (ml)	261	1,05	1,02	0,005	1,02	1,09
testículo derecho (ml)	259	1,05	1,02	0,009	1,01	1,09
testículo izquierdo <12 (ml)	8	-4,74	1,60	0,001	-11,99	-1,87
testículo derecho <12 (ml)	7	-1,58	1,74	0,407	-4,71	1,88
Aglomeraciones	63	1,33	1,10	0,000	1,10	1,60
Quistes	8	-2,98	1,6	0,022	-7,60	-1,17
Hidrocele	2	3,41	2,56	0,192	-1,86	21,64
Estación del año	273	1,20	1,08	0,015	1,04	1,40
Primavera	74	-1,43	1,20	0,048	-2,05	-1,00
Verano	21	-1,18	1,35	0,582	-2,05	1,54
Otoño	133	1,12	1,18	0,482	-1,23	1,54
Invierno	46	1,47	1,24	0,073	-1,04	2,24
Abstinencia: horas	273	1,01	1,00	0,000	1,71	1,01
≥ 48 horas	254	2,11	1,19	0,000	1,51	2,95
pH (6,7 – 8,0)	273	-3,02	1,32	0,000	-5,18	-1,76
≥7,2	231	-1,40	1,25	0,131	-1,11	2,17

EE: error estándar

En las tablas 24 y 25 se muestran los resultados del análisis no ajustado entre el NTE y las variables relativas a la morfología espermática, considerando estas variables bien de manera continua (Tabla 24) o dicotómica (Tabla 25).

Tabla 24. Regresión lineal simple entre el NTE y morfología espermática

Variable	N	B	EE	P	IC 95%	
PEN	115	1,42	1,11	0,002	1,14	1,76
PEN≤ 4%	115	-3,52	1,45	0,001	-7,37	-1,68
PEA	115	-2,18	1,34	0,008	-3,88	-1,23
PCA	115	-29,59	5,10	0,040	-745,17	-1,18
PFA	115	-1,14	1,20	0,474	-1,63	1,26
PRC	115	1,48	1,17	0,014	1,08	2,01

EE: error estándar

Todas las variables consideradas, excepto el porcentaje de flagelos anormales (PFA), mostraron asociaciones estadísticamente significativas con el NTE,

Tabla 25. Regresión lineal simple entre el NTE y la morfología espermática*

Variable	N	B	EE**	P	IC 95%	
PEN	115	-5,35	3,51	0,010	-8,88	-3,22
PEA	115	4,58	3,53	0,050	2,73	7,69
PRC	115	-4,43	3,52	0,060	-7,41	2,79
PFA	115	3,55	3,53	0,310	-3,50	5,97
PCI	115	-5,18	3,51	0,010	-8,61	-3,12

*Bajo la mediana de cada porcentaje

**Error estándar

En las tablas 26 y 27 se presentan los resultados del análisis regresión lineal simple del NTE y las hormonas sexuales consideradas. Cuando los valores hormonales se incluyeron en el modelo de manera continua, sólo resultó asociada significativamente la hormona inhibina B, con un incremento de 1,6 millones en el NTE; sin embargo esta significación se pierde cuando la hormona se considera en su forma dicotómica referida a la mediana.

Tabla 26. Regresión lineal simple entre NTE y el perfil hormonal

Variable	n	B	EE*	p	IC 95%	
Inhibina B	250	1,57	1,24	0,038	1,02	2,40
SHBG	250	1,12	1,12	0,338	-1,12	1,41
FSH	250	-1,23	1,16	0,164	-1,65	1,09
LH	250	-1,14	1,18	0,455	-1,58	1,23
Testosterona	250	-1,13	1,19	0,476	-1,58	1,24

*EE: error estándar

En contra de lo esperado, la hormona que resultó menos relacionada con NTE fue la testosterona, con una significación mayor en su forma continua ($p=0,476$) que en su forma dicotómica ($p=0,706$). Además cuando se consideró en el modelo de manera continua evidenció una relación inversa, mientras que lo hizo de manera directa, es decir con un incremento en el NTE para los individuos con un nivel de testosterona menor a la mediana.

Tabla 27. Regresión lineal simple entre NTE y perfil hormonal*

Variable	N	B	EE**	P	IC 95%	
InhibinaB	249	-3,42	3,22	0,171	-4,77	3,01
FSH	249	2,81	3,22	0,853	-3,68	3,91
LH	249	2,98	3,29	0,631	-3,61	4,34
SVG	249	3,05	3,22	0,498	-3,38	4,25
Testosterona	249	2,90	3,22	0,706	-3,56	4,05

*Bajo la mediana

**EE: error estándar

En las tablas 28 y 29 se presenta el análisis bivalente para las variables del perfil lipídico en su forma continua y dicotómica (por encima y por debajo de la mediana), respectivamente. Se observó sólo una reducción marginalmente significativa para el caso del colesterol y los triglicéridos, y algo menos significativa para los LDL, pero de magnitud semejante que para los triglicéridos.

Tabla 28. Regresión lineal simple entre NTE y el perfil de lípidos

Variable	n	B	EE*	P	IC 95%	
Colesterol	147	-2,46	1,67	0,080	-6,78	1,12
Triglicéridos	147	-1,49	1,28	0,109	-2,45	1,09
HDL	147	1,07	1,29	0,786	-1,55	1,78
LDL	147	-1,54	1,44	0,233	-3,16	1,33

*EE: error estándar

Los HDL mostraron una asociación claramente no significativa. Para el caso de los lípidos en su forma dicotómica, sólo los triglicéridos presentaron una asociación significativa mostrando un incremento muy importante (4,58 millones) en valor de NTE ($p=0,029$) (Tabla 29).

Tabla 29. Regresión lineal simple entre NTE y el perfil de lípidos*

Variable	N	B	EE**	P	IC 95%	
Colesterol	147	3,10	3,46	0,584	-3,83	4,99
Triglicéridos	147	4,58	3,44	0,029	2,87	7,32
HDL	146	-2,88	3,46	0,810	-4,64	4,13
LDL	146	3,30	3,46	0,419	-3,60	5,31

**EE: error estándar,

*Bajo la mediana

Los resultados del análisis bivalente del NTE frente a la movilidad se muestra en la Tabla 30. Como se puede observar existe una asociación estadísticamente significativa entre el NTE y la movilidad. Entre las categorías de la movilidad que no resultaron asociadas significativamente estuvieron la movilidad tipo b y c, la cuales alcanzaron apenas una significación marginal en la dicotomización por debajo de la mediana, con un valor menor en la del tipo b ($p=0,132$). En el caso de la movilidad total, el segundo cuartil tampoco mostró una asociación significativa.

Las movilidades que presentaron las mayores magnitudes de cambio fueron, en cuanto a reducciones en el NTE de 8,8, 8,3, 6,62, 6,56 para el 1er cuartil de la movilidad total, las movilidades bajas a y a+b, seguidas de la movilidad tipo a, progresiva a+b y la total, respectivamente. Estas últimas por debajo de la mediana. Por otro lado, se asociaron positivamente en el mismo orden de mayor a menor el tercero y cuarto cuartiles, para la movilidad tipo a, con 5,4, 4,3, y 1,95 millones en el NTE cada uno.

Tabla 30. Regresión lineal simple entre NTE y la movilidad

Variable	N	B	EE**	p	IC 95%	
Movilidad						
Tipo a	272	1,95	1,1	0,000	1,63	2,33
Tipo b	272	1,24	1,19	0,213	-1,13	1,74
Tipo c	272	-1,2	1,2	0,323	-1,71	1,19
Tipo d	272	-3,28	1,21	0,000	-4,76	-2,26
Tipo a*	272	-6,62	3,16	0,000	-8,93	-4,90
Tipo b*	272	-3,46	3,19	0,132	-4,75	2,93
Tipo c*	272	-3,65	3,25	0,098	-5,18	2,87
Progresiva a+b*	272	-6,56	3,17	0,000	-8,85	-4,86
Total cuartiles	272	4,10	2,91	0,000	3,59	4,68
Total*	272	-6,35	3,17	0,000	-8,59	-4,70
1 ^{er} cuartil	272	-8,79	3,23	0,000	-12,32	-6,28
2 ^o cuartil	272	2,96	3,26	0,639	-3,56	4,22
3 ^{er} cuartil	272	5,40	3,29	0,000	3,72	7,86
4 ^o cuartil	272	4,33	3,27	0,012	3,01	6,22
Bajas a y a+b	272	-8,29	3,16	0,000	-11,17	-6,15

*Nivel bajo la mediana

**Error estándar

El análisis bivalente entre el NTE y la **presencia** de los plaguicidas OC se presenta en la Tabla 31. Se encontró una asociación estadísticamente

significativa, con una reducción de 4,25 millones en el NTE para el plaguicida endrín ($p=0,042$) y para el endosulfán sulfato, en este caso con una disminución de 4,74 millones en el NTE ($p=0,013$). También se observó una reducción de 3,75 millones para el plaguicida lindano, pero en esta ocasión no se alcanzó una significación estadística ($p=0,113$), al igual que ocurrió para p,p'-DDE, con una reducción de cerca de 3 millones en el NTE, pero con una de $p=0,875$. Por el contrario, La vinclozolina se asoció a un incremento de 4,6 millones en el NTE pero sólo cerca de la significación marginal ($p=0,100$).

Tabla 31. Regresión lineal simple entre NTE y la presencia de plaguicidas

Variable	N	B	EE*	P	IC 95%	
Aldrín	221	3,01	3,41	0,581	-3,83	4,69
Endrín	221	-4,25	3,28	0,042	-6,15	-2,94
Dieldrín	221	3,26	3,27	0,333	-3,26	4,70
Endosulfán I	221	3,43	3,43	0,235	-3,41	5,42
Endosulfán II	221	-3,27	3,30	0,346	-4,79	3,32
Endosulfán diol	221	2,82	3,81	0,556	-5,10	5,47
Endosulfán éter	221	2,96	3,28	0,801	-3,62	4,29
Endosulfán lactona	221	-2,79	3,45	0,951	-4,48	4,24
Endosulfán sulfato	221	-4,74	3,26	0,013	-6,78	-3,31
o,p'-DDT	221	-4,04	3,43	0,197	-6,38	2,88
p,p'-DDT	221	3,13	3,28	0,789	-3,41	4,52
p,p'-DDE	221	-2,90	4,33	0,875	-7,26	6,40
o,p'-DDD	221	-3,09	3,30	0,390	-4,53	3,50
Lindano	221	-3,75	3,29	0,113	-5,47	2,88
Vinclozolina	221	4,60	4,23	0,100	-3,84	10,99
Hexaclorobenceno	221	3,66	3,43	0,289	-3,19	5,78
Mírex	221	-2,82	3,30	0,712	-4,13	3,84
Metoxicloro	221	-2,88	3,28	0,754	-4,18	3,72

*EE: error estándar

Los resultados del análisis bivalente entre el NTE y la concentración de los diferentes plaguicidas OC se presenta en la Tabla 32. Sólo se observó una

asociación significativa para el caso del endosulfán sulfato, en el mismo sentido que cuando se consideró su presencia en las muestras biológicas, con una reducción, en esta ocasión de 1,23 millones ($p=0,009$). La concentración del p,p'-DDE nuevamente presentó una reducción de 1,03, pero en este caso resultó significativamente asociada, Por último, la vinclozolina también se observó una tendencia al incremento, pero tampoco fue estadísticamente significativa ($p=0,536$).

Tabla 32. Regresión lineal simple entre NTE y la concentración de plaguicidas OC

Variable	N	B	EE	p	IC 95%	
Aldrín	213	-1,04	1,10	0,702	-1,24	1,16
Endrín	213	1,11	1,10	0,255	-1,08	1,34
Dieldrín	213	1,12	1,11	0,252	-1,09	1,37
Endosulfán I	213	1,08	1,10	0,420	-1,11	1,29
Endosulfán II	213	1,21	1,28	0,447	-1,35	1,98
Endosulfán diol	213	-1,03	1,07	0,719	-1,18	1,12
Endosulfán éter	213	1,04	1,06	0,504	-1,09	1,18
Endosulfán lactona	213	-1,01	1,06	0,855	-1,14	1,11
Endosulfán sulfato	213	-1,23	1,08	0,009	-1,43	-1,05
o,p'-DDT	212	-1,14	1,22	0,523	-1,69	1,31
p,p'-DDT	212	1,11	1,08	0,166	-1,05	1,29
p,p'-DDE	212	-1,11	1,13	0,387	-1,42	1,15
o,p'-DDD	213	-1,03	1,09	0,772	-1,22	1,16
Lindano	213	-1,03	1,12	0,824	-1,28	1,21
Hexaclorobenceno	213	1,10	1,09	0,278	-1,08	1,32
Vinclozolina	213	1,07	1,12	0,536	-1,16	1,33
Metoxicloro	213	-1,07	1,09	0,477	-1,27	1,12
Mírex	213	-1,19	1,14	0,185	-1,55	1,09

EE: error estándar

4.3.2 Modelos de regresión lineal múltiple entre NTE y plaguicidas organoclorados.

4.3.2.1 Primer modelo final entre NTE y la concentración de los plaguicidas organoclorados.

El primer modelo final o modelo ajustado para el NTE incluyó las variables mencionadas en el apartado anterior en la misma forma en que se han descrito y fue desarrollado considerando la concentración de los 18 plaguicidas OC, expresada en ng/ml, en forma cuantitativa continua y con las variables predictoras en su forma continua, ordinal, dicotómica o policotómica, según resultaran asociadas con una confiabilidad del 95%.

En este primer modelo del NTE que se presenta en la Tabla 33, se incluyó la información correspondiente a un grupo 79 jóvenes. La variabilidad del NTE fue explicada en un 66%, con una R^2 ajustada del 60%, lo cual refleja la bondad del ajuste. Además fue el modelo más parsimonioso, ya que explica el mayor grado de variabilidad del NTE con un mínimo de variables explicativas incluidas.

Tabla 33. Modelo lineal final entre NTE ajustado y la concentración de plaguicidas organoclorados

Variable	B	EE	P	IC 95%	
Abstinencia	1,02	1,00	0,000	1,02	1,03
Estación del año	-1,69	1,17	0,001	-2,29	-1,25
Uso de antibióticos	-3,47	1,53	0,005	-8,11	-1,49
Escolarización	2,20	1,31	0,004	1,29	3,75
Trabajo remunerado	2,71	1,52	0,031	1,17	6,27
Aglomeraciones	1,56	1,13	0,001	1,22	2,00
Testosterona*	-2,51	1,50	0,026	-5,65	-1,12
Flagelos anormales %*	-1,89	1,16	0,000	-2,54	-1,40
Aldrín*	-2,09	1,32	0,010	-3,64	-1,20
Endosulfán sulfato*	-4,46	1,49	0,000	-9,84	-2,03
p,p'-DDT*	-1,95	1,21	0,001	-2,87	-1,33
p,p'-DDE*	4,59	1,41	0,000	2,30	9,14
Constante	438,36	5,42	0,001	15,01	12802,14

*Logaritmo neperiano

En este primer modelo para el NTE se han considerado variables que presentaron una significación estadística $p < 0,05$. Por ejemplo, la abstinencia (en horas) está directamente relacionada con NTE, con un incremento de 1,02 millones en el NTE por cada unidad de cambio (horas). La misma variable en su forma lineal y dicotomizada en < 48 horas o más, presentó incrementos significativos de 1,01 y 2,11 millones, respectivamente, ($p < 0,001$) en el análisis de regresión lineal simple.

La estación del año, en su forma ordinal, primavera, verano, otoño e invierno, fue también un predictor importante ($p < 0,001$), con un decremento de cerca de 1,7 millones de espermatozoides por unidad de cambio. La estación del año de recogida de la muestra mostró ya desde el análisis de regresión lineal simple asociaciones con incrementos significativos de 1,20 millones de espermatozoides por cambio de estación de primavera a invierno ($p = 0,015$).

El uso de antibióticos se mantuvo en este primer modelo final como un determinante importante del NTE con una reducción de casi 3,5 millones de espermatozoides ($p < 0,005$).

En lo que se refiere al nivel de estudio de los participante en el estudio, ya en el análisis bivalente esta variable mostró por sí misma una asociación estadísticamente significativa, tanto en la variable policotómica considerando tres categorías (primarios, secundarios y universitarios) con un incremento de 1,6 millones por unidad de cambio ($p = 0,009$), o como variables “dummy”, donde categoría de estudios primarios se asoció a una reducción de 3,2 millones de espermatozoides ($p = 0,005$). Por otra parte, contar con estudios universitarios se relacionó con un incremento de 1,68 ($p = 0,044$); mientras que el tener estudios secundarios mostró una reducción de 1,08 millones en el NTE aunque en este caso no fue estadísticamente significativa.

La ocupación de los participantes presentó sólo asociaciones cercanas a la significación estadística marginal, probablemente debido a que sólo 41 de los participantes refirieron realizar un trabajo remunerado. En este primer modelo final otro determinante importante del NTE fue el trabajo de los jóvenes (además de estudiar) que mostró un incremento de 2,7 millones en el NTE ($p < 0,03$).

En cuanto a la muestra de semen, la presencia de aglomeraciones en el análisis de regresión simple evidenció ya un incremento muy significativo en el NTE de 1,33 millones ($p=0,001$) y dicha asociación se mantuvo en este primer modelo final como un determinante importante del NTE pero con un incremento ligeramente mayor de 1,56 millones en el NTE.

Los niveles de inhibina B circulante mostraron, en el análisis no ajustado, un incremento significativo de 1,57 millones en el NTE por cada unidad de cambio (EE 1,24) ($p=0,038$). Sin embargo, esta asociación no se mantuvo en este primer modelo final. Por su parte la testosterona que en el análisis de regresión lineal simple no mostró asociación significativa con el NTE ($p=0,476$), fue incluida en el 1^{er} modelo final como determinante, y resultó asociado con una reducción significativa de más de 2,5 millones en el NTE ($p=0,026$).

Al igual que la testosterona, el PFA en el análisis no ajustado no mostró asociación, pero se mantuvo en el primer modelo final como un determinante con una reducción de cerca de 2 millones en el NTE. Ninguno de los otros parámetros de la morfología, a pesar de que en el análisis no ajustado resultaron asociados (PEN, PEA, PCA y PRC, con valores de $p=0,002$, $0,008$, $0,040$ y $0,014$, respectivamente) mantuvieron su significación en el 1^{er} modelo final.

Entre los plaguicidas OC, el Aldrín, que en el análisis de regresión lineal simple no mostró una asociación significativa, si lo hizo en el 1^{er} modelo final con una reducción de 2,1 millones de espermatozoides ($p<0,01$); algo parecido sucedió con el p,p'-DDT que no mostró una asociación significativa en el análisis de regresión simple, mientras que si lo hizo en el 1^{er} modelo final donde se asoció de una manera estadísticamente significativa, con una reducción de cerca de 2 millones en el NTE. Por su parte, el endosulfán sulfato, que en el análisis no ajustado mostró una reducción significativa de 1,23 millones en el NTE ($p=0,009$), se mantuvo en el modelo final pero con una reducción mucho más importante, casi 4 veces mayor (4,6 millones en el NTE). Por último, el p,p'-DDE, que en el análisis de regresión lineal simple no demostró una asociación significativa, lo hizo en el 1^{er} modelo final, asociado a un incremento de 4,6 millones en el NTE.

4.3.2.2 Segundo modelo final entre NTE y la concentración de los plaguicidas organoclorados.

Se presenta en la Tabla 34 el segundo modelo de regresión lineal múltiple para el cual se restringió a una significación estadística a $p \leq 0,10$, y que se identifica como 2º modelo final. Este modelo alternativo permite establecer algunas asociaciones muy interesantes.

Al igual que en el modelo anterior se ajustó con las concentraciones de los plaguicidas OC a partir de un modelo saturado (incluidas todas las variables medidas). Este modelo alcanzó un 72% de explicación de la variabilidad del NTE y presentó una R^2 ajustada de 63%, aunque el grupo de participantes se redujo a 71.

Tabla 34. 2º modelo final entre NTE y la concentración de plaguicidas organoclorados

Variable	Beta	EE	p	IC 95%	
Abstinencia horas	1,02	1,01	0,001	1,01	1,03
pH	-2,68	1,81	0,103	-8,83	1,23
Estación del año	-1,89	1,23	0,003	-2,83	-1,25
Uso antibióticos	-5,61	1,71	0,002	-16,37	-1,92
Escolaridad del joven	2,48	1,36	0,005	1,33	4,62
Consumo de tabaco de la madre en la gestación del participante	-1,81	1,28	0,020	-2,98	-1,10
Aglomeración	1,60	1,15	0,001	1,21	2,11
Trabajo remunerado del joven	5,90	1,70	0,002	2,02	17,16
Lípidos					
HDL*	4,42	2,26	0,074	-1,16	22,68
Hormonas					
Inhibina B*	2,04	1,54	0,104	-1,17	4,86
LH*	2,33	1,41	0,018	1,16	4,66
Testosterona*	-3,45	1,74	0,030	-10,54	-1,13
Morfología					
Cabezas anormales%*	-434,94	7,25	0,003	-23150,47	-8,17
Flagelos anormales%*	-3,16	1,25	0,000	-4,97	-2,01
Plaguicidas organoclorados					
Endrín*	-7,38	2,35	0,023	-40,82	-1,34
Endosulfán sulfato*	-2,83	1,60	0,031	-7,26	-1,10
p,p'-DDE*	2,12	1,39	0,027	1,09	4,10
Constante	7,47E+09	12522,47	0,020	44,72	1,25E+18

*Logaritmo natural o neperiano

En el 2º modelo, el tiempo de abstinencia, en horas, se mantuvo asociada en forma idéntica que para el modelo anterior, con un incremento de poco más de

un millón en el NTE por unidad de cambio ($p=0,001$). El pH mostró una reducción por cada unidad de cambio de 2,7 millones en el NTE, aunque con una significación marginal ($p=0,103$).

La estación del año se asoció a una reducción poco más acentuada que en el modelo anterior, alcanzando 1,9 millones de espermatozoides. El uso de antibióticos alcanzó una reducción de 5,6 millones en el NTE. La escolaridad de los jóvenes, clasificada en la forma descrita en el apartado de material y métodos, alcanzó los 2,5 millones de incremento en el NTE.

El hábito de fumar de la madre durante el embarazo del participante, se asoció a una reducción de 1,81 millones en el NTE, a pesar de que el análisis de regresión lineal simple no se encontraron diferencias significativas entre hijos de madres fumadoras o no fumadoras durante la gestación del joven.

La presencia de aglomeraciones mostró una asociación casi idéntica al modelo anterior, con un incremento cercano a 1,6 millones en el NTE ($p<0,001$).

Cuando los jóvenes refirieron realizar un trabajo remunerado presentaron una relación cercana al doble del modelo anterior, con 5,9 millones en el NTE.

En este modelo, los lípidos de alta densidad (HDL) se asociaron con un incremento cercano a 4,4 millones en el NTE, y un rango de 1,16 a 22,68 millones, pero con una significación estadística marginal ($p=0,074$).

Entre las hormonas, la inhibina B presentó un incremento de 2 millones en el NTE ($p=0,104$), y la LH un incremento de 2,33 millones. Sin embargo, la testosterona se asoció a un decremento de cerca de 3,5 millones en el NTE, 1 millón más que en el modelo anterior.

En relación a la morfología, el PFA también incrementó su reducción a cerca de 3,2, cerca del doble que en el primer modelo final y el PCA apareció asociado a un decremento de cerca de 435 millones en el NTE.

Finalmente, entre los OC, el endrín aparece asociado con el decremento más importante en el NTE, alcanzando cerca de 7,4 millones de espermatozoides. Por su parte, el endosulfán sulfato presentó un decremento cercano a 3 millones y el p,p'-DDE un incremento de poco más de 2 millones en el NTE, ambos

asociaciones estuvieron cercanas al 50% en comparación al primer modelo pero manteniendo el sentido de su efecto.

4.3.2.3 Primer modelo final entre NTE y la presencia de los plaguicidas organoclorados.

El primer modelo final o modelo ajustado para el NTE incluyó las variables mencionadas en el apartado anterior en la misma forma en que se han descrito y fue desarrollado considerando la presencia de los OC, (es decir, si fueron o no detectados por encima del límite de detección). Los datos se muestran en la Tabla 35. El modelo incluyó a 89 participantes y la variabilidad del NTE fue explicada en un 74%, con una R^2 ajustada del 67%. Estos valores implican un muy buen grado de explicación de la variabilidad del NTE y aparentemente representa un mejor ajuste. En comparación con el primer modelo, este incluyó 20 individuos más. No obstante, es necesario hacer notar que la clasificación categórica de las variables de exposición, la presencia o no de los plaguicidas OC, siempre resulta en una pérdida de información. A pesar de ello, el modelo incluye un grupo adicional de variables que representan determinantes importantes a tomar en cuenta en el momento de evaluar la explicación de la variabilidad del NTE.

Tabla 35. Primer modelo final entre NTE y la concentración de OC

Variable	BETA	ES	p	IC 95%	
IMC	-1,08	1,03	0,022	-1,15	-1,01
Escolaridad: primaria	-6,82	1,51	0,000	-15,46	-3,01
secundaria	1,19	1,50	0,665	-1,88	2,67
Volumen de testículos <12 ml	-4,61	1,70	0,005	-13,35	-1,60
Estación de año: verano	-2,53	1,58	0,046	-6,31	-1,02
otoño	-2,33	1,35	0,006	-4,24	-1,28
invierno	-2,83	1,55	0,020	-6,76	-1,18
Abstinencia: 1 ^{er} Cuartil	-4,05	1,34	0,000	-7,25	-2,26
2 ^o Cuartil	-1,80	1,33	0,041	-3,18	-1,02
3 ^{er} Cuartil	-2,08	1,32	0,010	-3,62	-1,20
pH	-2,95	1,51	0,011	-6,73	-1,29
Movilidad a y ab bajas	-2,44	1,26	0,000	-3,87	-1,54
Morfología					
PEN**	1,27	1,10	0,018	1,04	1,55
PCI**	1,45	1,14	0,007	1,11	1,89
PFA*	-1,60	1,15	0,002	-2,13	-1,20
Plaguicidas organoclorados					
Endrín	-1,60	1,23	0,024	-2,40	-1,06
DDE	4,61	1,72	0,006	1,56	13,65
Vinclozolina	6,05	1,77	0,002	1,93	18,97
Constante	316896,40	23,29	0,000	594,37	169000000,00

Este primer modelo final se incluyó el IMC que mostró una reducción de casi 1,1 millones de espermatozoides en el NTE por unidad de cambio ($p=0,022$).

Contar sólo con estudios primarios produjo la mayor reducción (7 millones) en el NTE, mientras que los jóvenes con nivel de estudios secundarios, presentaron también una tendencia a la reducción, aunque en este caso no alcanzó la significación estadística. Para la variable educación, tener estudios universitarios fue considerada el nivel de referencia.

Un volumen testicular menor a 12 ml se asoció a una reducción significativa de 4,6 millones de espermatozoides ($p=0,005$).

La estación de recogida de la muestra mostró que el verano suponía una reducción significativa de más de 2,5 millones; reducción que para el otoño fue ligeramente menor (2,3 millones). La disminución para las muestras recogidas en invierno fue mayor (2,8 millones). La estación de referencia fue la primavera.

La abstinencia en horas, reclasificada en cuartiles, mostró para el primer cuartil la reducción de mayor magnitud y más significativa, alcanzando los 4 millones en el NTE; mientras que para el 2º y 3º cuartil fueron aproximadamente de la mitad en magnitud, pero también significativas ($p=0,041$ y $p=0,010$, respectivamente). El 4º cuartil fue utilizado como nivel de referencia.

El pH mostró una reducción significativa de cerca de 3 millones en el NTE por unidad de incremento en el pH ($p=0,011$).

La movilidad [a y a+b bajas ($a < 25\%$ y $a+b < 50\%$)] mostró una reducción de cerca de 2,5 millones en el NTE, con la mayor significación estadística ($p=0,000$).

En cuanto a la morfología, el porcentaje de formas normales (PEN) y el de crestas intermedias (PCI), mostraron incrementos significativos de 1,27 y 1,45 millones en el NTE, respectivamente. El PFA mostró nuevamente una relación inversa y significativa con un decremento de 1,6 millones en el NTE ($p=0,002$).

Por último, sólo 3 de los plaguicidas OC quedaron finalmente incluidos en este modelo; el endrín con una reducción significativa de 1,6 millones en el NTE ($p<0,024$), y el DDE y la vinclozolina con un incremento de 4,6 y 6,1 millones en el NTE, ($p=0,006$ y $p=0,002$) respectivamente.

4.3.3 Modelos de regresión logística múltiple para el NTE

Los modelos de regresión logística múltiple fueron construidos para la variable del NTE en dos formas. En primer lugar, el NTE fue clasificado en dos categorías, aquellos individuos que presentaran una cantidad menor a 40 millones en el NTE y los que presentaran un nivel mayor o igual a esta cifra. En segundo lugar, esta variable fue clasificada estableciendo como punto de corte 20 millones en el NTE.

Una tercera variable también analizada por regresión logística múltiple fue la concentración de espermatozoides (CE), clasificada utilizando como punto de corte, 20 millones de espermatozoides/ml, con objeto de seguir las recomendaciones de OMS, anteriores a la actualización del 2010.

Para llevar a cabo el análisis primero se construyeron los modelos de regresión logística incluyendo los determinantes que hubieran resultado asociados en los modelos de regresión lineal múltiple. Esto constituyó el primer acercamiento para evaluar la oportunidad relativa (OR) (“odds ratio”) de los determinantes del NTE en forma categórica, y corresponde a uno de los dos modelos logísticos propuestos. A continuación se presenta un modelo de regresión logística múltiple construido a partir de un modelo saturado.

4.3.3.1 Primer modelo final de regresión logística múltiple entre NTE < 40 millones y plaguicidas organoclorados

Para construir este 1^{er} modelo de regresión logística, que se muestra en la Tabla 36, se partió del 1^{er} modelo lineal para la concentración de los OC. Las variables fueron introducidas, en principio, en forma categórica, pero debido a que el análisis de regresión logística permite ingresar las variables en su forma continua, para algunas variables se hizo así; sin embargo, la mayoría de las variables fueron introducidas en los modelos en su forma dicotómica, policotómica o como variables “dummy”. El modelo incluyó a 88 participantes y la variabilidad del NTE fue explicada con una pseudo R^2 del 67%.

Tabla 36. Primer Modelo de regresión logística múltiple entre NTE <40 millones y la presencia de plaguicidas organoclorados

Variable	OR	EE	p	IC 95%	
IMC					
< 20	2,4	12,2	0,866	0,00	55572,09
≥25 y <30	14,5	27,0	0,151	0,38	557,91
≥30	4070,6	16543,0	0,041	1,41	11700000,00
Primaria	141,1	302,6	0,021	2,11	9437,46
Testículo <12	0,4	3,7	0,922	0,00	22500000,00
Estación del año					
Verano	4252,3	20241,5	0,079	0,38	47900000,00
Otoño	329,4	1157,0	0,099	0,34	321499,30
Invierno	0,4	1,6	0,821	0,00	765,68
Abstinencia					
1 ^{er} cuartel	2481,3	7618,4	0,011	6,04	1019020,00
2 ^o cuartel	2,6	5,2	0,625	0,05	125,68
3 ^{er} cuartel	0,2	0,5	0,583	0,00	102,25
Muestra de semen					
pH < 7,2	0,5	1,1	0,754	0,00	54,43
Movilidad a y ab bajas	41,1	84,2	0,07	0,74	2287,79
Morfología del semen					
PEN < 50	16,6	28,2	0,099	0,59	465,26
PCI < 50	78,4	183,3	0,062	0,80	7671,20
PFA < 50	1,4	1,9	0,827	0,09	21,22
Plaguicidas organoclorados					
p,p'-DDE	<0,001	0,0	0,039	0,00	0,75
Vinclozolina	<0,001	0,0	0,028	0,00	0,43

El IMC resultó incluido en el modelo lineal, considerando como nivel de referencia a los individuos que presentaran un IMC entre un valor de 20 y un valor de 25. La OR aumentó hasta 14,5 veces para quienes estuvieron un valor de IMC de 25 a <30, sin embargo esta categoría no alcanzó la significación estadística ($p=0,151$). Los jóvenes que presentaron un IMC de ≥ 30 , presentaron un incremento significativo con una OR de 4 mil veces de presentar menos de 40 millones de NTE ($p=0,041$).

Para el caso de la escolarización, contar sólo con estudios primarios, incrementó significativamente la OR en más de 140 veces ($p=0,021$).

Tomando como referencia a la primavera, las estaciones de recogida de la muestra de semen en verano y otoño, presentaron OR de más de 4000 y de 300

veces, respectivamente, de tener un NTE <40 millones, pero sólo alcanzaron una significación estadística marginal ($p=0,079$ y $0,099$).

En cuanto a la abstinencia en cuartiles, el primer cuartil incrementó significativamente la OR de presentar un NTE <40 millones en casi 2500 veces ($p=0,011$). El nivel de referencia fue el 4º cuartil.

Cuando el pH de la muestra fue menor a 7,2, mostró una tendencia protectora, pero no fue estadísticamente significativo ($p=0,754$).

La movilidad a y a+b bajas, elevaron la OR para presentar un NTE <40 millones de más de 41, aunque sólo de manera marginalmente significativa ($p=0,07$).

Para la morfología, presentar un PEN y un PCI por debajo de la mediana se asoció a incrementos en la OR de presentar un NTE <40 millones, de 17 y de más 78 veces, cada determinante, pero sólo en forma marginalmente significativa ($p=0,099$ y $0,060$, respectivamente), mientras que presentar un PFA menor a la mediana no presentó una asociación significativa ($p=0,827$).

De los plaguicidas OC, el endrín se asoció significativamente con el NTE <40 millones; sin embargo el p,p'-DDE y la vinclozolina resultaron ambos protectores para esta condición, con una OR de 0 en ambos casos ($p<0,001$).

4.3.3.2 Segundo modelo final de regresión logística múltiple entre NTE < 20 millones y los plaguicidas organoclorados

También se construyeron modelos de regresión logística partiendo del modelo saturado, es decir, tras la inclusión de todos los determinantes que fueron medidos. En este modelo de regresión logística múltiple se consideró la variable NTE como categórica estableciendo <20 millones como punto de corte (Tabla 37). El modelo incluyó a 203 participantes y la variabilidad del NTE fue explicada con una pseudo R^2 del 39%.

Tabla 37. 2° Modelo de regresión logística para NTE<20 millones

Variable	OR	EE	P	IC1	IC2
Células redondas	0,57	0,12	0,006	0,39	0,85
Aglomeración	0,25	0,16	0,031	0,07	0,88
Tamaño derecho <12 ml	17,74	26,55	0,055	0,94	333,47
Dieldrín	0,05	0,04	0,000	0,01	0,27
Endosulfán I	0,07	0,06	0,001	0,02	0,33
Endosulfán sulfato	5,92	4,51	0,020	1,33	26,35
o,p'-DDT	6,41	4,30	0,006	1,73	23,83
Hexaclorobenceno	0,23	0,15	0,028	0,06	0,85
Vinclozolina	0,02	0,02	0,001	0,00	0,19

Presencia o ausencia de plaguicidas organoclorados

Tanto la presencia de células redondas y como de aglomeraciones resultaron incluidas en este modelo como factores protectores, con una OR de alrededor de 0,6 y 0,3 ($p=0,006$ y $0,031$), respectivamente.

El volumen testicular, menor a 12 ml resultó asociado de forma marginalmente significativa con un incremento en la OR de presentar una concentración <20 millones en el NTE de casi 18 veces ($OR=17,7$, $p=0,055$).

Tanto la presencia de los plaguicidas dieldrín, endosulfán I, HCB como la vinclozolina, resultaron asociados como “factores protectores”, frente a la reducción en el NTE, de forma estadísticamente significativa para presentar un NTE menor a 20 millones, presentando valores de OR de 0,05, 0,07, 0,22 y 0,02 (todos con una $p<0,001$, excepto para la vinclozolina con una $p<0,05$). Por otra parte el endosulfán sulfato y el o,p'-DDT, se asociaron a aumentos en la OR de alrededor de 6 veces, OR de 5,9 y 6,4 ($p=0,020$ y $0,006$), respectivamente.

4.3.3.3 Tercer modelo final de regresión logística múltiple entre NTE < 40 millones y los plaguicidas organoclorados

El tercer modelo de regresión logística múltiple consideró la variable NTE como categórica estableciendo <40 millones como punto de corte, se muestra en la Tabla 38. El modelo incluyó a 203 participantes y la variabilidad del NTE fue explicada con una pseudo R^2 del 24%.

Tabla 38. Modelo de regresión logística para el NTE <40 millones

Variable	OR	EE	p	IC 95%	
Células redondas	0,64	0,09	0,001	0,49	0,84
Aglomeraciones	0,32	0,14	0,007	0,14	0,74
Dieldrín	0,20	0,10	0,001	0,08	0,52
Endosulfán I	0,30	0,15	0,014	0,11	0,79
Endosulfán sulfato	2,40	1,07	0,051	1,00	5,77
HCB	0,45	0,22	0,107	0,17	1,19
Vinclozolina	0,24	0,20	0,090	0,05	1,25

Presencia o ausencia de plaguicidas organoclorados

Las células redondas y las aglomeraciones resultaron nuevamente asociadas como factores protectores, con una OR de 0,64 y 0,32 ($p=0,001$ y $0,007$), respectivamente. El dieldrín, el endosulfán I, el HCB y la vinclozolina evidenciaron de nuevo un papel protector frente al riesgo de presentar un NTE menor a 40 millones, los dos primeros (dieldrín y endosulfán I) de forma significativa con OR de 0,20 y 0,30 ($p=0,001$ y $0,014$), respectivamente; y los dos últimos (HCB y vinclozolina) con una significación marginal; con valores de OR de 0,45 y 0,24 ($p=0,107$ y $0,090$), respectivamente.

El endosulfán sulfato nuevamente resultaron asociado con un incremento de alrededor de dos veces en el riesgo de presentar un NTE menor a 40 millones y de forma significativa $OR=2,4$ ($p=0,051$).

4.3.3.4 Cuarto modelo final de regresión logística múltiple entre NTE <40 millones y los plaguicidas organoclorados

Finalmente, se construyó el modelo de regresión logística partiendo del modelo saturado, es decir, tras la inclusión de todos los determinantes que fueron medidos. En este modelo de regresión logística múltiple se consideró la variable NTE como categórica estableciendo <40 millones como punto de corte (Tabla 39).

El modelo incluyó a **206** participantes y la variabilidad del NTE fue explicada con una pseudo R^2 del 21%.

Tabla 39. Modelo de regresión logística entre NTE <40 millones a partir del modelo saturado

Variable	OR	EE	p	IC 95%	
Células redondas	0,66	0,09	0,002	0,50	0,85
Aglomeraciones	0,35	0,14	0,009	0,16	0,76
Dieldrín	0,27	0,12	0,003	0,11	0,63
Endosulfán I	0,39	0,18	0,043	0,15	0,97
Endosulfán sulfato	2,67	1,10	0,017	1,19	5,99

En este modelo quedaron incluidas las siguientes variables: presencia de células redondas y de aglomeraciones, que resultaron ser factores protectores con OR de 0,66 y 0,35 ($p=0,002$ y $0,009$), respectivamente). También quedaron incluidos los plaguicidas dieldrín y endosulfán I que resultaron como factores protectores, presentando OR de 0,27 y 0,39, ($p=0,003$ y $0,043$), respectivamente. Endosulfán sulfato resultó un incremento en la OR de presentar un NTE <40 millones de espermatozoides, cercano a 2,7 veces, OR = 2,67 ($p=0,017$).

4.3.3.5 Quinto modelo final de regresión logística múltiple entre CE <20 millones y los plaguicidas organoclorados

Entre las variables indicadoras de la calidad seminal, específicamente del NTE, está la clasificación recomendada por la OMS de presentar una CE <20 millones/ml de espermatozoides. Por ello, se construyó un modelo de regresión logística múltiple para analizar los factores predictores de esta variable (Tabla 40). El modelo incluyó a 88 participantes y la variabilidad del NTE fue explicada con una pseudo R^2 del 57%.

La OR para las primeras dos categorías del IMC se redujo más del 50% respecto al modelo anterior, y aunque tal sólo se alcanzó la significación estadística en el caso de tener un IMC igual o mayor a 30, esta condición suponía un incremento significativo en la OR para presentar una CE < 20 millones de más de 277,6 ($p=0,018$).

La variable educación también resultó ser un determinante importante. El contar sólo con estudios primarios resultó en un incremento significativo en la OR para una CE <20 millones de 38,5 veces ($p=0,031$).

Tabla 40. Modelo de regresión logística para una CE <20 millones/ml

Variable	OR	EE	P	IC 95%	
IMC < 20	1,04	2,60	0,989	0,01	142,76
IMC ≥ 25 y <30	6,21	8,36	0,175	0,44	86,90
IMC ≥ 30	277,58	662,68	0,018	2,58	29886,89
Estudios Primarios	38,45	65,24	0,031	1,38	1069,17
Testículo <12	0,87	8,98	0,989	0,00	513000000,00
Estación del año:					
Verano	5433,81	18403,11	0,011	7,12	4148912,00
Otoño	137,93	282,82	0,016	2,48	7673,06
Invierno	0,36	1,02	0,718	0,00	90,23
Abstinencia cuartiles					
1 ^{er} cuartil	110,35	232,40	0,026	1,78	6846,08
2 ^o cuartil	7,51	11,83	0,201	0,34	164,81
3 ^{er} cuartil	0,38	0,70	0,600	0,01	14,53
Movilidad a y a+b bajas	22,72	30,13	0,019	1,69	305,58
Morfología					
PEN <50	20,28	27,66	0,027	1,40	293,71
PCI <50	38,50	67,25	0,037	1,26	1180,92
PFA <50	0,13	0,17	0,121	0,01	1,72
Plaguicidas					
organoclorados	0,06	0,11	0,122	0,00	2,15
p,p'-DDE	<0,001	0,00	0,025	0,00	0,41
Vinclozolina					

Por otra parte, las estaciones del año, verano y otoño, se asociaron con incrementos significativos en el valor de OR, de cerca de 5500 veces el primero y de 140 veces el segundo ($p=0,016$ y $0,011$).

La abstinencia en el primer cuartil fue asociada a un incremento significativo, $p=0,026$ (OR de más de 110 veces), de presentar una concentración de espermatozoides <20 millones/ml; los niveles de abstinencia en el 2^o y el 3^{er} cuartil no presentaron asociaciones significativas.

La movilidad baja, como fue descrita para a y a+b, se asoció a un incremento en el riesgo de presentar una concentración <20 millones/ml de espermatozoides de casi 23 veces (OR=22,72, $p=0,019$).

El presentar un PEN y un PCI, menores a la mediana, se asoció significativamente a incrementos en la OR de presentar una CE menor a 20 millones/ml de semen de poco más de 20 y de cerca de 40 veces, respectivamente ($p=0,027$ y $0,037$); mientras que el presentar un PFA menor a la mediana, sólo presentó una significación marginal.

Respecto a los plaguicidas, sólo vinclozolina, presentó una asociación estadísticamente significativa, evidenciando su actividad como un factor de protección para la concentración de espermatozoides <20 millones/ml $OR=0,00$ ($p=0,025$).

4.4 Análisis de regresión lineal simple entre el NTEM, los plaguicidas organoclorados y sus determinantes.

Las tablas 41 a 50 muestran los resultados más relevantes del análisis de regresión lineal simple para el NTEM y sus principales determinantes antropométricos, sociodemográficos, de estilo de vida y de exposición, las cuales fueron seleccionadas porque resultaron relacionadas en el análisis de regresión simple con al menos un 20% de explicación de la variable resultado, o bien por haber sido descrita en la literatura como factores asociados a la calidad seminal.

Se muestran los resultados más significativos del análisis de regresión lineal simple (análisis no ajustado), considerando los 18 OC tanto en frecuencias como cuantificados en ng/ml de suero, de acuerdo a lo descrito en la Sección de Material y Métodos. En términos generales se procedió de la misma forma descrita en el apartado anterior para la variable de resultado NTE.

Por la relevancia de los resultados observados, incluimos las reclasificaciones de la variable dicotómica para aquellos que presentaron un número <40 millones en el NTEM, que se estimó como una variable equivalente a la recomendada de OMS para el NTE <40 millones. También se incluye la correspondiente a un NTEM <20 millones.

4.4.1 Análisis de regresión lineal simple para el NTEM y sus determinantes.

En la Tabla 41 se presenta el análisis de regresión lineal simple para los determinantes del NTEM.

A pesar de que el rango de edad fue estrecho (19 a 23 años de edad), el análisis bivalente indicó un incremento marginalmente significativo de 1 millón en el NTEM por cada año más de edad. El IMC mostró una relación inversa con el NTEM, con una reducción de también 1 millón por unidad de cambio, pero tampoco estadísticamente significativa. Cuando el IMC se clasificó en categorías siguiendo criterios de la OMS, no se lograron asociaciones estadísticamente significativas.

En cuanto a la percepción del estado de salud por parte de los jóvenes, las categorías muy buena y buena, mostraron asociaciones de diferente signo con NTEM, pero sólo se acercaron a la significación estadística marginal; la primera con un incremento de más de 1,3 millones y la segunda con un decremento de casi la misma magnitud ($p=0,110$ y $p=0,123$), respectivamente, ya sea como variable ordinal o en cualquiera de sus categorías.

En el análisis bivalente, haber tenido paperas no se asoció significativamente con el NTEM.

El consumo de antibióticos se asoció de manera marginalmente significativa con una reducción de 1,8 millones en el NTEM. El consumo de antivirales, resultó asociado con alta significación estadística a una importante reducción de cerca de 72 millones en el NTEM ($p<0,001$). Sin embargo hay que indicar que tan sólo fue citado por un individuo.

Tabla 41. Regresión lineal simple entre NTEM y variables antropométricas, sociodemográficas y del estilo de vida

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Edad	272	1,08	1,05	0,100	-1,01	1,17
IMC	262	-1,05	1,03	0,100	-1,12	1,01
<25	186	1,27	1,23	0,241	-1,18	1,91
≥25 a <30	68	-1,30	1,27	0,224	-1,97	1,17
≥30	8	1,00	1,72	0,994	-2,89	2,91
Salud general	252	1,32	1,20	0,120	-1,89	1,08
Muy buena	90	1,36	1,2	0,110	-1,07	1,98
Buena	164	-1,34	1,2	0,123	-1,95	3,78
Mala	4	-1,12	2,1	0,897	-4,72	3,78
Tuvo Paperas,	26	1,23	1,33	0,468	-1,42	2,15
Consumo de: Antivirales	1	-71,88	4,17	0,000	-1198,34	-4,31
Antibióticos	15	-1,78	1,40	0,090	-3,45	1,09
Nivel de estudios	257	1,40	1,23	0,110	-1,08	2,10
Primarios	10	-2,42	1,64	0,073	-6,33	1,09
Secundarios	17	-1,05	1,44	0,898	-2,15	1,96
Universitarios	230	1,44	1,35	0,231	-1,26	2,59
Residencia urbana: materna	206	-1,60	1,25	0,040	-2,49	-1,02
nacimiento del padre	189	-1,40	1,23	0,100	-2,09	1,07
Consumo de tabaco: Cigarros/día	86	-1,03	1,02	0,080	-1,07	1,00
Consumo de hachís	56	-1,38	1,24	0,150	-2,12	1,12
Estación del año:	271	1,23	1,09	0,017	1,04	1,45
Primavera	74	-1,59	1,22	0,114	-2,36	-1,07
Verano	21	1,17	1,41	0,647	-1,69	2,32
Otoño	133	1,09	1,20	0,631	-1,31	1,56
Invierno	46	1,51	1,257	0,087	-1,06	2,42
Abstinencia: Horas	272	1,01	1,00	0,000	1,01	1,01
>48 horas	254	2,34	1,21	0,000	1,61	3,41
pH	272	-3,51	1,36	0,000	-6,45	-1,91
1-14	231	-1,55	1,29	0,085	-1,06	2,54
< 7,2						

EE: error estándar

El nivel de estudios como variable ordinal resultó asociada a un incremento de 1,4 millones en el NTEM, con una significación cercana a la marginal ($p=0.073$). Cuando el nivel de estudios se analizó en las tres categorías (primarios, secundarios y universitarios), sólo los estudios primarios mostraron una reducción marginalmente significativa de cerca de 2,5 millones en el NTEM ($p=0,073$).

La residencia en ámbito urbano por parte de los progenitores supuso una reducción de alrededor de 1,5 millones en el NTEM, pero sólo la característica materna alcanzó la significación estadística ($p=0,040$).

El consumo de tabaco mostró una reducción marginalmente significativa, con una reducción de 1,03 en el NTEM ($p=0,080$).

En cuanto a la estación del año, sólo en su forma ordinal se asoció de manera significativa, con un incremento de primavera a invierno de 1,23 millones en el NTEM ($p=0,017$). Cuando se consideraron las cuatro estaciones del año como variables “dummy”, sólo el invierno mostró una relación marginalmente significativa, con un incremento de 1,51 millones en el NTEM ($p=0,085$).

La variable abstinencia en horas considerada tanto en continuo como clasificada dicotómica, estableciendo como punto de corte las 48 horas, mostró asociaciones significativas ($p<0,001$), con incrementos de 1 y más de 2 millones en el NTEM, respectivamente.

El pH, como variable discreta y clasificada en $<7,2$ o más, mostró en el primer caso una asociación significativa con una reducción de 3,5 millones en el NTEM ($p<0,001$), y en el segundo una reducción de menos de la mitad 1,55, pero con una significación estadística marginal ($p=0,085$).

En la tabla 42 se muestran los resultados del análisis bivalente de la exploración urológica y su relación con el NTEM. El volumen testicular mostró una asociación estadísticamente significativa, con un incremento de poco más de un millón en el NTEM ($p=0,010$). Cuando el volumen testicular se consideró por encima o debajo los 12 ml, tener testículos de poco volumen supuso una reducción de 1,7 millones en el NTEM ($p=0,005$). Por su parte, la consistencia de los testículos no mostró ninguna asociación significativa. Sin embargo, la presencia de quistes, una licuefacción total, y la viscosidad ordinal mostraron reducciones significativas de 3,2, 2,1 y 1,2 millones en el NTEM ($p=0,030$, $p=0,050$, $p=0,049$), respectivamente. Mientras que la presencia de células redondas y aglomeraciones, mostraron una asociación positiva, con incrementos significativos de 1,08 y 1,34 en el NTEM ($p<0,001$ y $p=0,010$), respectivamente.

Tabla 42. Regresión lineal simple entre el NTEM y la exploración urológica

Variable	n	B	EE	p	IC 95%	
Volumen: Testículo izquierdo	260	1,06	1,02	0,010	1,02	1,10
Testículo derecho	258	1,05	1,02	0,010	1,01	1,10
<12 Testículo izquierdo	8	-1,70	1,21	0,005	-13,06	-1,60
Consistencia: Ambos testículos	6	1,35	2,40	0,730	-4,17	7,59
Testículo izquierdo	4	1,64	1,65	0,330	-1,64	4,42
Testículo derecho	2	2,62	2,12	0,200	-1,67	11,50
Presencia de: Quistes	8	-3,21	1,70	0,030	-9,10	-1,13
Hidrocele	2	4,10	2,87	0,180	-1,94	32,61
Licuefacción	17	-2,11	1,45	0,050	-4,37	-1,01
Viscosidad	63	-1,22	1,11	0,049	-1,49	1,00
Células redondas	16	1,08	1,03	0,000	1,02	1,13
Aglomeraciones	63	1,34	1,11	0,010	1,09	1,66

EE: error estándar

Las tablas 43 y 44 muestran el análisis bivalente entre el NTEM y la morfología espermática. En la tabla 43 se consideran las variables como continuas y en la tabla 44, como categóricas, clasificadas por debajo de la mediana de los porcentajes. Todas las variables presentaron algún tipo de asociación, salvo para el caso del PFA, que ni como variable continua, ni como categórica presentó asociaciones significativas en el análisis bivalente.

Tabla 43. Regresión lineal simple entre NTEM y la morfología espermática

Variable	N	B	EE	p	IC 95%	
PEN	114	1,62	1,13	0,000	1,28	2,05
PEA	114	-2,98	1,38	0,000	-5,60	-1,59
PCA	114	-97,46	6,03	0,010	-3430,36	-2,77
PCI	114	1,52	1,19	0,020	1,08	2,15
PFA	107	-1,21	1,22	0,340	-1,81	1,23

EE: error estándar

En su forma continua sólo el PEN y el PCI mostraron incrementos, de 1,6 y 1,5 millones en el NTEM ($p=0,000$ y $p=0,020$), respectivamente. Mientras que la asociación fue negativa en el caso de presentar un PEA y PCA, con decrementos de 3 y 97,5 millones en el NTEM ($p<0,001$).

Las variables de morfología espermática, en su forma dicotómica, mostraron un comportamiento semejante. Las variables PEN, PCI y PCA por debajo de la mediana mostraron reducciones de 7,0, 5,3 y 5,9 millones en el NTEM ($p=0,001$, $p=0,023$ y $p=0,008$), respectivamente; mientras que la variable PEA mostró un incremento de 5,8 millones en el NTEM ($p=0,012$). Presentar un PEN <4%, mostró un decremento significativo de 4,9 millones en el NTEM ($p=0,000$).

Tabla 44. Regresión lineal simple entre NTEM y la morfología espermática*

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PEN	114	-7.03	3.62	0.001	-12.41	-3.98
PEA	114	5.76	3.65	0.012	3.21	10.33
PCI	114	-5.34	3.65	0.023	-9.55	-2.98
PFA	114	3.57	3.67	0.364	-3.74	6.46
PCA	114	-5.94	3.64	0.008	-10.58	-3.34
PEN<4%	114	-4,93	1,51	0,000	-11,08	-2,19

*Referencia < mediana del porcentaje

EE: error estándar

El análisis bivalente para el NTEM y el perfil hormonal se muestra en las tablas 45 y 46. De la misma forma que para la morfología, primero se trataron las variables en su forma continua y luego como variables dicotómicas por encima y por debajo de sus medianas. En el primer caso, sólo la inhibina B, mostró un incremento significativo de 1,6 millones en el NTEM por unidad de cambio.

Tabla 45. Regresión lineal simple entre NTEM y el perfil hormonal

Variable	N	β	EE	p	IC 95%	
Inhibina b	247	1,60	1,27	0,050	1,01	2,55
SHBG	247	-1,29	1,28	0,310	-2,11	1,27
SHBG ²	247	-1,08	1,10	0,440	-1,30	1,12
FSH	247	-1,19	1,18	0,300	-1,64	1,16
LH	247	-1,30	1,24	0,220	-1,98	1,17
Testosterona	247	-1,24	1,31	0,440	-2,11	1,38

EE: error estándar

Como se puede ver en Tabla 46, los resultados del análisis bivalente del NTEM y las hormonas dicotomizadas, por debajo de la mediana, tampoco mostró

alguna asociación estadísticamente significativa frente a ninguna de las hormonas estudiadas.

Tabla 46. Regresión lineal simple entre NTEM y el perfil hormonal*

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Inhibina B	248	-3.31	3.28	0.301	-4.80	3.24
FSH	248	2.76	3.29	0.941	-3.89	4.00
LH	248	-2.87	3.36	0.797	-4.37	3.92
SHBG	248	3.23	3.28	0.364	-3.32	4.69
Testosterona	248	3.31	3.29	0.302	-3.25	4.81

*Perfil hormonal bajo y sobre la mediana. EE: error estándar

Los resultados del análisis bivariante entre el NTEM y el contenido de lípidos específicos se muestra en las tablas 44 y 45. Al igual que para los dos grupos de variables anteriores, también en este caso se trataron en su forma continua y como dicotómicas, por debajo y encima de la mediana.

Tabla 47. Regresión lineal simple entre NTEM y la concentración de lípidos específicos

Variable	n	β	EE	P	IC 95%	
Colesterol	146	-2,62	1,77	0,090	-8,08	1,17
Triglicéridos	146	-1,90	1,31	0,020	-3,26	-1,11
HDL	146	1,15	1,33	0,630	-1,52	2,00
LDL	146	-1,37	1,50	0,440	-3,05	1,63

EE: error estándar

Cuando las variables se trataron de manera continua, sólo los triglicéridos mostraron una relación estadísticamente significativa, con una reducción de 1,9 millones en el NTEM por unidad de cambio ($p=0,020$). El colesterol mostró la reducción más importante (2,6 millones) pero sólo alcanzó una significación marginal ($p=0,090$). Los lípidos de alta o de baja densidad no mostraron ninguna asociación significativa.

En el caso de las variables dicotómicas (Tabla 48), sólo los triglicéridos mantuvieron una asociación fuertemente significativa, en este caso de mayor magnitud, 5,8 millones en el NTEM por unidad de cambio ($p=0,004$).

Tabla 48. Regresión lineal simple entre NTEM y lípidos específicos*

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Colesterol	147	3,25	3,55	0,501	-3,84	5,50
Triglicéridos	147	5,76	3,52	0,004	3,45	9,60
HDL	146	-3,18	3,55	0,557	-5,39	3,94
LDL	146	3,32	3,55	0,455	-3,77	5,61

*Referencia <mediana

EE: error estándar

*Lípidos específicos bajo y sobre la mediana

El análisis bivalente entre el NTEM y la concentración de plaguicidas en suero se muestra en la Tabla 49.

Tabla 49. Regresión lineal simple entre NTEM y la concentración de plaguicidas organoclorados en suero (ng/ml)

Variable	N	B	EE	p	IC 95%	
Aldrín	211	-1,05	1,11	0,650	-1,29	1,17
Endrín	211	1,11	1,11	0,330	-1,11	1,37
Dieldrín	211	1,18	1,12	0,150	-1,06	1,47
Endosulfán I	211	1,07	1,11	0,530	-1,15	1,31
Endosulfán II	211	1,29	1,33	0,360	-1,35	2,26
Endosulfán diol	211	-1,03	1,08	0,710	-1,20	1,13
Endosulfán éter	211	1,03	1,07	0,720	-1,12	1,18
Endosulfán lactona	211	-1,02	1,07	0,780	-1,17	1,12
Endosulfán sulfato	211	-1,23	1,09	0,020	-1,47	-1,04
o,p'-DDT	212	-1,14	1,22	0,523	-1,69	1,31
p,p'-DDT	212	1,11	1,08	0,166	-1,05	1,29
p,p'-DDE	212	-1,11	1,13	0,387	-1,42	1,15
o,p'-DDD	213	-1,03	1,09	0,772	-1,22	1,16
Lindano	219	-1,44	1,24	0,090	-2,21	1,06
Vinclozolina	219	2,00	1,64	0,160	-1,33	5,31
HCB	219	1,30	1,30	0,320	-1,29	2,19
Metoxicloro	219	1,01	1,24	0,960	-1,50	1,54
Mírex	219	-1,04	1,24	0,850	-1,60	1,47

EE: error estándar

Como se puede observar sólo se evidenció una reducción significativa de 1,2 millones en el NTEM para el caso del endosulfán sulfato ($p=0,020$). El lindano mostró una reducción de 1,4 millones, pero fue sólo marginalmente significativa

($p=0,90$), mientras que el dieldrín y la vinclozolina mostraron incrementos de 1,2 y 2 millones en el NTEM, que no fueron estadísticamente significativos; ($p=0,150$ y $p=0,160$), respectivamente. Cabe también destacar que en el análisis no ajustado ni el o,p'-DDT ni el p,p'-DDE mostraron asociaciones significativas ($p=0,523$ y $0,387$, respectivamente).

Tabla 50. Regresión lineal simple entre NTEM y presencia de plaguicidas organoclorados

Variable	N	B	EE	p	IC 95%	
Aldrín	219	3,14	3,52	0,581	-3,93	5,23
Endrín	219	-4,23	3,38	0,042	-6,49	-2,76
Diendrín	219	3,34	3,36	0,333	-3,36	5,09
Endosulfán I	219	3,74	3,55	0,235	-3,35	6,33
Endosulfán II	219	-3,36	3,40	0,346	-5,23	3,42
Endosulfán diol	219	3,42	4,01	0,556	-4,64	7,33
Endosulfán lactona	219	2,76	3,58	0,951	-4,60	4,76
Endosulfán éter	219	2,87	3,38	0,801	-3,95	4,41
Endosulfán sulfato	219	-4,62	3,36	0,013	-7,01	-3,05
o,p'-DDT	219	-3,85	3,56	0,197	-6,56	3,26
p,p'-DDT	219	2,88	3,37	0,789	-3,92	4,40
p,p'-DDE	219	2,96	4,65	0,875	-7,20	8,52
p,p'-DDD	219	-3,30	3,40	0,390	-5,13	3,49
Lindano	219	-3,86	3,39	0,113	-5,98	2,96
HCB	219	3,62	3,56	0,289	-3,47	6,17
Metoxicloro	219	-2,91	3,38	0,754	-4,47	3,90
Mírex	219	-2,95	3,40	0,712	-4,58	3,89
Vinclozolina	219	6,28	4,51	0,100	-3,20	17,08

EE: error estándar

El análisis bivalente entre el NTEM y los plaguicidas OC detectados por encima del límite de cuantificación se muestra en la Tabla 50. Los únicos plaguicidas asociados significativamente fueron endrín y endosulfán sulfato, con reducciones de 4,2 y 4,6 millones en el NTEM ($p=0,042$ y $p=0,013$), respectivamente. Los compuestos o,p'-DDT, lindano y vinclozolina demostraron sólo asociaciones con significación marginal, los dos primeros con reducciones casi idénticas de más de 2,85 millones en el NTEM ($p=0,197$ y $p=0,113$) y el tercero con un incremento de 2 millones, y una significación ligeramente mayor ($p=0,100$). Aquí también se debe hacer notar que p,p'-DDE no mostró significación estadística alguna ($p=0,875$).

4.4.2 Modelos de regresión lineal múltiple entre el NTEM y la concentración de plaguicidas organoclorados

4.4.2.1 Primer modelo final de regresión lineal para el NTEM

El primer modelo final de regresión lineal múltiple entre el NTEM y la concentración de los plaguicidas OC seleccionados, expresados en ng/ml de suero, se muestra en la Tabla 51. En este modelo se incluyó la información correspondiente a 70 participantes y se obtuvo una R^2 del 65% de la variabilidad del NTEM, con una R^2 ajustada cercana al 60%.

Tabla 51. Primer Modelo Lineal Final entre NTEM y plaguicidas organoclorados (ng/ml)

Variable	B	EE ^e	p	IC 95%	
Abstinencia (hr)	1,03	1,00	0,000	1,02	1,04
Paperas	-4,22	1,69	0,008	-12,07	-1,47
Aglomeración	2,07	1,17	0,000	1,51	2,84
Estación ^p	-1,82	1,25	0,010	-2,85	-1,16
Colesterol*	-11,97	2,43	0,007	-70,87	-2,02
Testosterona*	-7,04	1,73	0,001	-21,17	-2,34
PFA*	-2,16	1,22	0,000	-3,20	-1,46
Endosulfán sulfato*	-4,33	1,66	0,005	-11,95	-1,57
p,p'-DDT*	-1,91	1,29	0,013	-3,17	-1,15
p,p'-DDE*	6,28	1,53	0,000	2,68	14,73
Constante	40,3x10 ⁷	157,86	0,000	160993,50	10,1x10 ¹¹

^e Error estándar

*logaritmo neperiano

** Raíz cuadrada

^pprimavera=1, verano=2, otoño=3 e invierno=4

Nota: Datos geométricos

Cada hora de abstinencia se asoció significativamente con un incremento de 1,03 millones en el NTEM ($p < 0,001$). Haber padecido paperas mostró una reducción en el NTEM de 4,22 millones ($p = 0,008$). La presencia de aglomeraciones mostró un incremento de 2,07 millones en el NTEM ($p < 0,001$).

La estación del año como variable ordinal, de primavera a invierno (1 a 4), mostró una reducción significativa en el NTEM de más 1,8 millones por unidad de cambio ($p=0,010$).

Entre los parámetros del perfil lipídico, el colesterol se asoció la mayor reducción en el NTEM, de aproximadamente 12 millones ($p=0,007$).

Del todas las hormonas consideradas en el perfil hormonal, sólo la testosterona mostró una asociación significativa, con una reducción de 7 millones en el NTEM ($p=0,001$).

En cuanto a la morfología, el PFA se asoció con una reducción de más de 2 millones en el NTEM ($p<0,001$).

Entre los plaguicidas OC seleccionados, la concentración sérica de endosulfán sulfato, p,p'-DDT y p,p'-DDE, se asociaron con el NTEM; los dos primeros con reducciones de 4 y 2 millones ($p=0,005$ y $0,013$, respectivamente), mientras que el p,p'-DDE se asoció positivamente con un incremento significativo de más de 6 millones en el NTEM ($p=0,001$).

4.4.2.2 Primer modelo final de regresión lineal entre el NTEM y la presencia de plaguicidas organoclorados.

El primer modelo final de regresión lineal múltiple entre el NTEM y la presencia de los plaguicidas OC, considerando los 18 plaguicidas seleccionados en el estudio, por encima del límite de cuantificación se muestra en la Tabla 52. Este modelo incluyó a 73 individuos y explicó el 78% de la variabilidad del NTEM y con una R^2 ajustada del 70%.

Tabla 52. Primer modelo final de regresión lineal múltiple entre NTEM y la presencia de plaguicidas organoclorados

Variable	B	EE	P	IC 95%	
Abstinencia (hr)	1,03	1,00	0,000	1,02	1,04
Presencia de:					
Paperas	-4,83	1,66	0,003	-13,29	-1,75
Aglomeraciones	2,11	1,14	0,000	1,62	2,75
Licuefacción total	-30,31	1,80	0,000	-98,92	-9,29
Consistencia de ambos testículos	109,50	3,99	0,001	6,81	1759,44
Estación del año ^p	-1,73	1,23	0,011	-2,62	-1,14
Lípidos					
Colesterol*	-8,19	2,21	0,011	-40,35	-1,66
Hormonas					
Inhibina B*	3,91	1,55	0,003	1,62	9,43
FSH*	1,82	1,31	0,029	1,07	3,11
SHBG**	-1,63	1,16	0,002	-2,22	-1,20
Morfología del semen					
PFN*	-1,99	1,19	0,000	-2,83	-1,41
Plaguicidas organoclorados					
Aldrín	2,09	1,47	0,063	-1,04	4,53
Dieldrín	-2,10	1,32	0,010	-3,68	-1,20
Endosulfán lactona	2,79	1,44	0,007	1,35	5,78
Endosulfán éter	-2,39	1,32	0,003	-4,16	-1,38
Endosulfán sulfato	-2,44	1,33	0,003	-4,36	-1,37
o,p'-DDT	2,19	1,38	0,019	1,15	4,17
p,p'-DDE	99,60	2,25	0,000	19,65	504,82
Lindano	1,81	1,32	0,036	1,04	3,16
Metoxicloro	-2,21	1,33	0,008	-3,92	-1,24
Constante	140,91	98,72	0,286	-71,31	1415793,00

^eError estándar

*logaritmo neperiano

** Raíz cuadrada

^pprimavera=1, verano=2, otoño=3 e invierno=4

Nota: Datos geométricos

La abstinencia en horas se mantuvo asociado también en este modelo, al igual que haber tenido paperas. La presencia de aglomeraciones también se asoció casi de manera idéntica que en el modelo anterior. Los incrementos fueron de más de 1 y 2 millones de espermatozoides móviles para la abstinencia en horas y la presencia de aglomeraciones (ambos con $p < 0,001$), mientras que haber tenido paperas se asoció a un decremento de más de 4,8 millones en el NTEM ($p = 0,003$).

La consistencia de ambos testículos se asoció a un incremento de cerca de 110 millones en el NTEM, ($p=0,001$). La estación del año, en el mismo sentido que en el modelo anterior, significó una ligera reducción de 1,73 millones en el NTEM, con idéntica significación ($p=0,011$). El colesterol se asoció a una reducción de más de 8 millones en el NTEM por unidad de cambio. Por último, la licuefacción total se asoció a un decremento de más de 30 millones en el NTEM ($p<0,001$).

De las hormonas, la inhibina B presentó un incremento de casi 4 millones en el NTEM por unidad de cambio ($p=0,003$). También resultaron asociadas la FSH y la SHBG, con incrementos de casi 4 y 2 millones en el NTEM ($p=0,029$ y $0,002$, respectivamente).

Como ocurrió para el caso de los modelos para el NTE, también resultó asociado el PFA, que mostró un decremento de alrededor de 2 millones en el NTEM ($p<0,001$).

Entre los plaguicidas OC presentes por encima del límite de cuantificación, aldrín, endosulfán lactona, o,p'-DDT, p,p'-DDE y lindano resultaron asociados a incrementos en el NTEM. Entre todos ellos, p,p'-DDE se asoció con el cambio más importante y significativo, concretamente un incremento de cerca de 100 millones en el NTEM y una $p<0,001$. Aldrín presentó una asociación marginalmente significativa ($p=0,063$) y endosulfán lactona, o,p'-DDT y lindano presentaron asociaciones significativas de $p=0,007$, $0,019$, y $0,036$, respectivamente. También, se observaron asociaciones negativas para algunos plaguicidas, con reducciones en el NTEM de 2,1, 2,4, 2,4 y 2,2 millones para el dieldrín, el endosulfán éter, el endosulfán sulfato y el metoxicloro ($p=0,010$, $0,003$, $0,003$, y $0,008$, respectivamente).

4.4.3 Modelos de regresión logística múltiple entre el NTEM y los plaguicidas organoclorados

Se han obtenido tres modelos de regresión logística múltiple, dos de los cuales fueron construidos a partir de los modelos de regresión lineal múltiple teniendo en cuenta la presencia y ausencia de los 18 plaguicidas seleccionados, y un tercer modelo construido a partir de un modelo saturado.

4.4.3.1 Primer modelo final de regresión logística múltiple entre el NTEM y los plaguicidas organoclorados

El primer modelo obtenido tras el análisis de regresión logística múltiple se muestra en la Tabla 53. Este modelo se construyó incluyendo 72 sujetos, obteniéndose una pseudo R^2 cercana del 49%. Se consideró como punto de corte un valor de NTEM de 40 millones de espermatozoides móviles.

La abstinencia en cuartiles mostró ser un factor protector directamente proporcional al incremento de un cuartil a otro, de 0,38, 0,04 y 0,01 para el segundo, tercero y cuarto cuartiles respectivamente, los dos últimos en forma significativa ($p=0,027$ y $0,004$).

Haber tenido paperas incrementó cerca de 16 veces el riesgo de tener <40 millones en el NTEM, sólo estuvo cerca de la significación marginal. La presencia de aglomeraciones resultó ser un factor protector $OR=0,03$ ($p=0,007$).

Tomando como referencia la primavera, las estaciones del año de verano y otoño presentaron un incremento, no significativo, de cerca de 20 y de más de 50 veces en el riesgo de presentar un NTEM menor a 40 millones, mientras que el invierno presentó un poco más de la mitad respecto al primero, pero con una menor significación estadística.

La presencia de un nivel de colesterol inferior a la mediana, se asoció de forma marginalmente significativa como un factor de protección $OR=0,63$, ($p=0,09$) para presentar un NTEM <40 millones.

Tabla 53. Primer Modelo Final de Regresión Logística Múltiple entre NTEM<40 y presencia de plaguicidas organoclorados

Variable	OR	EE	p	IC 95%	
Abstinencia 2º cuartil	0,38	0,45	0,413	0,04	3,91
Abstinencia 3 ^{er} cuartil	0,04	0,06	0,027	0,00	0,70
Abstinencia 4º cuartil	0,01	0,01	0,004	0,00	0,22
Presencia de:					
Paperas	15,81	28,24	0,122	0,48	523,91
Aglomeraciones	0,03	0,04	0,007	0,00	0,38
Licuefacción total	200,17	598,08	0,076	0,57	69938,25
Estación del año**					
Verano	19,74	50,92	0,247	0,13	3093,48
Otoño	52,37	135,55	0,126	0,33	8359,37
Invierno	11,52	42,90	0,511	0,01	16993,94
Colesterol*	0,63	0,64	0,651	0,09	4,60
Hormonas					
Inhibina*	1,47	1,75	0,746	0,14	15,17
FSH*	0,36	0,46	0,422	0,03	4,38
SHBG*	2,37	2,60	0,431	0,28	20,40
Morfología					
PFN*	0,03	0,05	0,011	0,00	0,46
Plaguicidas organoclorados					
Endosulfán lactona	0,15	0,22	0,200	0,01	2,70
Endosulfán sulfato	4,16	5,09	0,244	0,38	45,79
Metoxicloro	1,07	1,13	0,951	0,13	8,46

*<Mediana

** Nivel de referencia: primavera

La licuefacción total se asoció a un incremento del riesgo mayor a 200 veces; sin embargo este incremento no fue estadísticamente significativo.

Presentar un nivel por debajo de la mediana para las hormonas inhibina B, SHBG y FSH no se asoció de manera significativa con el NTEM presentar un nivel de NTEM <40 millones.

4.4.3.3 Segundo modelo final de regresión logística múltiple entre el NTEM y los plaguicidas organoclorados

Partiendo del modelo saturado se construyó el modelo de regresión logística múltiple que incluyó a un grupo de 74 jóvenes y presentó una pseudo R² de más del 50% (Tabla 54).

Tabla 54. Segundo Modelo logístico para NTEM<40 y plaguicidas organoclorados

Variable	OR	EE	p	IC 95%	
Abstinencia					
2º cuartil	2,69	3,19	0,405	0,26	27,59
3 ^{er} cuartil	0,13	0,15	0,072	0,01	1,20
4º cuartil	0,02	0,03	0,007	0,00	0,35
Presencia de:					
Paperas	247,02	558,22	0,015	2,95	20714,33
Aglomeraciones	0,02	0,03	0,002	0,00	0,26
Lípidos					
Colesterol*	385,80	1165,70	0,049	1,03	143968,40
Hormonas					
FSH*	0,27	0,20	0,074	0,06	1,14
Testosterona*	19,37	35,37	0,105	0,54	694,30
Morfología					
PFA<mediana	0,04	0,05	0,006	0,00	0,41
Plaguicidas organoclorados					
Endosulfán II	0,06	0,07	0,024	0,01	0,69
Endosulfán éter	6,94	7,03	0,056	0,95	50,52

La variable abstinencia se incluyó en cuartiles, pudiéndose apreciar un gradiente cada vez mas protector para presentar un NTEM <40 millones a medida que aumenta las horas de abstinencia, siendo estadísticamente significativa para el tercer y cuarto cuartiles, $p=0,011$ y $p=0,007$, respectivamente; con una OR de 0,13 y 0,02, para cada uno de ellos. Haber tenido paperas se asoció con una OR de 247 ($p=0,015$). La presencia de aglomeraciones mostró ser factor de protección para presentar un NTEM <40 millones, con una OR de 0,02 ($p=0,002$).

El presentar una concentración de colesterol por debajo de la mediana incrementó casi 386 veces la oportunidad relativa de presentar un nivel de NTEM por debajo de 40 millones ($p=0,049$).

La FSH se presentó como un factor de protección, con una OR de 0,27, marginalmente significativo ($p=0,074$); mientras que la testosterona se asoció con una OR de más de 19, pero con una significación marginal ($p=0,105$).

El PFA por debajo de la mediana mostró ser un factor de protección estadísticamente significativo, con una OR de 0,04 ($p=0,006$).

Endosulfán II y endosulfán éter mostraron efectos contrarios, el primero como factor protector con una OR de 0,06 ($p=0,024$), y el segundo como factor de

riesgo con una OR para presentar un NTEM <40 millones cercana a 7, con una significación estadística marginal ($p=0,056$).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En la mayoría de los países europeos el índice de natalidad ha caído de manera drástica, incluso por debajo del nivel de reemplazo generacional (Lutz 2006, UN 2007). En España, la natalidad se redujo en más de la mitad entre 1960 y 1990, pasando de 21,7 a 10,2 nacimientos por cada mil habitantes, lo que sitúa al país por debajo de la media de la Unión Europea. Este descenso se atribuye a los cambios en las condiciones sociales y económicas que se han producido durante los últimos años, entre los que se encuentran tanto el uso de anticonceptivos, como la incorporación de la mujer al mercado de trabajo que dificulta la compatibilidad entre actividad laboral y el cuidado de los hijos (Lutz 2006). Sin embargo, también se ha señalado que la disminución de la natalidad podría deberse a un deterioro en la facilidad para concebir (Andersen et al., 2008; Nyboe y Erb, 2006). De hecho, se asiste en muchos países europeos a un incremento en la demanda de técnicas de reproducción asistida por parte de la parejas que desean concebir y han tenido serias dificultades para lograrlo (Andersen et al., 2008; Nyboe y Erb, 2006). La responsabilidad del varón en este contexto parece ser cada vez más evidente dada la tendencia negativa de la salud reproductiva masculina, que abarca desde la reducción de la calidad del semen, al aumento en la incidencia de cáncer de testículo, pasando por el incremento en la incidencia de malformaciones del tracto reproductivo, como son criptorquidia e hipospadias (Skakkebaek et al., 2001).

La combinación final resultante es un escenario en el que el varón presenta una peor calidad seminal y la mujer accede a su primera maternidad en una edad en la que su fertilidad está reducida; la consecuencia es la prevista, mayor dificultad en la concepción, caída en los índices de natalidad y el consiguiente impacto personal, social y económico. Además, la dependencia en técnicas para lograr concebir y formar una familia tienen también consecuencias importantes en el orden social debido a que las posibilidades y los recursos son limitados en los sistemas de salud públicos y los costes de estos procedimientos situarán a las parejas menos favorecidas económicamente en desventaja para tener hijos. Una cuestión crucial dentro de este contexto es saber la contribución del varón al

problema y si realmente la calidad del semen de los jóvenes europeos es tan baja como para haber descendido por debajo del umbral para el cual la tasa de fertilidad se ve afectada.

También es cada más frecuente que se reconozca una asociación entre la función reproductiva masculina y el riesgo de padecer desórdenes cardiovasculares y metabólicos como son la obesidad abdominal, la diabetes tipo 2 y los trastornos cardiovasculares relacionados. A este respecto, la instauración del hipogonadismo masculino, entendido como niveles de testosterona por debajo de la normalidad, se presenta ya sea como una consecuencia o como un determinante de la afectación cardio-metabólica (Kupelian et al., 2008; Laughlin et al., 2008). Es cierto que la caída fisiológica de los niveles de testosterona dependiente de la edad (Wu et al., 2008) contribuiría *per se* al incremento de tales desórdenes (Laughlin et al., 2008; Rodríguez et al., 2007), pero las estimaciones sobre el incremento en la incidencia del hipogonadismo, próximo al 40% en hombres mayores de 45 años en algunas series (Feldman et al., 2002; Mulligan et al., 2006), junto al envejecimiento de la población en los países desarrollados, con cerca del 20% de la población europea con más de 64 años, supone una población en riesgo mucho mayor, y por consiguiente un incremento progresivo en la prevalencia de complicaciones cardio-metabólicas entre la población masculina. Además, es ciertamente preocupante que esta situación de hipogonadismo se esté manifestando en la población masculina más joven. Estudios realizados en Europa y en EEUU indican un descenso progresivo de los niveles de testosterona en el hombre de cualquier edad, con un pronunciado efecto cohorte relacionado con el año de nacimiento (Travison et al., 2007; Andersson et al., 2007) y una relación inversa entre la grasa visceral estimada en los jóvenes y sus niveles de testosterona (Nielsen et al., 2007). Por el momento es difícil discernir si la obesidad abdominal es causante de los bajos valores de testosterona, o si por el contrario son los niveles del andrógeno los que están determinando los problemas de obesidad. Probablemente se trate de un círculo encadenado, en donde cada factor se alimenta del otro, pero es un asunto que merece la mayor atención.

En este contexto, se ha recomendado la necesidad de investigar la realidad actual de la salud reproductiva del varón en Europa, no sólo por sus implicaciones en el mantenimiento y reemplazo de la población, sino también por la importancia de los daños que se puedan producir sobre la salud cardiovascular y metabólica. De hecho, debido a la urgencia en saber cuál es el papel del estilo de vida y de los factores medioambientales como causantes del deterioro sospechado, se planteó este trabajo centrado en una población de jóvenes almerienses de fertilidad no conocida, los cuales fueron estudiados en profundidad, tanto en lo que respecta a parámetros seminales como a niveles de hormonas esteroideas, grado de obesidad, hábitos y modos de vida y exposición ambiental.

Los resultados del presente trabajo pueden ser de ayuda para establecer los valores de referencia para los parámetros seminales, las cualidades físicas y los niveles hormonales para el grupo de jóvenes de edad similar, habitantes del sureste peninsular y por ende del sur de Europa. La información sobre exposición ambiental y factores sociales sirve, además, para su comparación con otros estudios similares, realizados en esta y otras regiones de Andalucía, España y Europa, y para establecer las tendencias temporales de la propia región. De hecho cualquier acción que pretenda actuar preventivamente exige la monitorización de la población como medio de evaluación de la respuesta a las medidas implementadas.

Para la planificación y diseño de este trabajo de investigación se consideró con fines de reclutamiento, de una parte, el no conocimiento por parte de los voluntarios de su fertilidad, de otra la homogeneidad en edad y el tiempo de abstinencia a la cesión de la muestras, y por último, la estación del año y situación sociodemográfica, dado que estos factores se han referido como determinantes de la calidad seminal en las poblaciones (diferencias geográficas) y su evolución en el tiempo (tendencias temporales). Como resultado, el grupo de población estudiada es homogéneo, con cerca del 90% de los individuos con estudios universitarios, con características poblacionales muy similares y un bajo riesgo para la exposición ambiental a plaguicidas OC, por lo que los efectos adversos atribuibles a esta exposición siempre serán subestimados en comparación con

otras poblaciones potencialmente con mayor exposición. La población de cerca de 300 jóvenes fue también homogénea en otras muchas cualidades, con una edad media de 20 años y un estrecho rango entre 18 y 23 años; el índice de masa corporal normal medio fue de 23,9 kg/m², con un cuarto de los individuos en situación de sobrepeso y tan sólo el 3% con obesidad. La mayoría de los jóvenes informaron que gozaban de una buena o muy buena salud (98%), y sólo el 6% del grupo informó haber tenido tratamientos médicos prolongados por alguna enfermedad crónica a lo largo de su vida. La mayoría de los jóvenes vivían en una zona urbana (85%), así como sucedió con el nacimiento de sus padres y el lugar en que la mayoría fueron gestados. Presentaron, además, un muy bajo índice migratorio, restringido incluso a la provincia de Almería.

La media aritmética de la concentración espermática fue de 72 millones de espermatozoides por mililitro de semen eyaculado, con una mediana de 51 millones en un rango de 0-420 millones/ml. Estos valores están dentro del rango del recuento espermático de los países participantes en el estudio multicéntrico Europeo (9,5-169 millones), situándose incluso entre los más altos reportados. El número total de espermatozoides (NTE) y el número total de formas móviles (NTEM) son buenos marcadores de la calidad del semen (Irvine et al., 1995), por lo que fueron seleccionados como marcadores de fertilidad y de salud reproductiva en la población de estudio. La media geométrica del NTE fue de 117,4 millones de espermatozoides con una DE de 3,8 millones, y el recuento espermático correspondiente a los cuantiles 10%, 50% y 90% fue de 2,22, 150,0 y 464,4 millones de espermatozoides, respectivamente. Los datos equivalentes para el NTEM fueron: media geométrica de 66,8 y una DE de 4,6 millones de espermatozoides móviles y los valores correspondientes a los cuantiles 10, 50 y 90% fueron 12,1, 86,3, y 195,4 millones de espermatozoides móviles, respectivamente.

En los modelos de regresión lineal simple y multivariante desarrollados para NTE y NTEM se identificaron ciertos determinantes que son del mayor interés comentar, ya que pueden ser de ayuda a la hora de comparar los resultados entre series de individuos de diferentes regiones geográficas. Así, por

ejemplo, por cada hora de abstinencia se observó un incremento de alrededor de un millón de espermatozoides en el NTE, cifra que se mantuvo constante en magnitud y significación en todos los modelos para ambos parámetros, NTE y NTEM. De acuerdo a la estación del año se observaron reducciones de entre 1,7 a 2,5 millones de espermatozoides, tanto para el NTE como para el NTEM por cada cambio de estación en la sucesión de primavera a invierno. Asimismo, por cada incremento en una unidad en la presencia de aglomeraciones se observaron incrementos de 1,6 a 2,11 millones de espermatozoides en el NTE y el NTEM, respectivamente.

En cuanto a la morfología de los espermatozoides, sólo el porcentaje de flagelos anormales (PFA) mantuvo reducciones constantes de aproximadamente 2 millones de espermatozoides por cada unidad de cambio en PFA en todos los modelos para ambas variables de resultado (NTE y NTEM), mientras que el análisis no ajustado no mostró asociación alguna para ninguno de los dos parámetros estudiados, mostrando incluso una asociación inversa a la observada en el análisis de regresión lineal múltiple.

En el caso del perfil hormonal masculino, se observó una reducción de 2,5 millones de espermatozoides y 7 millones de espermatozoides móviles, por cada incremento en una unidad de los niveles séricos de testosterona. Este resultado es consistente con lo esperado desde el punto de vista fisiológico, dado que los niveles bajos de espermatozoides estimulan la producción de testosterona. Cabe señalar, que entre las funciones de la testosterona se encuentra la producción de espermatozoides y el incremento de la actividad sexual (Van de Graaf y Rhees 1999; Damstra et al., 2002).

El primer modelo que estudia la relación entre NTE (Ver Tabla 33) y la exposición a plaguicidas en su forma continua, incluyó a 79 jóvenes, fue ajustado por aquellas variables que presentaron un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$), y explicó más del 65% de la variabilidad en el número total de espermatozoides. En este modelo, además de las variables que fueron incluidas en el resto de los modelos, se consideraron también el uso de antibióticos, la escolarización y la ocupación/trabajo del joven. La asociación entre escolarización y el uso de

antibióticos con el NTE, observado en nuestro estudio, es consistente con los resultados de Golden y colaboradores (1999), por lo que, la escolaridad se confirma como uno de los determinantes más importantes del recuento espermático. La escolarización representó un incremento de 2,2 millones de espermatozoides por cambio en el nivel de estudios -primarios, secundarios y universitarios- lo cual apoya la hipótesis de que el nivel socioeconómico está asociado con un mejor estado de salud, en este caso, la salud reproductiva.

Los jóvenes que trabajaban de día presentaron una reducción mayor en el NTE, en el modelo no ajustado, aunque en el modelo ajustado la dirección de la asociación cambió mostrando que los jóvenes que trabajaban además de estudiar, presentaron un incremento de 2,7 millones en el NTE ($p < 0,03$). Este incremento observado podría atribuirse al efecto del trabajador sano.

El problema de la caída generalizada en la calidad seminal fue excelentemente analizado en el meta-análisis de Carlsen y colaboradores (1992), así como, en estudios posteriores que han señalado el deterioro en la calidad seminal en los países industrializados durante los últimos 50 años (Huyghe et al., 2003; Jørgensen et al., 2006). El estudio de Carlsen y col colaboradores, que incluía 61 trabajos realizados en diferentes partes del mundo entre 1938 y 1990, mostraba una tendencia significativa hacia la caída en la concentración espermática en el varón sano, con una disminución en el recuento espermático de 113 a 66 millones/ml (~50%) (Carlsen et al., 1992). Este trabajo fue criticado por diversos problemas metodológicos, como con la falta de ajuste por las diferencias de tiempos de abstinencia o por la variabilidad en la metodología utilizada para el análisis del semen entre los estudios incluidos. Además, las variaciones geográficas advertidas en calidad seminal también podrían haber sesgado los resultados encontrados (Jouannet et al., 2001). Las críticas recibidas condujeron al reanálisis de los estudios incluidos en la revisión, estratificando el análisis por área geográfica y teniendo en cuenta el periodo de abstinencia, lo que finalizó con la confirmación de las tendencias negativas enunciadas originalmente (Swan et al., 1997). Aunque años más tarde se han publicado resultados muy similares y a pesar de haber ampliado la revisión con 47 nuevos trabajos adicionales (Swan et

al., 2000), lo cierto es que el argumento sobre cambios temporales en la calidad seminal continua siendo muy controvertido (Jouannet et al., 2001).

A pesar de todo, estudios prospectivos más recientes han descrito una incuestionable peor calidad seminal en población joven de los países del norte de Europa (Andersen et al., 2000; Jørgensen et al., 2002). Aproximadamente el 20% de los jóvenes de varios países nórdicos europeos tienen una concentración espermática por debajo del nivel de referencia establecido por la OMS y un 40% de los individuos tiene una concentración por debajo de 40 millones/ml (Andersen et al., 2000). En el presente trabajo el 19% de los jóvenes almerienses presentaron una concentración espermática por debajo de los niveles de referencia de la OMS, circunstancia que se asocia con una demora en un embarazo con éxito (Bonde et al., 1998). Curiosamente, esta tendencia a la baja calidad seminal puede tener también implicaciones para la salud en general, ya que los hombres con peor calidad seminal parecen tener mayor tasa de mortalidad y menor expectativa de vida (Jensen et al., 2009). Los valores encontrados en la población almeriense sitúan a los jóvenes del sureste peninsular en una posición media-alta en cuanto a los parámetros seminales en Europa, con valores superiores a Dinamarca y similares a los de Finlandia y las repúblicas bálticas. Desafortunadamente la ausencia de estudios similares realizados con anterioridad en nuestra población impide realizar cualquier presunción sobre la tendencia temporal o sobre sus determinantes ambientales.

Por otra parte, es interesante señalar, que no sólo los estudios sobre jóvenes de fertilidad no probada orientan hacia un cambio negativo en el recuento espermático, ya que los trabajos realizados en población fértil, con protocolos estandarizados, también muestran diferencias regionales y temporales en calidad seminal (Jørgensen et al., 2001; Swan et al., 2003; Iwamoto et al., 2006). Por ejemplo, los finlandeses (Turku) tienen una concentración espermática 35% más alta que sus vecinos daneses (Copenhague), mientras que escoceses (Edimburgo) y franceses (Paris) tienen concentraciones comprendidas entre ambos extremos (Jørgensen et al., 2001). Diferencias regionales similares también se han descrito entre población fértil americana en un estudio que

compara la calidad seminal de residentes de Columbia (Missouri), New York (New York), Minneapolis (Minnesota) y Los Ángeles (California) (Swan et al., 2003). Los valores descritos para población fértil japonesa son similares a los encontrados en Dinamarca, en concordancia con otro estudio que revela la mala calidad espermática de la población asiática (Chia et al., 1998). Las razones inherentes a las diferencias geográficas observadas en calidad seminal son aún desconocidas, aunque son similares a las encontradas con otros trastornos relacionados con la salud reproductiva masculina, incluyendo cáncer testicular de células germinales y malformaciones congénitas del tracto reproductivo masculino.

Como ya se ha comentado, el estilo de vida podría contribuir a las tendencias adversas observadas en salud reproductiva masculina. Lo cierto es que durante los últimos 50 años han ocurrido cambios importantes en hábitos y estilos de vida en los países desarrollados, como es el caso de la alimentación, el sedentarismo y la obesidad consecuente que alcanza proporciones epidémicas en muchas partes del mundo (Caballero 2007; Mokdad et al., 2001), o la prevalencia del tabaquismo que se ha incrementado de manera notable (Molarius et al., 2001). Realmente es interesante el hecho de que varios estudios en población general infértil (Hammoud et al., 2008; Kort et al., 2006; Magnusdottir et al., 2005; Koloszar et al., 2005) muestren que la obesidad se asocia con peor calidad seminal y que un meta-análisis publicado en 1994 que incluía 20 estudios diferentes (Vine et al., 1994) revele que los fumadores tienen una concentración espermática mucho menor. Es importante destacar que fumar durante el embarazo tiene un impacto negativo sobre la calidad seminal de los descendientes varones, sugiriendo que la exposición prenatal al tabaco es digna de consideración en los estudios clínicos y epidemiológicos (Ramlau-Hansen et al., 2007; Storgaard et al., 2003; Ramlau-Hansen et al., 2007; Jensen et al., 2004; Ratcliffe et al., 1992) y da mayor fuerza a la relación encontrada, en algunos trabajos, entre tabaquismo durante la gestación e hipospadias (Brouwers et al., 2007), criptorquidia (Thorup et al., 2006; Damgaard et al., 2006) y cáncer de testículo en los hijos (Tuomisto et al., 2009).

La hipótesis patogénica considerada por el *Síndrome de Disgenesia Testicular* (TDS) otorga un papel etiológico relevante a determinados factores ambientales y estilos de vida, que se une a una posible predisposición particular de algunos individuos, quizás relacionada con la presencia de polimorfismos genéticos específicos que podrían potenciar el papel de los factores ambientales (Giwerzman et al., 2000; McElreavey et al., 2003). Por ejemplo, el riesgo de desarrollo de cáncer de testículo es marcadamente superior entre hermanos o hijos de pacientes de este tipo de cáncer (Lutke-Holzlik 2004), al igual que para criptorquidia e hipospadias entre gemelos y familiares de primer, segundo y tercer grado con estas patologías (Schnack et al., 2008). Pero fuera de mutaciones puntuales (por ejemplo la mutación SRY) y agrupaciones cromosómicas anormales (por ejemplo, 45X/46XY), asociadas con mayor riesgo de cáncer de testículo, poco se sabe sobre el papel de mutaciones específicas en la etiología de las patologías contempladas en el TDS. Mutaciones en el gen del receptor de andrógenos o en el gen que codifica la enzima 5- α -reductasa tipo II, se asocian con criptorquidia e hipospadias, pero estas mutaciones son extremadamente raras. Además, hoy por hoy, no existe evidencia científica que avale la predisposición de genotipos específicos a efectos adversos de factores medioambientales o de estilo de vida (Giwerzman et al., 2006), sin embargo la diferencia en la incidencia en TDS dependiendo de la raza sugiere un componente genético. Así, la población blanca americana tiene mayor incidencia de cáncer de testículo que los afroamericanos y otros grupos étnicos (Shah et al., 2007). Las diferencias geográficas podrían también reflejar diferencias genéticas en susceptibilidad frente la exposición a compuestos medioambientales-disruptores endocrinos y los factores del estilo de vida o una combinación de ambos. Si aceptamos la premisa de que tanto los genes como el medio ambiente intervienen en la salud reproductiva masculina, debemos admitir también que algo en nuestro medio ambiente actual debe contribuir a la tendencia alcista de tales desórdenes.

El término disruptor endocrino abarca un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso, representado principalmente por

compuestos con propiedades estrogénicas o antiestrogénicas (mimetizadores o antagonistas de la acción del estradiol), androgénicas o antiandrogénicas (mimetizadores o antagonistas de la acción de los andrógenos), o mimetizadores o antagonistas de las hormonas tiroideas. En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido efecto biológico alguno. Además, muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen características óptimas para haber sido y ser empleados aún hoy día en grandes cantidades y sin protección medio ambiental especial (Toft et al., 2004). En otras ocasiones se trata de compuestos bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los conocidos y bien caracterizados COPs, sobre los que se han establecido medidas de control más estrictas (Porta et al., 2006). Otras veces se trata de compuestos que parecen no acumularse, pero su presencia como contaminantes en el entorno (agua, aire, alimentos, utensilios) es tan frecuente que la exposición en el día a día está asegurada (Hauser et al., 2006; Swan 2008).

La hipótesis de la disrupción endocrina como causa de enfermedad sugiere que los disruptores endocrinos se comportan como hormonas, alterando la homeostasis hormonal y originando un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas, lo que resultaría en problemas de desarrollo y de funcionalidad de los sistemas hormonales. A este respecto, la exposición humana a disruptores endocrinos con actividad hormonal/anti-hormonal, podría conducir a alteraciones en la salud reproductiva del varón, resultando en enfermedades diversas que van desde las malformaciones del tracto genitourinario, la mayor frecuencia de cáncer de testículo y la merma de la calidad seminal con disminución de la fertilidad (Olea y Fernández 2007).

Los disruptores endocrinos pueden interferir con las células componentes de órganos sexuales en momentos de susceptibilidad particular como puede ser el periodo embrionario y fetal. El proceso de desarrollo del embrión-feto masculino implica una compleja cascada de eventos, iniciada por genes sexuales determinantes que activan el proceso de formación de los testículos, proceso que

es hormonalmente independiente. Por el contrario, las etapas subsecuentes, formación de los genitales externos y el descenso de los testículos dentro del escroto, son hormonalmente dependientes (Welsh et al., 2008). Tres son las hormonas implicadas, la hormona anti-Muleriana, la testosterona y el factor de crecimiento insulínico 3, aunque de ellas es la testosterona la que conlleva el más amplio rango de efectos. De hecho, los andrógenos son responsables de la aparición de los caracteres secundarios masculinos y del descenso de los testículos en el escroto, eventos que son programados o inducidos durante el primer trimestre de embarazo, lo que condiciona que el momento de secreción de testosterona sea crítico para un desarrollo normal de los órganos reproductivos masculinos. Una inadecuada ausencia/presencia de andrógenos desembocaría en un feto macho poco masculinizado, mientras que la exposición de un feto hembra a andrógenos causaría masculinización (Toppari 2008).

El mecanismo de acción mediante el cual los disruptores endocrinos modulan la acción hormonal durante el proceso de masculinización se conoce tan solo para algunos de ellos. Así, algunas de estos compuestos han sido identificadas como anti-andrógenos ya que se unen, pero no activan, el receptor de andrógenos (AR), caso del p,p'-DDE, metabolito del DDT, y el fungicida vinclozolina (Kelce y Wilson 1997). Otros exhiben propiedades estrogénicas, siendo los efectos adversos producidos en animales macho similares a los desencadenados por los compuestos con actividad anti-androgénica (Toppari 2008). Un ejemplo de disruptor endocrino estrogénico es bisfenol A, ya identificado como tal en 1936 cuando Dodds & Lawson describieron su actividad uterotrófica en la rata, lo que permitió su inclusión en el censo de estrogénos de síntesis (Dodds y Lawson 1936). Además, bisfenol A desencadena toda una cascada de eventos no necesariamente mediados por su unión al receptor, sugiriendo que muchos de los disruptores endocrinos pueden actuar a través de mecanismos muy diversos.

Se ha argumentado que en los modelos experimentales de laboratorio, los efectos de los disruptores endocrinos ocurren cuando los animales se exponen a concentraciones individuales muy por encima de las que generalmente el hombre

está expuesto. Sin embargo, en varios estudios con ratas tratadas con mezclas de entre 3 y 7 compuestos con propiedades anti-androgénicas, a dosis a las cuales cada compuesto de manera individual no produce ningún efecto, se observaron tanto un deterioro en el proceso de masculinización como en la aparición de hipospadias (Christiansen et al., 2008; Sharpe 2008). Este es, posiblemente, el modelo experimental más apropiado, ya que el hombre está expuesto a una mezcla compleja de compuestos químicos contaminantes ambientales (López-Espinosa et al., 2007; Carreño et al., 2007), pudiéndose asumir que los efectos combinados (aditivos, sinérgicos antagónicos, o todos ellos) pueden igualmente ocurrir en la vida real. Si este fuera el caso, la complejidad para identificar los agentes causantes o desencadenantes del TDS es una tarea bien difícil.

La evidencia epidemiológica que relaciona exposición a disruptores endocrinos y calidad seminal es también escasa (Toft et al., 2004), aunque existen algunos estudios que relacionan la exposición a plaguicidas y otros compuestos OC persistentes con actividad hormonal y la baja calidad seminal. Así por ejemplo, un estudio realizado entre jóvenes reclutas militares suecos estableció una relación inversa entre niveles de bifenilos policlorados (PCBs) y movilidad espermática (Richthoff et al., 2003). Otro estudio estableció la relación entre exposición medioambiental a plaguicidas y la calidad seminal entre población fértil e infértil, altamente expuesta a compuestos OC (concretamente algunos PCBs y p,p'-DDE) encontrándose una menor movilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides móviles asociada a una mayor exposición (Hauser et al., 2003). El DDT también se ha asociado con una disminución de la fertilidad y cambios en el recuento espermático además de con retrasos en el inicio de la pubertad (DeJager et al., 2006; Aneck-Hahn et al., 2007).

Algunos estudios epidemiológicos han investigado la asociación entre actividad laboral y calidad seminal, analizando el papel de la exposición química en los lugares de trabajo sobre la función reproductiva masculina. De esta manera es conocido que el nematocida dibromocloropropano (DBCP) afecta de forma severa el proceso de la espermatogénesis aunque el mecanismo de acción no se ha aclarado todavía. Otros plaguicidas interfieren de igual forma, con la

espermatogénesis, aunque sus efectos no son tan significativos como los producidos por DBCP. Los resultados de trabajos realizados con agricultores de invernaderos daneses demuestran que la concentración espermática y la proporción de espermatozoides normales es menor entre los trabajadores altamente expuestos a distintos plaguicidas cuando se comparaban con los de menor exposición (Abell et al., 2000). Los estudios que relacionan la exposición a ftalatos con la calidad seminal no son tan concluyentes (Hauser 2006), sin embargo la universalidad del fenómeno de exposición a estos aditivos del plástico es realmente preocupante. De igual manera ocurre con los compuestos polifluorados que han sustituido en gran medida a los OC y que forman parte de una gran cantidad de objetos de uso cotidiano. Un estudio reciente señala que altas exposiciones a estos compuestos se asocian a un menor porcentaje de espermatozoides normales entre población joven (Joensen et al., 2009).

Por las razones aludidas, en este estudio se planteó investigar de forma pormenorizada la exposición ambiental a compuestos orgánicos persistentes, disruptores endocrinos, y tratar de dilucidar si estos compuestos químicos han afectado a su salud reproductiva, evaluada a través de la medida de los parámetros seminales y del estudio de la función testicular. Para ello, se determinó tanto la frecuencia de presentación de los 18 compuestos químicos-plaguicidas OC persistentes seleccionados, como la concentración de cada uno de ellos, cuantificados en el suero sanguíneo de los jóvenes participantes.

Los resultados del estudio constatan que la exposición ambiental es importante ya que se alcanza un valor medio de 11 residuos detectables por individuo. El compuesto OC más frecuente fue p,p`-DDE, detectado en el 96% de las muestras, a concentraciones medias de 5,17 ng/ml suero ó 794 ng/g lípido, seguido por vinclozolina, con una frecuencia del 95,5%. Le siguen en orden de frecuencia, de mayor a menor, endosulfán diol, endosulfán lactona, endosulfán I, hexaclorobenceno, aldrín, o,p`-DDD y lindano. Hay que recordar que en el catálogo de compuestos investigados tan sólo el grupo del endosulfán, el metoxicloro, vinclozolina y lindano, tienen un uso reciente bien reconocido en España. El resto de los compuestos, o bien están prohibidos o su empleo está

muy restringido o limitado a aplicaciones muy concretas. Sin embargo, la presencia de compuestos de uso histórico en el suero de los jóvenes, demuestra, una vez más, que estos acceden al organismo del individuo por la exposición de sus madres gestantes expuestas en las que se acumulan y transmiten a la descendencia, durante el embarazo y lactancia (Carreño et al., 2007).

La hipótesis principal del presente estudio, que considera la evaluación del efecto de la exposición a los plaguicidas OC sobre la calidad seminal, exige la estandarización de los protocolos de trabajo, la metodología analítica, el establecimiento de controles de calidad apropiados y la elección de un tamaño de muestra adecuado. Además necesita tener presentes los determinantes que, como ya hemos observado, pueden asociarse como confusores, covariables y modificadores de efecto. De hecho, no se puede olvidar la importancia del efecto combinado de la exposición (Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2004; Kortenkamp 2007), junto con los efectos individuales de cada compuesto químico, sobre los indicadores de la calidad seminal seleccionados, que pueden variar en forma muy llamativa, incluso cambiar de sentido del efecto, en función de las variables introducidas en los diferentes modelos explicativos.

A este respecto, el análisis de correlación de la concentración de los 18 plaguicidas OC no indica que estos, en su mayoría, estén correlacionados. La matriz de correlación muestra que de los 18 plaguicidas, incluyendo aquellos que estaban por debajo del límite de detección, sólo en algunos casos llegó a superar el 50%, - vinclozolina con aldrín y lindano; mírex y metoxicloro. En las otras 9 comparaciones se rondó el 40% - endrín con endosulfán I, p,p'-DDE y metoxicloro; endosulfán I con endosulfán lactona y metoxicloro; endosulfán sulfato con endosulfán diol y mírex; metoxicloro con endrín, endosulfán I y mírex; y lindano con HCB. La gran mayoría de comparaciones, que supusieron 142 correlaciones analizadas, sólo estuvieron en un rango entre 3 y -1. El hecho de que la gran mayoría de los plaguicidas muestren un coeficiente de correlación bajo es importante ya que permite incluir todos ellos en los modelos multivariantes, asumiendo su independencia.

A pesar de lo dicho, cuando se analizó la correlación entre los plaguicidas incluyendo sólo a los individuos en los que los estos se encontraban por encima del límite de detección, la correlación fue mucho más alta, incluso llegando a ser de cerca del 80% en algunos casos. Así sucedió, por ejemplo para el caso de mírex y dieldrín; endosulfán sulfato, o,p'-DDT y metoxicloro; endosulfán II y endrín, sugiriendo que la exposición múltiple en aquellos individuos más expuestos, puede proceder de la misma fuente de exposición, que su exposición ha sido simultánea en el tiempo, o bien que esta podría ser resultado de su alta persistencia en el ambiente y en el tejido adiposo de los animales, ocasionando que aquellos individuos en los que se detectó algún plaguicida presentaran una mayor probabilidad de presentar algún otro. Muy interesante es el hecho de que el grupo del aldrín, dieldrín y endrín fue el que presentó una mayor correlación con todos los grupos de plaguicidas analizados, lo que sugiere que este es un grupo de plaguicidas frecuentemente utilizado en combinación con otros. Otra posible explicación es que existe una relación entre compuestos y metabolitos que conlleva a una exposición grupal. De hecho el grupo que abala este aspecto, fue el del DDT y sus derivados, probablemente como resultado de su alta persistencia y la presencia concomitante de sus metabolitos y derivados.

Los valores de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de alta y de baja densidad en sangre se han considerado como factores de confusión por estar directamente asociados a las variables de resultado (NTE y NTEM) y a las variables de exposición (plaguicidas organoclorados), ya que son la materia prima para la síntesis de las hormonas esteroideas, y por otra parte determinan la dosis interna de los plaguicidas OC, los cuales son altamente lipofílicos, y además favorecen el efecto yoyó ya descrito (Mullerova y Kpopecky 2007). Por estas razones y para poder controlar en los modelos multivariantes por el perfil lipídico como factor de confusión, se incluyeron las concentraciones de los plaguicidas organoclorados en base líquida (ng/ml) y se ajustó por las concentraciones séricas de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL.

El valor medio obtenido por la población de estudio para colesterol total y para los triglicéridos se encontraron dentro de los niveles de referencia

establecidos por la OMS (colesterol total <200 mg/dl y triglicéridos <200 mg/dl). Entre las lipoproteínas circulantes en sangre, ninguna se mantuvo asociada significativamente en el primer modelo final (Ver Tabla 33) a pesar de que en el análisis de regresión lineal simple, los niveles de colesterol y triglicéridos se asociaron con incrementos en el NTE con una significación estadística marginal (2,5 y 1,5 millones en el NTE, $p=0,080$ y $p=0,109$, respectivamente). No obstante en el análisis no ajustado se alcanzó la significación estadística cuando los triglicéridos se recodificaron en niveles por debajo y por encima de la mediana, de tal manera que los sujetos con niveles por debajo de la mediana mostraron un incremento de casi 4,6 millones de espermatozoides ($p=0,029$). En el caso de los plaguicidas, la exposición a aldrín, endosulfán sulfato y p,p'-DDT, se asociaron a una reducción significativa del NTE en cerca de dos millones, o más, por cada incremento en una unidad en las concentraciones de estos plaguicidas. Por el contrario, el p,p'-DDE se asoció a un incremento de más de 4,5 millones de espermatozoides por cada incremento en una unidad en su concentración.

En el segundo modelo para el NTE (Ver Tabla 34) en comparación con el primer modelo, se permitió para alguna variable de ajuste (pH e inhibina B) una confiabilidad del 90%. Como era de esperar, este modelo mostró un mayor coeficiente de determinación, con una mayor explicación de la variabilidad del NTE ($R^2=72\%$), aunque sólo incluyó a 71 de los jóvenes participantes en el estudio. El pH resultó asociado a una reducción marginalmente significativa ($p=0,103$) de cerca de 3 millones en el NTE, mientras que la inhibina B se asoció con un incremento en el NTE de 2 millones ($p=0,104$), lo que es biológicamente plausible pues el incremento en el número de espermatozoides estimularía la producción de inhibina B, para inhibir la producción de hormonas gonadotrópicas (Van de Graaf y Rhees 1999; Damstra et al., 2002).

Este modelo, aunque no representa el mejor ajuste, mostró asociaciones tan llamativas como plausibles para la mayoría de las variables incluidas, por lo que esas características merecen especial atención en futuros estudios. En los jóvenes que refirieron actividad laboral se alcanzó un incremento del NTE más

importante que en el modelo anterior, llegando a cerca de 6 millones ($p=0,002$), reafirmando lo sugerido para esta variable en el primer modelo para el NTE.

El tabaquismo de la madre durante la gestación del joven, resultó asociado a una reducción de cerca de 2 millones en el NTE ($p=0,020$), lo que es consistente con la hipótesis del efecto epigenético en la exposición del feto, que afecta posteriormente la salud reproductiva en la edad adulta, como ya ha sido referido por otros autores (Dieckmann et al., 1953; Luconi et al., 2002; Jensen et al., 2004; Anway y Skinner, 2006)

Este segundo modelo incluyó, dentro del perfil lipídico, a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que se asociaron a un incremento de 4,4 millones en el NTE. Aunque esta asociación sólo fue marginalmente significativa ($p=0,074$), puede explicarse debido al papel de las HDL como materia prima para la formación de testosterona y por ello, con la producción y mantenimiento del número de espermatozoides (Van de Graaf y Rhees 1999; Damstra et al., 2002).

En cuanto al perfil hormonal, además de la inhibina B, la LH se asoció a un incremento significativo de 2,33 millones de espermatozoides ($p=0,018$), asociación que cabría esperar ya que la LH se ha referido que se relaciona con la estimulación de las células de Leydig para la producción y mantenimiento de la espermatogénesis (Padmanabhan y McNeilly 2001; Damstra et al., 2002). Por otra parte, las hormonas esteroideas estimulan la maduración folicular y por tanto la espermatogénesis (Fujii et al., 2001; Anderson et al., 2002; Densmore y Urbanski, 2003; Chen et al., 2005).

La testosterona, en este segundo modelo, se asoció con una reducción de 3,5 millones en el NTE, que como indicamos anteriormente se asocia con la producción de espermatozoides, y al reducirse el número de estos, se produciría un aumento en la secreción de testosterona. Una vez que los espermatozoides se incrementan en número, se estimula la producción de inhibina B, observándose una asociación positiva entre los niveles séricos de esta hormona y el NTE (Padmanabhan y McNeilly 2001), tal y como se observa en este modelo.

El porcentaje de cabezas anormales (PCA) resultó asociado a una reducción de más de 400 millones en el NTE por cada incremento en una unidad

de PCA, la cual fue la mayor de las reducciones observadas para ésta variable de resultado ($p=0,003$). Lo que indica que aquellos individuos con mayor porcentaje de espermatoцитos anormales en cabeza podrían ser también aquellos que tuvieran mayor exposición a agentes xenobióticos teratogénicos, como sucede aparentemente con la vinclozolina, que se correlacionó alrededor de un 40% con la presencia de cabezas anormales, lo que en definitiva afectaría a la reproducción celular espermática (Bartkova et al., 2007). Probablemente algo parecido sucede con el porcentaje de flagelos anormales (PFA) que se asoció con una reducción algo mayor de 3 millones de espermatozoides ($p<0,001$).

Sin embargo, debido a la alta colinearidad entre el PCA y PFA cabría esperar que se eliminen una u otra variable en los modelos más parsimoniosos por lo que tan sólo se mantuvo una de ellas en los modelos ajustados (nivel de confiabilidad del 95%). Ambos tipos de defectos podrían ser debidos también al efecto de la exposición a cócteles de compuestos disruptores endocrinos (Skkakebaek et al., 2001; Kortenkamp 2007; Bartkova et al., 2007), mecanismo al que podría atribuirse su fuerte asociación en la reducción del NTE, y consecuentemente a una disminución de la capacidad reproductiva de las poblaciones de jóvenes, lo que es consistente con observaciones de estudios previos (Gray et al., 1994; Golden et al., 1999; Skkakebaek et al., 2001; Anderson et al., 2002; Olea y Avivar, 2003; Coldbert et al., 2005; Veeramachaneni et al., 2006, Bartkova et al., 2007).

En este segundo modelo la exposición a endrín demostró una reducción significativa, la mayor de las observadas para los otros plaguicidas OC, alcanzando más de 7 millones en el NTE ($p=0,023$), confirmando su capacidad antiandrogénica referida en otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación (Aguilar-Garduño et al., en preparación).

Por último la exposición a los plaguicidas endosulfán sulfato y p,p'-DDE presentó una asociación significativa aunque de menor magnitud que el endrín, alcanzando el primero una reducción de cerca de 2,83 millones en el NTE y, el segundo un incremento de 2,12 millones en el NTE ($p=0,031$ y $0=0,027$,

respectivamente), consistentes con un efecto antiandrogénico del primero y estrogénico del segundo (Aguilar-Garduño et al., en preparación).

En el tercer modelo para NTE (Ver Tabla 35) se alcanzó un 74% de explicación de la variabilidad del NTE. El modelo incluyó información de 89 jóvenes. Se introdujeron algunas variables en forma categórica, como es el caso de la abstinencia en cuartiles que mostró asociaciones tanto significativas como biológicamente plausibles con el NTE que variaron desde 4 millones en el primer cuartil, hasta aproximadamente 2 en el segundo y el tercero ($p < 0,05$). El pH mostró una asociación inversa, con una reducción significativa de cerca de 3 millones en el NTE por unidad de cambio ($p = 0,011$), y el volumen testicular de menos de 12 ml, que también estuvo significativamente asociado a una reducción en 4,6 millones en el NTE ($p < 0,05$).

Para la morfología, el PEN y el PCI mostraron incrementos significativos de 1,27 y 1,45 millones en el NTE ($p = 0,018$ y $p = 0,007$) respectivamente, mientras que el PFA mantuvo una asociación con una reducción, también significativa, de 1,6 millones en el NTE, circunstancia también observada por otros autores (Bartkova et al., 2007). En este modelo, nuevamente, contar sólo con estudios primarios se asoció a una reducción significativa de 6,8 millones en el NTE ($p = 0,000$) en comparación con tener estudios universitarios.

Presentar una movilidad del tipo a y a+b bajas, se asoció a una reducción de 2,4 millones en el NTE. Esta disminución de la movilidad podría deberse a la exposición a algunos DE los cuales pueden producir daño genético, alteraciones en la proliferación normal de las células espermáticas, y/o daño morfológico que interfiere con la movilidad espermática (Bartkova et al., 2007).

Al igual que en el segundo modelo, la exposición a endrín mostró una reducción significativa en el NTE, aunque esta vez sólo fue de 1,6 millones. Por el contrario, el o,p'-DDE y la vinclozolina mostraron una relación en el sentido opuesto, que fue de mayor significación estadística, con incrementos de 4,6 y 6,1 millones en el NTE, ($p = 0,006$ y $p = 0,002$, respectivamente), debido probablemente a su carácter estrogénico (Gray et al., 1994; Kelce et al., 1995; Kelce et al., 1997). La exposición a estos compuestos en animales de experimentación se ha

asociado con la capacidad para mantener relaciones sexuales normales, o para alcanzar una erección óptima, lo que también podría explicar las asociaciones encontradas (Brien et al., 2000).

En el caso de los modelos lineales para el NTEM, en el primer modelo final que incluyó a 70 jóvenes y explico el 65% de la variabilidad del NTEM (Ver Tabla 51) observamos una reducción importante de aproximadamente 12 millones de espermatozoides por cada incremento en una unidad en los niveles séricos de colesterol. Así mismo, se observó una disminución de siete millones de espermatozoides por cada unidad en los niveles séricos de testosterona, lo cual es consistente con los hallazgos de otros estudios (Andersson et al., 2007; Skakkebæk et al., 2001). Como se ha mencionado anteriormente esto puede ser debido a que un incremento en los niveles de colesterol se asocia con una mayor producción de testosterona, hormona que estimula la actividad sexual lo que ocasionaría a su vez una reducción del número de espermatozoides. Otro mecanismo que explicaría estas asociaciones es que cuanto mayor es la concentración de lípidos, existe una mayor probabilidad de acumulación de plaguicidas OC, muchos de los cuales, por su actividad antiandrogénica, producirían una reducción en el número de espermatozoides. Además algunos plaguicidas organoclorados interfieren con la movilidad espermática, como es el caso de la vinclozolina, la cual se asoció con la presencia de cabezas y flagelos anormales, y por lo tanto, con una reducción de la movilidad de los espermatozoides. En este modelo el PFA se asoció con una reducción de 2,2 millones en el NTEM ($p < 0,001$).

En cuanto a la exposición a plaguicidas OC, a excepción del aldrín, que no fue incluido en este modelo, los mismos plaguicidas que resultaron asociados con el NTE lo hicieron de manera bastante similar con el NTEM. Así, el endosulfán sulfato mostró una reducción en el NTEM de 4,61 ($p = 0,006$); el p,p'-DDT una reducción de 1,91 ($p = 0,013$), y el p,p'-DDE un incremento ligeramente mayor, pero también significativo de 6,28 ($p < 0,001$), debido a sus efectos estrogénicos y antiandrogénicos mencionados anteriormente.

Por último, el hecho de haber padecido paperas se asoció con una reducción de más de cuatro millones en el NTEM, lo cual podría ser debido a la orquitis concomitante o al efecto iatrogénico de algún medicamento utilizado para su tratamiento.

El segundo modelo para el NTEM (Ver Tabla 52) ajustado por la presencia de plaguicidas OC, alcanzó una explicación de la variabilidad de NTEM del 78% e incluyó a 73 participantes. En este modelo sólo una de las variables alcanzó una significación estadística marginal, caso del aldrín ($p=0,063$), pero se observaron otra serie de asociaciones interesantes para el NTEM. Así, además de las referidas como comunes a todos los modelos, quedaron incluidas en este caso: la consistencia de los testículos, que mostró un incremento significativo en el NTEM ($p=0,001$); la presencia de paperas mostró una reducción de casi 5 millones en el NTEM ($p=0,003$); la licuefacción incompleta del semen, se asoció con una reducción de 30 millones en el NTEM ($p<0,001$). Por último, el colesterol se asoció a una reducción de 8,2 millones en el NTEM.

De nuevo, la inhibina B se asoció a un incremento significativo de cerca de 4 millones en el NTEM ($p=0,003$), resultado que es plausible por el hecho de que al incrementarse el número de espermatozoides se estimula la secreción de inhibina B la cual inhibe las hormonas gonadotrópicas (FSH, LH). Asimismo, la FSH se asoció a un incremento de 1,82 millones en el NTEM, que como ya hemos indicado anteriormente también es una asociación biológicamente plausible, mientras que la SHBG se asoció a una reducción de 1,62 millones en el NTEM, hormona que presenta una alta correlación con la presencia de la testosterona, la cual no fue incluida en este modelo debido a la elevada colinearidad con la SHBG (Giwercman et al., 2000). En este modelo fue en el que resultaron asociados un mayor número de plaguicidas con el NTEM. El aldrín se asoció a un incremento de 2 millones en el NTEM ($p=0,063$), mientras que el dieldrín lo hizo con una reducción de 2,1 millones ($p=0,010$). En este modelo se evidencia nuevamente efectos contrarios por la exposición a plaguicidas OC del mismo grupo. Así, el endosulfán lactona incrementó en 2,8 millones el NTEM ($p=0,003$), mientras que el endosulfán éter y el endosulfán sulfato se asociaron

con una reducción de 2,4 millones ($p=0,003$) en el NTEM. Debido a este hecho, consideramos que no se debería analizar el efecto de estos compuestos a través de la sumatoria de las concentraciones de los plaguicidas del mismo grupo, lo cual es una práctica frecuente en los estudios epidemiológicos y toxicológicos. Creemos que al analizar el efecto conjunto de los plaguicidas del mismo grupo se pueden enmascarar los efectos individuales de cada uno de ellos. Además, como vemos reflejado en estos modelos, sus efectos son muchas veces antagónicos, incluso cuando únicamente difieren en su estequiometría.

Por su parte, el o,p'-DDT mostró un incremento significativo de 2,2 millones en el NTEM ($p=0,019$), sin embargo el p,p'-DDE presentó uno de los más importantes efectos sobre la movilidad, y demostró estar asociado a un incremento de casi 100 millones en el NTEM ($p<0,001$), por cada unidad de incremento en la concentración de este plaguicida; sugiriendo que este derivado del DDT induce un ambiente estrogénico y produce el incremento del número de células por los mecanismos que ya mencionamos anteriormente. Por otra parte, debido a que el p,p'-DDE no se correlacionó con la presencia de alteraciones morfológicas de los espermatozoides y la vinclozolina si lo hizo, alcanzando un nivel de correlación de más del 40%, sugerimos un mecanismo de acción diferente entre ambos plaguicidas. En este modelo, se incluyó también al metoxicloro y al lindano, el primero se asoció con una reducción de 2,2 millones en el NTEM ($p=0,008$), y el segundo con un incremento de 1,8 millones en el NTEM ($p=0,036$).

Es importante resaltar que hasta la fecha ninguno de los investigadores que han evaluado el efecto de algunos plaguicidas OC sobre la calidad seminal (DeJager et al 1999, Cocco et al, 2004), han ajustado los modelos por la exposición a otros plaguicidas OC, algunos de los cuales son conocidos disruptores endocrinos y de los que en este trabajo de tesis doctoral evidenciamos su asociación con el NTE y el NTEM. Además, en algunos de estos estudios se ha evaluado el efecto de la sumatoria de las concentraciones de los plaguicidas del mismo grupo, por lo que sus resultados no evidencian el efecto independiente de cada uno de estos compuestos como hacemos en este estudio.

Es importante destacar que probablemente exista un “sesgo de publicación”, que haga que solo tengamos conocimiento de aquellos estudios en los que se reportan asociaciones esperadas de acuerdo a las publicaciones previas, y se evite hacer referencia a situaciones aparentemente paradójicas.

La evaluación de la oportunidad relativa (OR) de presentar una concentración de espermatozoides, un número total de espermatozoides (NTE) y el NTEM menor de 20 y 40 millones, se realizó mediante la construcción de varios modelos de regresión logística múltiple considerando la variable dependiente de manera dicotómica. Así, se estableció como punto de corte para la concentración espermática (CE) los 20 millones y para el NTE y el NTEM tanto en 20 como en 40 millones de espermatozoides. Como cabía esperar se observaron asociaciones consistentes con los análisis de regresión lineal múltiple, anteriores. Así, por ejemplo tener un nivel de estudios primarios supuso un riesgo para bajos parámetros de calidad seminal. Los niveles de colesterol por debajo de la mediana resulto ser protector frente a bajos niveles de NETM. Conforme aumenta el IMC se incrementa el riesgo de presentar una CE<20 millones y un NTE por debajo de 20 y de 40 millones, aunque no se observaron asociaciones significativas con el NTEM. Asimismo, conforme disminuyó el periodo de abstinencia sexual aumentó el riesgo de presentar una CE< 20 millones y un NTE y de NTEM menores tanto de 20 como de 40 millones, respectivamente.

En relación a las hormonas sexuales, no se observaron asociaciones significativas con la CE ni con el NTE. Únicamente observamos asociaciones marginalmente significativas con una disminución de riesgo de tener un NTEM<40 millones, en aquellos individuos que presentaron niveles séricos de FSH por debajo de la mediana y un mayor riesgo de presentar esta condición cuando los niveles de testosterona sérica estaban por debajo de la mediana.

Los resultados del estudio sugieren que la exposición a los plaguicidas OC, a los que los jóvenes participantes estuvieron expuestos desde su nacimiento hasta su desarrollo y madurez sexual, tales como el endosulfán y el o,p`-DDT, se asocia con un incremento del riesgo de presentar los niveles de CE, NTE y NTEM por debajo de 20 y 40 millones, mientras que el plaguicida o,p`-DDE se comporto

como un factor fuertemente protector para los parámetros analizados, lo mismo que sucedió con la vinclozolina que se comportó como factor protector frente a la posibilidad de presentar una CE < 20 millones y un NTE por debajo de 20 y 40 millones. Estos resultados son consistentes con los observados previamente por nuestro equipo de investigación (Aguilar-Garduño et al., en preparación).

El porcentaje de flagelos anormales (PFA) no mostró asociación alguna con las variables de calidad seminal, pero en los modelos ajustados para el NTE o el NTEM, como era de esperar desde el punto de vista biológico, si que mostró una asociación estadísticamente significativa, que fue consistente con los resultados de otros estudios experimentales (Veeramachaneni et al., 2006; Bartkova et al., 2007). De hecho esta malformación espermática junto con el porcentaje de cabezas anormales fueron los factores más relevantes asociados con la espermatogénesis y con una disminución de la movilidad espermática. Esta observación sugiere que las malformaciones espermáticas son otro buen marcador de la calidad seminal (WHO, 1999).

En relación a los parámetros de calidad seminal, los resultados de este estudio son consistentes con algunos otros estudios experimentales realizados en modelos animales. Este es el caso del p,p'-DDE (Brien et al., 2000) y de la vinclozolina (Gray et al., 1994; Veeramachaneni et al., 2006) que se han asociado positivamente con el número total de espermatozoides. Pero fueron inconsistentes con respecto a otros estudios epidemiológicos previos (DeJager et al 2006; Recio et al., 2005; Cocco et al, 2004). Como hemos indicado anteriormente, esto puede ser debido a las diferencias metodológicas entre los estudios, ya que la mayoría de ellas no ajustan por la exposición a otros plaguicidas OC lo cual dificulta su comparación.

Los plaguicidas organoclorados son disruptores endocrinos que pueden alterar la actividad hormonal y afectar la calidad seminal en diferentes formas, algunos contribuyendo como anti-andrógenos, interfiriendo los procesos de producción de células espermáticas y causando una reducción clara de estas últimas. Otros pueden interferir sobre la producción de las mismas, pero en sentido opuesto, produciendo un incremento en el número de espermatozoides, lo

cual puede tener lugar probablemente en dos formas, actuando como compuestos estrogénicos e incrementando la producción celular, o impactando genéticamente, actuando como agentes mutágenos o teratógenos.

Las diferencias observadas en este estudio respecto a los resultados de otros trabajos o con las series de los otros países participantes en el Proyecto Europeo multicéntrico, pueden atribuirse a factores como: a) características de los jóvenes reclutados, b) metodología empleada en los estudios de semen en cuanto a diseño y análisis estadístico de los resultados, y c) exposiciones a factores exógenos que pueden afectar tanto la producción como la calidad seminal (Jegou et al., 2002; Auger et al., 2001).

A pesar de que los parámetros seleccionados en este trabajo (CE, NTE y NTEM) de calidad seminal, son factores que están altamente correlacionados, lo que podemos apreciar al comparar los modelos desarrollados en este estudio; es importante analizar de manera independiente tanto los parámetros más simples (CE), como los parámetros más complejos (NTE y NTEM), ya que podemos indentificar predictores específicos para cada uno de ellos independientemente de su complejidad. Esto ejercicio es necesario si el que pretende proponer medidas de prevención y protección frente a la exposición a factores de riesgo que pueden afectar de manera importante la calidad seminal, y que pueden representar serias amenazas para la fertilidad de los jóvenes. La propuesta de Crazzolara y colaboradores (2007) referente a la relevancia del estudio de parámetros seminales complejos es consistente parcialmente con los resultados observados, ya que si por una parte es importante el estudio de los parámetros más complejos, aquellos otros mas simples, como la concentración espermática, también proporcionan información que no se apreciaría en el caso de los más complejos.

En los estudios de calidad seminal como este se deberían considerar no sólo criterios estrictos del análisis estadístico para conseguir los modelos mejor ajustados en base a confiabilidad y parsimonia, sino también realizar los mismos con diferentes grados de confiabilidad permitida para algunas variables, sobre todo teniendo en cuenta la plausibilidad biológica o la consistencia con hallazgos

científicos previos (Pérez-Hoyos 2003). Por esta razón en el análisis de los datos de este estudio se construyeron diferentes modelos contemplando criterios de confiabilidad estadística distintos para incluir las variables en los modelos finales.

Los resultados de este estudio indican que la exposición a xenobióticos, como los plaguicidas OC, no sólo puede producir una disminución en el número y movilidad de los espermatozoides, sino también puede inducir su incremento. Esta observación es también preocupante, pues las exposiciones a estos plaguicidas afectan adversamente no sólo a la producción y maduración de los espermatozoides, sino también a la frecuencia de alteraciones genéticas, generadas en las células madre o en los espermatozoides mismos (Bartkova et al., 2007), lo que puede aumentar la frecuencia de anomalías morfológicas de estos y como consecuencia la limitación funcional en su capacidad para fecundar un óvulo.

En el presente estudio se observó un incremento del NTE y el NTEM que fue muy significativo para el p,p'-DDE y la vinclozolina en varios de los modelos presentados. Estas observaciones son consistentes con algunos estudios experimentales en ratas macho expuestas a p,p'-DDE (Brien et al., 2000) y a vinclozolina (Gray et al., 1994, y Coldbert et al., 2005), y en conejos expuestos en los períodos prenatal e infantil a vinclozolina (Veeramachaneni et al., 2006). Los conejos son un buen modelo de estudio de la calidad seminal ya que tienen un largo período de inmadurez antes de la iniciación de los cambios que terminan con la pubertad, tal como sucede en los humanos (Veeramachaneni et al., 2006) y además presentan una fisiología similar en relación a la contracción y relajación del cuerpo cavernoso como los humanos (Bischoff et al., 2001). En este modelo la exposición a plaguicidas OC parece estar asociada con un incremento en la proliferación de las células espermáticas, fenómeno que probablemente se produce siguiendo los mismos orígenes que los defectos nucleares y acrosómicos (Bartkova et al., 2007). Las observaciones de Kelce y colaboradores, que sugirieron que la presencia de un antiandrógeno puede generar un ambiente estrogénico y producir síntomas similares a los de la exposición a estrógenos (Kelce et al., 1997) refuerzan aún más esta hipótesis, ya que además de

presentar un débil carácter androgénico, o,p'-DDT y vinclozolina, son referidos como antiandrogénicos.

En la hipótesis del síndrome de disgenesia testicular, la combinación de los tres efectos reproductivos adversos -reducción en la calidad seminal, el desarrollo de cáncer y malformaciones- plantea una etiología común para estos procesos, y es probable que tanto la proliferación como el incremento en los defectos nucleares y acrosómicos inducidos por los plaguicidas OC analizados sean cruciales para una etiología común (Skakebaek et al., 2001; Olea y Avivar, 2003; Olea y Fernández, 2007), aunque indudablemente estos son modulados por las condiciones sociodemográficas y el estilo de vida.

Entre las principales fortalezas de este trabajo se encuentra la integración en el programa de control de calidad establecido para todos los grupos europeos participantes en el estudio multicéntrico, centralizando y coordinando el análisis de la concentración espermática por el Departamento de Reproducción del Rigshospitalet de Copenhague en Dinamarca. El análisis de los resultados obtenidos en nuestro centro, comparados con los derivados del centro de referencia mostró una gran fiabilidad de las determinaciones efectuadas ya que la desviación media con respecto al laboratorio de referencia fueron inferiores al 4%.

Asimismo, se aplicó un diseño de estudio homogéneo y estandarizado estableciendo previamente los protocolos de trabajo, comunes en todo el estudio europeo multicéntrico (Skakkebaek et al., 1999), proporcionando un enfoque global, en el que se contempla tanto aspectos sociodemográficos, estilos de vida y parámetros clínicos (perfil hormonal, perfil lipídico, examen urológico), como la determinación directa de 18 plaguicidas OC en suero, todos ellos posiblemente relacionados o potencialmente involucrados con el efecto estudiado. Cabe señalar que además de aplicar los criterios estrictos recomendados por la OMS para el análisis de las muestras de semen, se utilizaron métodos de alta sensibilidad (límite de detección en ng/mL) y especificidad para la determinación de los biomarcadores de exposición a plaguicidas OC. Este diseño, permite alcanzar una mayor validez interna ya que además de disminuir los falsos positivos y negativos tanto en las variables de exposición como de efecto, permite tener información

precisa sobre diferentes factores de confusión y covariables, que, como se ha comentado no han sido controlados en muchos de los estudios previos y que están entre sus principales limitaciones.

Respecto a la primera de las recomendaciones, relativa a las características de la población masculina reclutada, lo cierto es que tanto el número de individuos, como su homogeneidad y su representatividad poblacional son factores muy frecuentemente discutidos y de gran controversia. Por ejemplo, se ha criticado que en el meta-análisis de Carlsen y colaboradores (1992), doce de los estudios considerados tuvieran menos de 20 individuos y otros 29 estudios contaran con menos de 50 sujetos, número claramente insuficiente para alcanzar la potencia necesaria y obtener resultados concluyentes y significativos que permitan establecer comparaciones entre poblaciones.

El reclutamiento de jóvenes en el presente estudio alcanzó los 280, de los cuales 89 presentaron información completa de todos los parámetros evaluados, lo que proporcionó un poder de más del 99% al estudio. Cuando analizamos las diferencias que existieron entre los individuos en los que se realizó la medición de todos los biomarcadores y en que se aplicaron todos los exámenes propuestos en el protocolo del estudio, no se observaron diferencias significativas en las variables sociodemográficas, ni entre los parámetros bioquímicos y marcadores de exposición en comparación con el grupo en que no se realizaron todas las mediciones, por lo que no esperamos un sesgo de selección en el grupo estudiado.

Este trabajo intenta incorporar nuestra casuística a las series del norte de Europa, a través del establecimiento cuidadoso de la definición de los criterios de inclusión/exclusión, para obtener una muestra de la población de jóvenes varones que cumpliera los requisitos de comparabilidad con las otras series Europeas. Al no contar en España con el servicio militar obligatorio, se optó por obtener una muestra de individuos que cumpliera con los criterios establecidos en el protocolo del estudio europeo: que la población de estudio fuera representativa de la población de individuos jóvenes de fertilidad no conocida en centros de estudio, ya que los sujetos seleccionados además de responder fielmente a tales

requisitos, representan un grupo de individuos con diferentes grados de salud general.

Como resultado del protocolo del estudio, nueve de cada diez jóvenes participantes cursaban estudios universitarios y sólo diez jóvenes tenían únicamente estudios primarios, con lo que los resultados observados subestiman los efectos de la exposición a los OC, dado que los niveles séricos de plaguicidas OC disminuyen conforme aumenta el nivel educativo y socioeconómico, por lo que se esperaría que la magnitud de los efectos observados sean mayores en la población general.

Para evitar posibles sesgos de información no diferencial se contó con entrevistadores previamente entrenados. Por otra parte los técnicos encargados del análisis de las muestras de semen y parámetros bioquímicos, desconocían las características de los individuos del estudio en cuanto a su nivel de exposición a plaguicidas OC y su calidad seminal, lo cual permite descartar un posible sesgo de información diferencial. Además, se realizó una supervisión en control de calidad de los resultados de las determinaciones de laboratorio, de acuerdo al protocolo del estudio europeo, así como una supervisión del procedimiento realizado por los clínicos responsables del examen físico de los voluntarios.

Una limitación del presente estudio es la ambigüedad temporal inherente a los diseños epidemiológicos transversales. En este tipo de diseños las variables se miden de forma simultánea o en un corto período de tiempo, lo que dificulta en muchas ocasiones la interpretación de una posible relación causa-efecto. Además, el valor de una variable en un individuo en el momento en que se realiza el estudio puede ser muy diferente del que tenía un tiempo atrás. Esta limitación es menos importante cuando se estudian características que varían poco en el tiempo, como es el caso de los plaguicidas OC cuya permanencia en el ambiente y el tejido adiposo de los individuos persiste durante años, por lo que se espera una alta correlación entre los valores actuales y los previos.

Es importante contemplar en este tipo de estudios la exposición a otros contaminantes ambientales que son conocidos disruptores endocrinos como es el caso de los plaguicidas organofosforados. Estudios previos han evaluado el

potencial efecto antiandrogénico de plaguicidas organofosforados como el fenitrotión, por ejemplo ratas Sprague Dawley castradas expuestas a propionato de testosterona (PT) (50 µg/día) y fenitrotión (15 ó 30 mg/kg/día), frente a animales tratados con PT y flutamida (50 mg/kg/día), un conocido antiandrogénico. El fenitrotión y la flutamida redujeron el peso de la próstata ventral, la vesícula seminal y el músculo bulbo cavernoso. La dosis más alta del fenitrotión (30 mg/kg) inhibió la acetilcolinesterasa en sangre, demostrando que el fenitrotión es un antagonista competitivo del receptor de andrógenos, con una potencia semejante a la de fármacos antiandrogénicos como la flutamida, y más potente que los antiandrógenos ambientales como el p,p'-DDE. En un estudio longitudinal realizado entre trabajadores de invernaderos, se ha evaluado la asociación entre la exposición plaguicidas organofosforados medidos a través de las concentraciones de dialquilfosfatos en orina y los niveles séricos de hormonas masculinas, observándose un incremento en los niveles de inhibina B y una disminución en los de testosterona conforme aumentaban los niveles en orina de dialquilfosfatos (Aguilar-Garduño et al, en preparación). Debido a que actualmente el uso de plaguicidas organofosforados está muy extendido tanto en la agricultura como a nivel doméstico, la exposición de la población general a estos contaminantes está presente, y más intensamente en aquellas poblaciones que viven en comunidades cercanas a campos de cultivo. Por todo ello, consideramos de interés analizar en estudios futuros el efecto combinado e independiente de los plaguicidas OC y organofosforados, así como de los polimorfismos genéticos que originan poblaciones especialmente susceptibles a los efectos tóxicos causados por estos contaminantes.

Por último, un problema derivado de la costumbre de incluir en los modelos ajustados sólo a los predictores que resultan más fuertemente asociados en el análisis bivalente, que según los criterios estadísticos expliquen hasta el 20% de la variabilidad, con una confiabilidad hasta del 80%, conduce a que frecuentemente se obtengan modelos sesgados. Pues para poder analizar el efecto real de cada variable se debería partir de modelos saturados ya que se

incluirán todas las variables que puedan actuar como confusoras o modificadoras de efecto.

Como hemos podido comprobar al desarrollar los diferentes modelos, algunas variables que no se acercan a la asociación estadística marginal al realizar el análisis no ajustado, al incluirlas en los modelos ajustados no sólo demostraron tener una fuerte asociación, sino que incluso su efecto cambio de sentido, tal como sucedió con la testosterona, el p,p'-DDE o el porcentaje de flagelos anormales frente al NTE o el NTEM. Por el contrario, algunas variables que si presentaron asociaciones significativas en el análisis bivariante, de acuerdo a los principios establecidos, al desarrollar los modelos multivariantes perdieron la significación estadística de su asociación.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos junto con la revisión bibliográfica efectuada nos permiten enunciar las siguientes conclusiones:

1ª. La calidad seminal de los jóvenes del sureste peninsular, evaluada a través de la estimación del número total de espermatozoides (NTE) y número total de espermatozoides móviles (NTEM) se sitúa en una posición intermedia entre las descritas para otras poblaciones europeas, con cifras cercanas a las más altas reportadas. No obstante, cerca de un 20% de los jóvenes investigados presentaron una concentración espermática por debajo del nivel de referencia establecido por la OMS, circunstancia que se ha asociado a un retraso evidente en el tiempo requerido para lograr un embarazo con éxito.

2ª. Los determinantes de la calidad seminal estimada mediante NTE y NTEM, elegidos como indicadores de la salud reproductiva de la población joven almeriense, son múltiples y obedecen a factores atribuibles a la metodología en la realización del test, los modos de vida y la exposición ambiental. De forma consistente en los diferentes modelos analizados, el tiempo de abstinencia y la estación del año, como factores imputables al método, el nivel de escolarización y el trabajo, relacionados con la actividad del joven, y los niveles de hormonas sexuales y de lípidos en sangre, como parámetros bioquímicos, deberían ser tenidos en cuenta como factores de confusión en cualquier estudio de calidad seminal.

3ª. La exposición a mezclas complejas de plaguicidas organoclorados emerge como un determinante de la calidad seminal que no debería ser obviado en ningún estudio epidemiológico que trate de averiguar la influencia de factores ambientales. No obstante, la interpretación del efecto final resultante no es sencillo por dos razones fundamentales: i) las interacciones entre los diferentes compuestos de un mismo o distinto grupo químico, ii) lo aparentemente

impredecible del efecto final dado el carácter antagónico de compuestos de un mismo grupo de plaguicidas.

4ª. Mientras que en los diferentes modelos la exposición a algunos plaguicidas organoclorados se asocia paradójicamente con incrementos en NTE y NTEM, otros tienen el efecto contrario y se asocian con la reducción de ambos parámetros seminales. Interesantemente, estos últimos son clasificados como DE débilmente estrogénicos – caso del endosulfán sulfato, lindano y o,p'-DDT- mientras que los primeros unen una actividad claramente anti-androgénica a su débil carácter estrogénico - caso de p,p'-DDE y vinclozolina.

5ª. Es necesario señalar el importante papel que ha tenido la inclusión, en todos los modelos, de las medidas de colesterol, triglicéridos y lípidos de alta y baja densidad, debido, posiblemente a que la fracción grasa del suero se presenta como un importante factor confusor ya que se relaciona tanto con la exposición -la presencia de plaguicidas OC en sangre es dependiente de los lípidos- como con la síntesis y los niveles de hormonas esteroideas. De hecho, en los diferentes modelos las lipoproteínas de alta densidad presentaron una asociación positiva con el NTE, mientras que el colesterol presentó una asociación negativa con el NTEM.

6ª. El desarrollo de múltiples modelos ha servido para poner de manifiesto la complejidad de cualquier análisis en el que las variables están correlacionadas. Así, la libertad en los diferentes grados de confiabilidad con los que se han construido los modelos ha permitido detectar efectos que de otra manera no hubiera sido posible observar. Por otra parte, al partir de modelos saturados se pueden analizar un mayor número de variables y tener en consideración, a la par, criterios estadísticos y epidemiológicos y de plausibilidad biológica

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abell A, Ernst E, Bonde JP. Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health*. 2000;26(6):492-500.

Aguilar-Garduño C, Lacasaña M, Blanco-Muñoz J, Rodríguez-Barranco M, Bassol S, Cebrían ME. Exposición a plaguicidas organofosforados y su efecto sobre el perfil hormonal masculino en floricultores, seguimiento en las temporadas de lluvias y de secas. E, en preparación.

Andersen AN, Carlsen E, Loft A. Trends in the use of intracytoplasmatic sperm injectionmarked variability between countries. *Hum Reprod Update*. 2008;14(6):593-604.

Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacology*. 2002;179:1-12.

Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jørgensen N, Andersson AM, Krarup T, Keiding N, Skakkebaek NE. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*. 2000;15:366-72.

Andersson AM, Jensen TK, Juul A, Petersen JH, Jørgensen T, Skakkebaek NE. Secular decline in male testosterone and sex hormone binding globulin serum levels in Danish population surveys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4696-705.

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(3):423-34.

Anway M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*. 2006;147(6)(Supplement):43-9.

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005; 308:1466-9.

Arias Verdes JA, Rojas Companioni D, Dierkmeier Corcuela G, Riera Betancourt C, Cabrera Cruz N. Plaguicidas organoclorados, Características. En: ECO. Pp: 7-25. México D.F.; ECO; 1990. Tab. (ECO serie vigilancia, 9).

Asawasinsophon R, Prapamontol T, Prakobvitayakit O, Vaneesorn Y, Mangklabruks A, Hock B. Plasma levels of DDT and their association with reproductive hormones in adult men from northern Thailand. *Sci Total Environ.* 2005;355(1-3):98-105

ATSDR. 2002a. Toxicological profile for ALDRIN/DIELDRIN. Atlanta Georgia US: Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR.

ATSDR. 2005. Toxicological profile for ALPHA-, BETA-, GAMMA-, AND DELTA-HEXACHLOROCYCLOHEXANE. Atlanta Georgia US: Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR.

ATSDR 2002b. Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta Georgia US: Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR.

ATSDR. 2002c. Toxicological profile for HEXACHLOROBENZENE. Atlanta Georgia US: Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR.

ATSDR. 2002d. Toxicological profile for METHOXYCHLOR. Atlanta Georgia US: Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR.

Atterwill CK, Flack JD. Introduction to endocrine toxicology. In Atterwill CK, Flack JD (Eds). *Endocrine toxicology*, Cambridge University Press: Cambridge 1992. pp. 3-11.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod.* 2001;16:2710-7.

Avivar Oyonarte C, Duran Salas I, Molina Arrebola MA, Castilla Alcalá JA, Olea Serrano N, Fernández Cabrera M. La exposición a plaguicidas se asocia con la disminución del recuento espermático. *Rev Lab Clon* 2010;3(1):4-11.

Avivar C, Duran I, Olea N, Fernández MF, Gonzalvo MC, Castilla JA. Estudio de la calidad seminal en población joven del sureste español. *An Clin* 2004;29:81-92.

Ayotte P, Giroux S, Dewailly E, Hernandez Avila M, Farias P, Danis R, Villanueva Diaz C. DDT spraying for malaria control and reproductive function in Mexican men. *Epidemiology*. 2001;12(3):366-7.

Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Effect of chlorinated hydrocarbons on expresión of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2 and 4-hydroxylation of 17beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, 2000;21:1593-9.

Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. DNA damage response in human testes and testicular germ cell tumours: biology and implications for therapy. *Int J Androl*. 2007;1-10.

Bischoff E. The oral efficacy of vardenafil hydrochloride for inducing penile erection in a conscious rabbit model. *J Urol* 2001;165:1316-8.

Bisson M, Hontela A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;180(2):110-7.

Bjerner J, Biernat D, Fosså SD, Bjørø T. Reference intervals for serum testosterone, SHBG, LH and FSH in males from the NORIP project. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(8):873-9.e1-11.

Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*. 1998;352(9135):1172-7.

Botella B, Crespo J, Rivas A, Cerrillo I, Olea-Serrano F, Olea N. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res.* 2004; 96(1): 34-40.

Bradlow HL, Davies DL, Lin G, Sepkovic D, Tiwiri R. Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha/2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ health Perspect.*, 1995;:103(Suppl 7):147-50.

Brien SE, Heaton JPW, Racz WJ, Adams MA. Effects of an environmental anti-androgen on erectile function in an animal penile erection model. *J Urol.* 2000;163(4):1315-21.

Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeny LA, de Gier RP, Roeleveld N. Risk factors for hypospadias. *Eur J Pediatr.* 2007;166:671-8.

Bush B, Bennett AH, Snow JT. Polychlorobiphenyl congeners, p,p'-DDE, and sperm function in humans. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1986;15:333-41.

Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 2007;29:1-5.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305:609-13.

Carreño J, Rivas A, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Mariscal M, Olea N, et al. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res.* 2007;103(1):55-61.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention. 2003.

Chen L, Sun XD, Zhao J, Yang AG, Huang WQ. Distribution, cloning and sequencing of GnRH, its receptor, and effects of gastric acid secretion of GnRH analogue in gastric parietal cells of rats. *Life Sciences.* 2005;76:1351-65.

Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum Reprod.* 1998;13(12):3394-8.

Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U. Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl.* 2008;31(2):241-8.

Cisneros FJ. DNA methylation and male infertility. *Fron Biosci.* 2004; 9:1189-200.

Cocco P, Loviselli A, Fadda D, Ibba A, Melis M, Oppo A, Serra S, Taberlet A, Tocco MG, Flore C. Serum sex hormones in men occupationally exposed to dichloro-diphenyl-trichloro ethane (DDT) as young adults. *J Endocrinol.* 2004 Sep;182(3):391-7.

Colbert NKW, Pelletier NC, Cote JM, Concannon JB, Jurdak NA, Minott SB & Markowski VP. Perinatal exposure to low levels of the environmental antiandrogen vinclozolin alters sex-differentiated social play and sexual behaviors in the rat. *Environmental Health Perspectives.* 2005; 113 700-7.

Colby HD, Longhurst PA. Toxicology of the adrenal gland. In: Atterwill CK, Flack JD (Eds) *Endocrine toxicology*, Cambridge University Press. Cambridge, 1992. pp. 3-11.

Covaci A, Boer J, Rayan JJ, Voorspoels S, Schepens P. Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue. *Environ Res.* 2002; 88:210-8.

Crazzolara S, Wunder D, Nägeli E, Bodmer C, Graf S, Birkhäuser MH. Semen parameters in a fertile Swiss population. *Swiss Med Wkly.* 2007;137:166-72.

Dallinga JW, Moonen EJC, Dumoulin JCM, Evers JLH, Geraedts JPM, Kleinjans JCS. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Human Reprod.* 2002;17:1973-9.

Dalvie MA, Myers JE, Lou Thompson M, Dyer S, Robins TG, Omar S, Riebow J, Molekwa J, Kruger P, Millar R. The hormonal effects of long-term DDT exposure on malaria vector-control workers in Limpopo Province, South Africa. *Environ Res.* 2004;96(1):9-19.

Damgaard IN, Skakkebæk NE, Toppari J, Virtanen HE, Shen H, Schramm KW, Petersen JH, Jensen TK, Main KM, Nordic Cryptorchidism Study Group. Persistent Pesticides in Human Breast Milk and Cryptorchidism. *Environ Health Perspect.* 2006;114(7):1133-8.

Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G (Eds). Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. WHO and IPCS, 2002:11-32.

DeJager C, Farias P, Barraza-Villarreal A, Avila MH, Ayotte P, Dewailly E, Dombrowski C, et al. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study. *J Androl.* 2006;27(1):16-27.

Densmore VS, Urbanski RF Relative Effect of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I and GnRH-II on Gonadotropin Release. *J Clin Endocrinol & Metab* 2003;88(5):2126-34.

Dieckmann WJ, Davis ME, Rynkiewicz SM, Pottinger SM. Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? Presented at Seventy Six Annual Meeting of the American Gynecological Society. Lake Placid, N.Y., USA, 1953:1062-81.

Dodds E, Lawson W. Synthetic oestrogenic agents without the phenantrene nucleus. *Nature.* 1936;137.

Durán, I. Salud reproductiva en jóvenes y su relación con la exposición a disruptores endocrinos. Tesis Doctoral. Departamento de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 2007.

Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reprod.* 2005;20(4):1006-12.

Esteller M, Hernan JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002; 196:1-7.

Evans RM. Clinical applications of new aromatase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1994;16:129-43.

Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviella AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged man: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:589-98.

Fernández MF, Rivas A, Olea-Serrano F, Cerrillo I, Molina-Molina JM, Araque P, et al. Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal Bioanal Chem.* 2004;379(1):163-70.

Fernandez MF, Olmos B, Granada A, López-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, Cruz M, et al. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect.* 2007a;115 Suppl 1:8-14.

Fernández MF, Olmos B, Olea N. Exposure to endocrine disruptors and male urogenital tract malformations [cryptorchidism and hypospadias]. *Gac Sanit.* 2007b;21(6):500-14.

Fernández MF, Santa-Marina L, Ibarluzea J, Exposito J, Aurrekoetxea JJ, Torne P, Laguna J, Rueda A, Pedraza V, Olea N. Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: a biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *European J Cancer.* 2007c;43:1290-9.

Fernández P, Grimalt JO. On the Global Distribution of Persistent Organic Pollutants. *Chimia.* 2003; 57(9):514-21.

Franken DR, Smith M, Menkveld R, Kruger TF, Sekadde-Kigonda C, Mbizvo M, et al. The development of a continuous quality control programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. *Hum Reprod.* 2000;15:667–71.

Fujii S, Sato S, Fukui A, Kimura H, Kasai G, Saito Y. Continuous administration of gonadotropin-releasing hormone agonist during the luteal phase in IVF. *Human Reproduction* 2001;16(8):1671-5.

García AM, Fletcher T, Benavides FG, Orts E. Parental agricultural work and selected congenital malformations. *Am J Epidemiol.* 1999;149(1):64-74.

García-Rodríguez J, García-Martín M, Nogueras-Ocaña M, De Dios Luna-del-Castillo J, Espigares García M, Olea N, et al. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect.* 1996;104:1090-5.

Giwercman A, Kledal T, Schwartz M, Giwercman YL, Leffers H, Zazzi H, et al. Preserved male fertility despite decreased androgen sensitivity caused by a mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(6):2253-9.

Giwercman A, Rylander L, Hagmar L, Giwercman YL. Ethnic differences in occurrence of TDS-genetics and/or environment? *Int J Androl.* 2006;29(1):291-7.

Glisson SN, Karczman AG, Barnes L. Effects of diisopropyl phosphorofluoridate on acetylcholine, cholinesterase and catecholamines of general parts of rabbit brain. *Neuropharmacology.* 1974;13:623-31.

Golden AL, Moline JM, Bar-Charma N. Male reproduction and environmental and occupational exposures: A review of epidemiological methods. *Salud Pública de México.* 1999;41(Sup 2):93-105.

Gray LE, Ostby J, Cooper RL, Kelce WR. The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters reproductive tract and behaviour without affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats. *Toxicol Ind Health*. 1999;15:37-47.

Gray LE, Ostby J, Kelce WR. Developmental effects of an environmental antiandrogen: fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;129:46-52.

Gupta M, Bagchi GK, Gupta SD, Sasmal D, Chatterjee T, Day SN. Changes of acetylcholine, catecholamines and amino acids in mice brain following treatment with nuvacron and furadane. *Toxicology* 1984;30(2)171-5.

Hagmar L, Rylander L, Dyremark E, Klasson-Wehler E, Erfurth EM. Plasma concentrations of persistent organochlorines in relation to thyrotropin and thyroid hormone levels in women. *Int Arch Occup Environ Health*, 2001;74:184-8.

Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2222-5.

Hardley J, Flack JD, Buckingham JC. Modulation of corticotrophin release in vitro by methylxanthines and adenosine analogues. *Br J Pharmacol*. 1990;100(suppl):337.

Harmer SC, Pepper DJ, Cooke K, Bennett HP, Bicknell AB. Evidence of a possible role for Lys-gamma3-MSH in the regulation of adipocyte function. *J Endocrinol*. 2008;196(1):149-58.

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;111:1505-11.

Hauser R. The environment and male fertility: recent research on emerging chemicals and semen quality. *Semin Reprod Med*. 2006;24(3):156-67.

Herrera JC, Brotons M. Results of the residue monitoring programme of Andalusian agricultural department in Almería for fruits and vegetables. Second European Pesticide Residue Workshop, Almería. 1998.

Holliday R. DNA methylation and epigenetics mechanisms. *Cell Biophys*. 1989; 15:15-20.

Hornsby PJ, Crivello JF. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of adrenal cortex. Part1: A background review. *Mol Cell Endocrinol*. 1983;30:1-20.

Hosmer DW Jr, Lemeshow S. Model Building Strategies and Methods for Logistic Regression. *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons. 1989.

HSDB 2008a. DDD. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008a.

HSDB 2008b. DDE. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008b.

HSDB 2008c. DDT. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008c.

HSDB 2008d. Dieldrin. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008d.

HSDB 2008e. Endosulfan. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008e.

HSDB 2008f. Endrin. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008f.

HSDB 2008h. HCCH. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB),TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008h.

HSDB 2008i. Lindane. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB), TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008i.

HSDB. 2008j Mirex. EEUU. NLM. Hazardous Substances Data Bank (HSDB), TOXNET system Consulta en (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) on May 30, 2008j.

Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol.* 2003;170(1):5-11.

Ibarluzea JM J, Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, Expósito J, et al. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control.* 2004;15(6):591-600.

Irvine DS. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod.* 1995;10:53-9.

Iwamoto T, Hoshino T, Nishida T, Baaba K, Matsusita T, Kaneko S, et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod.* 2006;21:760-5.

Jegou B, Pineau C, Toppari J. Spermatogenesis in vitro in mammals. En: *Assisted Reproductive Technology. Accomplishments and New Horizons.* C. J. de Jonge y C. L. R. Barratt (Eds.), Cambridge, Cambridge University Press, págs. 3-25.

Jensen TK, Jacobsen R, Christensen K, Nielsen NC, Bostofte E. Good semen quality and life expectancy: a cohort study of 43,277 men. *Am J Epidemiol.* 2009;170(5):559-65.

Jensen TK, Jorgensen N, Punab M, Haugen TB, Suominen J, Zilaitiene B, et al. Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. *Am J Epidemiol.* 2004;159(1):49-58.

Joensen UN, Bossi R, Leffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect.* 2009;117(6):923-7.

Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001;293:1068-70.

Jørgensen N, Andersen A-G, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod.* 2001;16:1012-9.

Jørgensen N, Carlsen E, Nerømoen I, Punab M, Suominen J, Andersen AG, et al. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod.* 2002;17(8):2199-208.

Jørgensen N, Asklund C, Carlsen E, Skakkebaek NE. Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. *Int J Androl.* 2006;29(1):54-61.

Jørgensen N, Carlsen E, Nerømoen I, Punab M, Suominen J, Anderson AG, Anderson AM, Haugen TB, Horte A, Jensen TK, Magnus O, Petersen JH, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Human Reprod.* 2004;17(8):2199-208.

Jouannet P, Wang C, Eustache F, Jensen TK, Auger J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS.* 2001;109:333-44.

Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kempainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 1995;375(58):1-5.

Kelce WR, Wilson EM. Environmental antiandrogens development effects, molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Molecular Medicine.* 1997;75:198-207.

Koloszar S, Fejes I, Zavaczki Z, Daru J, Szollosi J, Pal A. Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males. *Arch Androl.* 2005;51(4):299-304.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl.* 2006;27(3):450-2.

Kortenkamp A. Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective. *Int J Androl.* 2006;29:193-8.

Kortenkamp A. Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Environmental Health Perspectives.* 2007;115(Suppl 1):98-105.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons K, Swanson RJ, Mata JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49:112-7.

Kumar A, Chaturvedi PK, Mohanty BP. Hipoandrogenaemia is associated with subclinical hipotiroidism in men. *Int J Androl.* 2007;30:14-20.

Kupelian V, Hayes FJ, Link CL, Rosen R, McKinlay JB. Inverse association of testosterone and the metabolic syndrome in men is consistent across race and ethnic groups. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3403-10.

Lacasaña M, Farias P. Plaguicidas. En: *Contaminación Ambiental y Salud de los Niños en América Latina y el Caribe.* Romieu I, López S. Eds. Cuernavaca, Mor.: Instituto Nacional de Salud Pública. 2002.

Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, Gray LE Jr. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci.* 2000;56(2):389-99.

Lane N, dean W, Erhardt S, Hajkova P, Suruni A, Walter J, Reik W. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis.* 2003;35:88-93.

Larsen W. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (Eds). *William's Textbook of Endocrinology*, 10th ed. Philadelphia: Saunders. 2002.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):68-75.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of DNA methyltransferase gene results in embryogenic lethality. *Cell.* 1992;69:915-26.

Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, Salvatierra M, Olea-Serrano F, Olea N. Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta.* 2007;28(7):631-8.

Luconi M, Forti G, Balde E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2002;80:369-81.

Lund AH, van Lohuzen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 2004;18:2315-35.

Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol.* 2004;5(6):363-71.

Lutz W. Fertility rates and future population trends: will Europe's birth rate recover or continue to decline? *Int J Androl.* 2006;29(1):25-33.

Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod.* 2005;20(1):208-15.

Maness SC, McDonnell DP, Gaido KW. Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;151(1):135-42.

McElreavey K, Quintana-Murci L. Y chromosome haplogroups: a correlation with testicular dysgenesis syndrome? *APMIS.* 2003;111(1):106-13.

Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA*. 2001;286(10):1195-200.

Molarius A, Parsons RW, Dobson AJ, Evans A, Fortmann SP, Jamrozik K, et al. Trends in cigarette smoking in 36 populations from the early 1980s to the mid-1990s: findings from the WHO MONICA Project. *Am J Public Health*. 2001;91(2):206-12.

Moreno Frías M, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL, Mateu Sanchez M, Olea F, Olea N, Mateu Sanchez J. Analysis of lindane, viclozolin, aldrin, p-p'-DDE, o-p'-DDT and p-p'-DDT in human serum using GC/EDC and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;760:1-15.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14(1):R47-R58.

Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics*. 2004;113:e472-e486.

Mullerova D, Kpopecky J. White adipose tissue; Storage and effector site for environment pollutants. *Physiol Res*. 2007;56:375-381.

Mulligan T, Frick MF, Zuraw QC, Stemhagen A, McWhirter C. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract*. 2006;60(7):762-9.

Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Brixen K, Petersen PH, Haug E, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2696-705.

Nyboe AA, Erb K. Register data on Assisted Reproductive Technology (ART) in Europe including a detailed description of ART in Denmark. *Int J Androl*. 2006;29(1):12-6.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999; 99:247-57.

Olea N, Avivar C. Disruptores endocrinos en Biología de la Reproducción. ASEBIR Vol. 8, nº2. December 2003.

Olea N, Fernandez MF. Chemicals in the environment and human male fertility. *Occup Environ Med*. 2007;64(7):430-1.

Olea N. 2003. Más Plaguicidas en Almería. *Ambiente Ecológico*, 86, Ene-Mar.n 86 / Enero - Marzo del [verdes.izquierdaverde@nodo50.org\(6\)](mailto:verdes.izquierdaverde@nodo50.org)

Oliva A, Spira A, Multigner L. Reproductive epidemiology. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction*. 2001;16(8):1768-76.

Padmanabhan V, McNeilly AS. Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*. 2001;121:21-30.

Pérez-Hoyos S. Introducción a la regresión logística. (Quaderns de Salut Pública i Administració de Serveis de Salut No. 7) Valencia, ES. Escola Valenciana d'Estudis per a la Salut, 2003.

Phillips DL, Smith AB, Burse VW, Steele G, Needham LL, Hannon HH. Half-life of polychlorinated biphenyls in occupationally exposed workers. *Arch Environ Health*. 1989;44:351-4.

Porta M, Ballester F, Ribas-Fitó N, Puigdomènech E, Selva J, Llop S. Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población general española. Criterios para un diagnóstico de la situación actual. *Gac Sanit*. 2006;20:233-8.

Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, Sunyer J, Ribas-Fitó N, Grupo de Trabajo sobre Compuestos Tóxicos Persistentes y Salud del IMIM. Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población española: el rompecabezas sin piezas y la protección de la salud pública. *Gac Sanit*, 2002;16(3):257-66.

Porta M, Puigdomenech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fito N, Domínguez-Boada L, Martín-Olmedo P, Olea N, Llop S, Fernandez M. Estudios realizados en España sobre concentraciones en humanos de compuestos tóxicos persistentes. *Gac Sanit.* 2008;22(3):248-66.

Prado-Flores G, Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Herrero-Hernández E. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Rev Esp Salud Pública.* 2002;76:133-47.

Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas, (PISSQ). El DDT y sus derivados. Ginebra Suiza: Organización Mundial de la Salud. 1982. 222 p. ISBN-10 927531425X. (Criterios de Salud Ambiental No. 9).

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(1):188-96.

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(12):1372-9.

Ratcliffe JM, Gladen BC, Wilcox AJ, Herbst AL. Does early exposure to maternal smoking affect future fertility in adult males? *Reprod Toxicol.* 1992;6(4):297-307.

Recio R, Ocampo-Gómez G, Morán-Martínez J, Borja-Aburto V, López-Cervantes M, Uribe M, Torres-Sánchez L, Cebrián ME. Pesticide exposure alters follicle stimulating hormone levels in Mexican agricultural workers. *Environ Health Perspect* 2005;113(9):1160-3.

Rehulka J, Kraus M. Regulation of the corticosterone metabolism in liver cell fractions in young and adult rats: cofactor requirements, effects of stress and phenobarbital treatment. *Physiol Bohemoslov.* 1987;36:21-32.

Richthoff J, Rylander L, Jonsson BAG, Akesson H, Hagmar L, Nilsson-Ehle P, et al. Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the general Swedish population. *Environ Health Perspect.* 2003;111:409-13.

Rivelin WE. The effects of drugs and chemicals upon the structure of the adrenal gland. *Funadam Appl Toxicol.* 1984;4:105-19.

Rodriguez A, Muller DC, Metter EJ, Maggio M, Harman SM, Blackman MR, et al. Aging, androgens, and the metabolic syndrome in a longitudinal study of aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3568-72.

Roemer I, Reik W, Ddean W, Klose J. Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr Biol.* 1997;7:277-80.

Ronis MJ, Badger TM. Toxic interactions between fungicides that inhibit ergosterol biosynthesis and phosphorothioate insecticides in the male rat and bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;130(2):221-8.

Ruden DM, Xiao L, Garfinkel MD, Lu X. Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer. *Hum Mol Genet.* 2005;14(Spec No. 1):R149-R155.

Sarkar R, Mohankumar, KP, Chowdhury, M. Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos on the hypothalamopituitary- gonad axis in adult male rat. *J Reprod Fertil.* 2000;118:29-38.

Schnack TH, Zdravkovic S, Myrup C, Westergaard T, Wohlfahrt J, Melbye M. Familial aggregation of cryptorchidism-a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008;167(12):14537.

Schrader TJ, Cooke GM. Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity in vitro. *Toxicol Sci.* 2000;53:278-88.

Shah MN, Devesa SS, Zhu K, McGlynn KA. Trends in testicular germ cell tumours by ethnic group in the United States. *Int J Androl*. 2007;30(4):206-13.

Sharpe RM. "Additional" effects of phthalate mixtures on fetal testosterone production. *Toxicol Sci*. 2008;105(1):1-4.

Skakkebaek NE, Rajpert-De ME, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*. 2001;16(5):972-8.

Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*; Iowa, USA: Iowa State University Press. 1980

Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*. 1998;158:327-39.

Spindel E. Action of the methylxanthines on the pituitary and pituitary-dependent hormones. *Prog Clin Biol Res*. 1984;158:355-63.

Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, Spano M, Andersen CY, Frydenberg M, et al. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts? *Epidemiol*. 2003;14(3):278-86.

Supornsilchai V. Effects of endocrine disruptors on adrenocortical and leydig cell steroidogenesis. Tesis Doctoral. Estocolmo SE. Department of Women and Child Health, Karolinska Institutet. 2007.

Svechnikov K, Supornsilchai V, Strand ML, Wahlgren A, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Söder O. Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Endocrinology*. 2005;187:117-24.

Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect*. 2003;111:414-20.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect.* 1997;105(11):1228-32.

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.

Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res.* 2008;108(2):177-84.

Tamura H, Maness SC, Reischmann K, Dorman DC, Gray LE, Gaido KW. Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion. *Toxicology Science.* 2001;60:56-62.

Thomas JA. Toxicology of the adrenal, thyroid and endocrine pancreas. In: Ballantyne, B, Mars T, Turner P (Eds) *General and Applied Toxicology.* McMillan: Basingstoke 1993. pp. 807-20.

Thorup J, Cortes D, Petersen BL. The incidence of bilateral cryptorchidism is increased and the fertility potential is reduced in sons born to mothers who have smoked during pregnancy. *J Urol.* 2006;176(2):734-7.

Toft G, Hagmar L, Giwercman A, Bonde JP. Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reprod Toxicol.* 2004;19:5-26.

Toppari J. Environmental endocrine disrupters. *Sex Dev.* 2008;2(4-5):260-7.

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(1):196-202.

Tuomisto J, Holl K, Rantakokko P, Koskela P, Hallmans G, Wadell G, et al. Maternal smoking during pregnancy and testicular cancer in the sons: A nested case-control study and a metaanalysis. *Eur J Cancer.* 2009;45(9):1640-8.

United Nations. World population Prospects: The 2006 Revision. New York, United Nations. 2007.

Van de Graaff KM, Rhees RW. Shaum's outline of theory and problems of human anatomy and physiology. México: McGraw Hill, 1999.

Vázquez JJ. Hormonal control of testicular function. In: Testicular and epididymal pathology. Nistal M, Paniagua R (Eds). Thieme- Stratton Inc. and Georg Thieme Verlag. New York, 1984; pp.ag. 63-71.

Veeramachaneni DNR, Palmer J S, Amann R P, Kane C M, Higuchi TT, Pau K- YF. Disruption of sexual function, FSH secretion, and spermiogenesis in rabbits following developmental exposure to vinclozolin, a fungicide. *Reproduction*. 2006;131:805–16.

Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a metaanalysis. *Fertil Steril*. 1994;61(1):35-43.

Walker RF, Cooper RL. Toxic effects of xenobiotics on pituitary gland. In: Atterwill, CK y Flack JD (Eds). *Endocrine Toxicology*, Cambridge: Cambridge University Press: 1992. pp 3-11.

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5293-300.

Welsh M, Saunders PT, Fisker 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;118(4):1479-90.

WHO (World Health Organization). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. 1999. New York:Cambridge University Press.

Wu FC, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, et al. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and

modifiable risk factors: the European Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2737-45.

Zaidi SS, Bhatnagar VK, Gandhi SJ, Shah MP, Kulkarni PK, Saiyed HN. Assessment of thyroid function in pesticide formulators. *Hum Exp Toxicol.* 2000;19(9):497-501.

ANEXOS

ANEXO I



CUESTIONARIO JÓVENES

Identificación:

--	--	--	--

Código:

M	I							
---	---	--	--	--	--	--	--	--

Este cuestionario es parte de un proyecto científico, carente de fines lucrativos ni comerciales, que pretende describir los distintos factores que determinan la salud reproductiva humana.

En este estudio queremos averiguar si la calidad seminal está determinada por las condiciones de trabajo, los modos de vida y el estado de salud.

Le recordamos que ni los gametos ni ninguna parte de las muestras entregadas, así como cualquier dato que aporte, serán utilizados para fines reproductivos, experimentales o comerciales, y que tras realizar los respectivos análisis, todas las muestras serán destruidas.

Algunas preguntas podrían ser un poco difíciles de contestar pero le pedimos que conteste tan precisamente como le sea posible.

La información que usted da se mantendrá en completa confidencialidad y su nombre no será registrado junto con sus respuestas.

Su participación es, por supuesto, voluntaria.

Es importante para los resultados del proyecto, que participe en la medida que le sea posible, por eso le rogamos su colaboración.

Lugar: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del participante: _____

NO RESPUESTA:

Dirigido a jóvenes que por diversos motivos no desean participar en el estudio.

¿Ha sido previamente informado del estudio?

Sí: _____ No. _____

Motivo de no participación:

No quiere: _____ NS/NC: _____

Encuestador: _____

A. PREGUNTAS GENERALES**A1. ¿Cómo describiría su salud general?**

Muy buena: и
Buena: и
Mala: и
Muy mala: и

A2. ¿Tiene/ha tenido alguna enfermedad crónica ó por un largo período de tiempo?

No: и
Sí: и

Si contestó **SÍ**, indique qué enfermedad y cuánto tiempo ha estado enfermo.

A3. ¿Ha tomado alguna medicación durante los últimos 3 meses?

No: и
Sí: и

Si contestó **SÍ**, por favor especifique debajo:

Nombre de la medicación	Para qué enfermedad	Dosis
<i>P. ej.: Ibuprofeno</i>	<i>Dolor muscular</i>	

ALGUNAS DE LAS PREGUNTAS SIGUIENTES SE REFIEREN A ELEMENTOS IMPORTANTES DE SU INFANCIA Y AL PERÍODO EN QUE SU MADRE ESTABA EMBARAZADA DE USTED (SI ES POSIBLE PREGUNTE DIRECTAMENTE A SU MADRE).

A4. ¿Cuándo nació?

Día, mes y año: ____/____/19____

¿Dónde vivía su madre, mientras estaba embarazada de usted?

Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal: _____.

¿Cuánto tiempo vivió usted allí? _____ Años

¿Dónde vive usted ahora?

Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal : _____

¿Cuánto tiempo lleva viviendo en este lugar? _____ Años

Especifique donde ha vivido usted en el plazo de los últimos dos años:

Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal: _____
 Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal: _____
 Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal: _____

A5. ¿Dónde nació su madre?

Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal: _____

¿Dónde nació su padre?

Localidad: _____ Provincia: _____ Código postal: _____

A6. ¿Fumaba su madre mientras estaba embarazada de usted?

No lo sabe: и
 No: и
 Sí: и

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre: и

A7. ¿Se sometió su madre a algún tratamiento cuando estaba embarazada de usted?

No lo sabe: и
 No: и
 Sí: и

Si contestó SÍ, qué tipo: _____

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre: и

A8. ¿Trabajó su madre, mientras estaba embarazada de usted?

No lo sabe: и
 No: и
 Sí: и

Si contestó SÍ, qué tipo de trabajo: _____

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre: и

A9. Nos interesa saber si su nacimiento ocurrió tras 9 meses de embarazo:

Sí: и
 No, pretérmino и, en qué semana _____
 No, postérmino и en qué semana _____
 No lo sabe: и

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre: и

A10. ¿Cuáles fueron sus medidas al nacer?

Peso: _____ gramos

Longitud: _____ cm

No lo sabe: и

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre: и

A11. ¿Tuvo alguna enfermedad grave en el primer año de su vida?

No lo sabe: и

No: и

Sí: и

Si contestó SÍ, qué enfermedad: _____

Marque aquí si ha recibido la información directamente de su madre: и

A12. ¿Fumaban sus padres cuando usted era niño?

Sí, ambos: и

Sí, uno de mis padres: и

No: и

No lo sabe: и

Marque aquí si recibió la información directamente de sus padres: и

B. CONDICIONES DE SALUD

B1. ¿Ha recibido algún tratamiento médico o quirúrgico en uno ó ambos testículos?

No: и

Sí, operación: и (Operación(es)-año(s): 19__) _____, _____

Sí, tratamiento hormonal: и (Comienzo del tratamiento: 19__) _____, _____

No lo sabe: и

¿Nació con uno ó ambos testículos fuera del escroto, pero descendió/descendieron sin tratamiento?

Sí, un testículo: и ¿Derecho ó izquierdo? _____

Sí, ambos testículos: и

No: и

No lo sabe: и

B2. ¿Ha padecido paperas de adulto?

No lo sabe: и **Continúe en B5**

No: и **Continúe en B5**

Sí: и

B3. ¿Qué edad tenía cuando tuvo paperas? _____ año

B4. ¿Tuvo alguna complicación testicular relacionada con las paperas?

No lo sabe: и
 Sí, en un testículo: и
 Sí, ambos: и
 No: и

B5. ¿Ha sido alguna vez golpeado de forma que causara hinchazón, hematoma ó cardenal en el escroto?

Sí: и año: 19____
 No: и

B6. ¿Ha sido alguna vez operado de alguna de las siguientes enfermedades?

	Sí:	Año:	No:	No sabe:
Hernia inguinal:	и	19____	и	и
Varicocele:	и	19____	и	и
Torsión de testículos:	и	19____	и	и
Cáncer testicular:	и	19____	и	и
Otras dolencias en pene tracto urinario ó escroto:	и	19____	и	и
	и	19____	и	и
	и	19____	и	и

Si contestó SÍ, por favor explique:

B7. ¿Ha sido alguna vez informado por un médico de que tiene una ó más de las siguientes enfermedades?

	Sí:	Año:	No:	No sabe:
Inflamación de epidídimo	и	19____	и	и
Inflamación de la vejiga	и	19____	и	и
Gonorrea	и	19____	и	и
Infección por clamidia	и	19____	и	и
Inflamación de próstata	и	19____	и	и
Varicocele en escroto	и	19____	и	и
Hernia inguinal	и	19____	и	и
Diabetes	и	19____	и	и
Enfermedad de tiroides	и	19____	и	и

B8. ¿Está satisfecho de su vida sexual?

Sí: и
 No: и

Si contestó no, ¿por qué no?	Frecuentemente	A veces	Nunca
Inapetencia	и	и	и
Problemas con erección	и	и	и
Eyacuación precoz	и	и	и
No eyacuación	и	и	и
Otros problemas	и	и	и

C. ESTILO DE VIDA Y CONDICIONES DE TRABAJO

C1. ¿Fuma?

No: и
 Sí, cigarrillos: и, número por día: _____
 Sí, otros: и, qué tipo y cuántos al día _____

C2. ¿Cuántos años seguidos ha fumado?

(si hubo períodos en los que no fumó, deduzcalos y si nunca fumó, ponga 0) _____ años

C3. ¿Cuánto de las bebidas siguientes ha bebido en la última semana?

Cerveza: _____ bebidas a la semana (1 tubo = 1 bebida)
 Vino: _____ bebidas a la semana (1 vaso = 1 bebida)
 Licores: _____ bebidas a la semana (3 cubatas = 1 bebida)

C4. ¿Qué tipo de agua bebe?

Agua del grifo: _____ vaso(s) al día
 Agua mineral: _____ vaso(s) al día

C5. ¿Cóme comida ecológica?

Sí: и No: и

C6. ¿Va al Instituto/Universidad?

Sí: и CONTINUE EN LA SECCIÓN D.
 No: и

¿Qué edad tenía cuando abandonó el Colegio/Instituto? _____ años

¿Cuántos años ha ido al colegio? _____ años

¿Cuál es la graduación más alta que ha obtenido?

Primaria. и
 Diplomatura и
 Licenciatura и
 Estudiante и
 Sin estudios и

Las preguntas que vienen a continuación (C7 a C12) hacen referencia a su trabajo durante los tres últimos meses.

C7. ¿Ha trabajado regularmente en los tres últimos meses?

No: CONTINÚE EN LA SECCIÓN D.
Sí:

C8. ¿Cuántas horas por semana ha trabajado de media en los últimos 3 meses?

_____ Horas a la semana

C9. ¿Ha tenido un horario más o menos regular en los últimos 3 meses?

Sí: de ___ a _____ (p.ej. de 8 a 16)
No, horario flexible:

C10. ¿Qué parte del día/noche ha trabajado en los últimos 3 meses?

Principalmente durante el día (6-17):
Principalmente durante la tarde (17-24):
Principalmente durante la noche (0-6):
Trabajo por turnos:

C11. ¿Cuál ha sido su postura física de trabajo en los últimos 3 meses?

Principalmente sentado en un automóvil _____ horas/día
Principalmente sentado en un mostrador _____ horas/día
Principalmente de pie _____ horas/día
Principalmente caminando _____ horas/día
Turno entre caminar, de pie, sentad

C12. ¿Con qué frecuencia ha realizado en los últimos 3 meses las siguientes tareas o trabajado en los siguientes ambientes? (Marque cada línea con una cruz)

	Todos los días:	Todas las semanas:	Rara vez/ nunca
-Pintura industrial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Pintura de edificios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Soldador de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Torno, taladro y cortador de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Desengrasantes de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Limpieza con disolventes orgánicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Pegamento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Soldador	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Uso de herbicidas o pesticidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

-Producción fotográfica	и	и	и
-Trabajo con óxido de nitrógeno	и	и	и
-Trabajo de laboratorio	и	и	и
-Trabajo con pesticidas	и	и	и
-Trabajo a temperaturas >50 °C	и	и	и
-Exposición a radiación	и	и	и
-¿Has sufrido stress?	и	и	и

D. HISTORIA COMO PADRE

D1. ¿Ha tenido hijos? ¿Sabe si es responsable de algún embarazo?

No: и

Sí: и

Si contestó SÍ:

¿Cuál es el número de hijos? _____

D2. *Algunas parejas tienen períodos en su vida en los que no hacen nada para evitar embarazos, pero no quedan embarazadas de todos modos.*

¿Ha mantenido alguna vez relaciones sexuales (coito) regularmente sin usar anticonceptivos/preservativos durante al menos 1 año sin que su pareja quede embarazada?

No: и CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA

Sí: и

LAS SIGUIENTES PREGUNTAS SE REFIEREN AL PERÍODO EN QUE INTENTÓ DEJAR EMBARAZADA A SU COMPAÑERA DURANTE UN AÑO.

D3. ¿Cuánto tiempo intentaron usted y su pareja en quedar embarazada?

a. _____ meses y/o _____ años, antes de conseguirlo

b. Abandonamos tras _____ meses y/o _____ años

D4. ¿Le han hecho alguna vez algún test para averiguar por qué su pareja no quedaba embarazada?

No: и CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA

Sí: и

Si contestó SÍ, ¿cuál fue la razón? _____

D5. ¿Recibió tratamiento para el problema de infertilidad?

No: и CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA

Sí: и

Si contestó SÍ, ¿qué tratamiento recibió y, tuvo éxito?

D6. ¿Cuánto tiempo intentaron usted y su pareja que quedara embarazada antes de que fueran a tratamiento?

_____ meses y/o _____ años

Si cree que existen otras condiciones referentes a su trabajo, condiciones de vida o salud, deberíamos saberlas, por favor escríbalas aquí.

HA LLEGADO AL FINAL

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

ANEXO II

EXAMEN FÍSICO

Las medidas/evaluaciones de altura, peso, disposición de testículos, varicocele e hidrocele deben ser efectuadas con el hombre de pie.

La evaluación del vello púbico deberá realizarse de acuerdo con la clasificación de Tanner (ver ilustraciones).

Para la evaluación del tamaño de los testículos se deberá emplear un orquidómetro.

Fecha: ____/____/____/

Médico: _____

Identificación:

--	--	--	--

Código:

M	I								
---	---	--	--	--	--	--	--	--	--

ALTURA: _____ cm PESO: _____ kg

REGIÓN GENITAL:

Cicatriz quirúrgica: No: _____ Sí: _____
(describe en observaciones)

Vello púbico: Estado de Tanner: _____
(1-6)

Pene: Normal: _____ Anormal: _____
(describe en observaciones)

Disposición de testículos: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(HS=alto en el escroto, LS=bajo en el escroto, I=en el canal inguinal, N=no palpable)

Tamaño de testículos: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(Orchidómetro)

Consistencia de los testículos: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(N=normal, S=blando, H=duro)

Tumor testicular: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(N=no, Y=sí)

Epidídimo: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(N=normal, A=anormal, describalo en observaciones)

Vas deferens: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(P=palpable, N=no-palpable)

Varicocele: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(0=no varicocele, 1=solo detectado durante el procecimiento, maniobra de Valsava, 2=palpable sin procedimiento Valsava, 3=visible)

Hidrocele: Izquierdo: _____ Derecho: _____
(Y=sí, N=no)

OBSERVACIONES:

MUESTRA DE SANGRE: