

**Incidencia de los factores ambientales en la reproducción
humana: nuevas tecnologías y hábitos tóxicos.
Diseño Experimental.**

**Impact of environmental factors in human
reproduction: new technologies and toxic habits.
Experimental Design.**

Trabajo de Fin de Grado

MIKEL SANTOS ARRIETA

Tutorizado por Dra. Ana Bolaños Martín y Anya Trujillo González

Grado en Biología. Julio 2018

**SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN
TRABAJO DE FIN DE GRADO
Curso Académico: 2017/2018**

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 54109286-S | Mikel Santos Arrieta

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo de Fin de Grado.

TÍTULO

Incidencia de los factores ambientales en la reproducción humana: nuevas tecnologías y hábitos tóxicos. Diseño Experimental.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

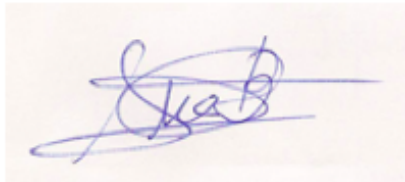
D./Dña. Ana Bolaños Martín

Profesor/a del Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología

y D./Dña. Anya Trujillo González.

Cotutora

Autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo de Fin de Grado



Fdo.: Ana Bolaños



Fdo.: Anya Trujillo

La Laguna, a 2 de Julio de 2018

Firma del interesado/a



Fdo.: Mikel Santos

Índice

Resumen	1
• Palabras clave	1
Abstract	1
• Keywords	1
Introducción	2
• Causas de infertilidad en la pareja	2
• Factores de estudio	3
• Espermatogénesis y regulación de la función gonadal testicular.....	5
Objetivos.....	7
• Objetivo general.....	7
• Objetivos específicos.....	7
Metodología.....	8
1. Población de estudio	8
2. Recolección y análisis de las muestras biológicas	12
• Preparación de muestras de semen.....	14
• Estudio básico del espermiograma.....	15
3. Factores de estudio.....	16
3.1. Nuevas tecnologías.....	16
• Teléfono móvil.....	16
• Ordenador portátil.....	18
3.2. Hábitos tóxicos	18
• Tabaco.....	18
• Alcohol.....	19
4. Encuesta de hábitos	21
5. Análisis estadísticos	21
6. Aplicación del estudio	22
Conclusiones.....	23
Conclusions.....	23
Anexo I: Encuesta de hábitos	24
Bibliografía.....	26

Resumen

Actualmente la infertilidad es una condición que afecta aproximadamente al 8-12% de las parejas en edad reproductiva, siendo el factor masculino el responsable en el 50% de los casos de forma individual o en conjunto con el factor femenino. Existen un gran número de agentes que afectan a la calidad del semen y por lo tanto perjudican a la reproducción.

A lo largo de este trabajo se va a desarrollar un diseño experimental para valorar el efecto que representan para la fertilidad masculina el uso de las nuevas tecnologías, en concreto la utilización del teléfono móvil y del ordenador portátil, así como los hábitos tóxicos tales como el consumo de alcohol y de tabaco. Para ello se establecen los criterios de inclusión y exclusión de las muestras para obtener resultados fiables y el conjunto de procedimientos para analizar el semen. Además, se plantea una encuesta para identificar los hábitos que serán relacionados con los factores seleccionados y los parámetros espermáticos de los individuos.

La ejecución de este estudio podría proporcionar resultados significativos, de tal forma que su implantación como tratamiento previo a las técnicas de reproducción asistida permitirían suponer un ahorro económico a las parejas afectadas y al sector sanitario público y privado.

• **Palabras clave:** infertilidad masculina, teléfono móvil, ordenador portátil, tabaco, alcohol.

Abstract

Nowadays infertility is a condition that affects approximately 8-12% of couples of reproductive age, being the male factor individually or together with the female responsible in 50% of cases. A large number of agents affects the quality of semen and therefore, they harm reproduction.

Throughout this work, an experimental design will be developed to assess the effect of the use of new technologies on male fertility, specifically the use of mobile phones and laptops, as well as toxic habits such as the consumption of alcohol and tobacco. For this aim, the inclusion and exclusion criteria of samples are established to obtain reliable results and a set of procedures to analyze the semen. In addition, a survey is proposed to identify the habits that will be related to the selected factors and the sperm parameters of the individuals.

The execution of this study could provide significant results, so its implementation as a pretreatment to assisted reproduction techniques would allow economic savings to couples, the public and private health care sector.

• **Key words:** male infertility, mobile phone, laptop, tobacco, alcohol.

Introducción

La fertilidad se define como la capacidad de una persona para lograr un embarazo clínico. Se entiende por embarazo clínico, aquel que se diagnostica por la visualización ecográfica de uno o más sacos gestacionales u otros signos clínicos definitivos de embarazo; incluyendo tanto el embarazo intrauterino (estado reproductivo en el que el embrión se ha implantado en el útero) como el embarazo ectópico (embrión que se implanta fuera de la cavidad uterina y se diagnostica por ultrasonido, visualización quirúrgica o histopatología). Por el contrario, la infertilidad es la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin utilización de anticonceptivos o debido a un deterioro de la capacidad para reproducirse, tanto a nivel individual como en conjunto con la pareja. Esta última descripción se basa en un período de tiempo restringido, mientras que la esterilidad es un término con el que suele existir confusión, debido a que es un estado permanente de infertilidad. La infertilidad se categoriza además como primaria o secundaria: la mujer infértil primaria es aquella que nunca ha sido diagnosticada con un embarazo clínico y cumple con los criterios necesarios para diagnosticarse infertilidad; mientras que el término de mujer infértil secundaria se aplica a una mujer que no puede establecer un embarazo clínico pero que previamente ha sido diagnosticada con uno [1]. La misma categorización se aplica a los hombres con respecto a su participación en el inicio del proceso reproductivo [2]. La infertilidad no implica riesgos a la integridad física o la vida de las personas, aunque puede tener un impacto negativo en el desarrollo del individuo produciendo frustración y debilitamiento de la personalidad, ya que muchas parejas consideran el hecho de tener hijos como un objetivo importante en sus vidas [3].

Más de 186 millones de personas en el mundo sufren de infertilidad, siendo la mayoría pertenecientes a países en desarrollo [4]. Se estima que entre el 8-12% de las parejas en edad reproductiva se encuentran afectadas por esta condición [5]; 1 de cada 7 parejas de países occidentales y 1 de cada 4 parejas de países en desarrollo. En algunas regiones del mundo como el Sur y el Centro de Asia, algunos países de África subsahariana, África del Norte, Medio Oriente y Europa Central y Oriental, la infertilidad llega incluso a alcanzar tasas del 30% [6]. A nivel de pareja, estos datos se traducen en unas 600.000 ò 700.000 parejas en España, un millón en Inglaterra o Francia, más de seis millones en Estados Unidos y 6.080 millones a nivel mundial [7].

• Causas de infertilidad en la pareja:

Las causas que intervienen en la dificultad para gestar de una pareja son numerosas y diversas. Los factores etiológicos se distribuyen prácticamente por igual entre los dos miembros

de la pareja: un 30% de los casos se deben al factor masculino, otro 30% al factor femenino y un 15-30% a factores mixtos. Aproximadamente un 10% de las parejas presentan estudios de su capacidad reproductora normales, por lo que no se encuentra causa alguna a su problema para tener descendencia, hecho que se denomina esterilidad de origen desconocido (idiopático) o sin causa aparente [7].

El estudio del factor femenino es más complejo y las causas de infertilidad son mucho más diversas, aunque de forma general, pueden agruparse de la siguiente manera:

- Factor tubárico: obstrucción parcial o total de las trompas de Falopio, ya sea de origen congénito o adquirido debido a infecciones, adherencias, cirugía pélvica, endometriosis, embarazos ectópicos previos, etc.
- Factor ovárico: disfunciones ovulatorias, mala calidad ovocitaria, disfunciones hormonales, etc.
- Factor uterino: malformaciones uterinas congénitas como septos, tabiques y otras, miomas, etc.
- Problemas en la interacción entre gametos: fallos en la fecundación.

En cuanto al factor masculino, se considera que contribuye aproximadamente en la mitad de las parejas con problemas de infertilidad, bien de forma aislada o bien como esterilidad mixta asociada al factor femenino. La causa más frecuente en este caso es la anormalidad o mala calidad del semen con origen idiopático, aunque existen otros factores comunes relacionados con la infertilidad masculina tales como: defectos hormonales (hipogonadismo), anomalías genéticas (síndrome de Klinefelter y otros mosaicos), anomalías en la vía seminal (ausencia de conducto deferente unilateral o bilateral, obstrucciones congénitas o adquiridas, etc.), medicación recibida (quimioterapia, radioterapia, etc.), enfermedades sistémicas (infecciones que repercuten en los testículos, diabetes, etc.), tóxicos ambientales (dioxinas, estrógenos en la dieta, etc.), varicocele con sintomatología clínica, disfunciones en el mecanismo de eyaculación (lesiones medulares y otras) o consumo de drogas [7].

• **Factores de estudio:**

El presente trabajo se centra en la condición masculina, de manera que una vez conocidas las numerosas causas que influyen en su fertilidad y por lo tanto provocan infertilidad en las parejas, se han seleccionado 4 factores distribuidos en dos grupos principales: nuevas tecnologías y hábitos tóxicos.

Las nuevas tecnologías seleccionadas se engloban dentro de las conocidas como Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC) y han cobrado una gran importancia en el día a día de la mayor parte de la población:

- Teléfono móvil: actualmente es uno de los principales sistemas de telecomunicaciones, existiendo en todo el mundo unos 6.900 millones de contratos de telefonía móvil a finales de 2009, con un crecimiento continuo y rápido del mercado. Los teléfonos móviles son transmisores de radiofrecuencias de baja potencia y funcionan en un intervalo de entre 450 y 2.700 MHz. La potencia, al igual que la exposición del usuario a las radiofrecuencias, descienden rápidamente al aumentar la distancia con el dispositivo [8]. Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) de 2017, el 97,4% de los hogares españoles tiene teléfonos móviles [9].
- Ordenador portátil: la presencia de estos dispositivos es cada vez más frecuente en la vida cotidiana de la población, ya sea en los hogares, las oficinas o muchos lugares públicos. Para acceder a los servicios que presta Internet, se establece una conexión a las redes de área local inalámbricas (WLAN) mediante conexión wifi, lo cual conlleva exposición de los usuarios a las ondas de radiofrecuencia [10]. Según los datos del INE de 2017 más de 25 millones de personas utilizaron el ordenador en sus hogares: el 63% realizó un uso diario (al menos durante 5 días semanales), el 22,7% semanalmente pero no a diario y el 14,3% menos de una vez en semana [11].

El estudio de los hábitos tóxicos se centra en el consumo de las dos drogas más extendidas y consumidas por la población. Según el informe de 2017 del Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), acerca del consumo de alcohol, tabaco y drogas ilegales en España; las drogas con mayor prevalencia de consumo en los 12 meses previos al estudio fueron el alcohol con un 77,6% y el tabaco con un 40,2% en la población comprendida entre los 15 y los 64 años. Además, confirman un mayor consumo por parte de los hombres:

- Alcohol: la prevalencia de consumo de alcohol mantiene una tendencia estable y en niveles altos desde la década de los noventa. Los datos del informe de 2017 del OEDA revelaron un consumo diario de alcohol del 9,3% de la población, los 30 días previos al estudio, lo que indica que este nivel de consumo es habitual.
- Tabaco: el 40,2% la población española con edades entre los 15 y los 64 años consumió tabaco en el último año, el 38,5% en el último mes y el 30,8% diariamente en el último mes, con respecto a la fecha del informe mencionado anteriormente. Desde el 2007 se ha observado una cierta estabilidad en el porcentaje de fumadores diarios, comprendido entre el 30% y el 31% de la población [12].

• **Espermatogénesis y regulación de la función gonadal testicular:**

Para poder comprender mejor el efecto producido por los factores en la fertilidad masculina, es necesario explicar brevemente los procesos de espermatogénesis y regulación de la función gonadal testicular.

La espermatogénesis es un proceso complejo de maduración y diferenciación celular, mediante el cual las células germinales indiferenciadas se transforman en espermatozoides. Se produce en el testículo a nivel de los túbulos seminíferos, al igual que la producción de las hormonas sexuales (esteroidogénesis) que ocurre a nivel de tejido intersticial. Ambos procesos están interrelacionados con el objetivo de conseguir la correcta producción de espermatozoides. La espermatogénesis se inicia con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros, diferenciándose tres fases principales:

- Fase proliferativa: generación de la multiplicación y del crecimiento de las células madre.
- Fase de maduración: tienen lugar los fenómenos de la Meiosis.
- Fase de diferenciación: se produce la espermiogénesis o transformación sin división celular de las espermátides en espermatozoides.

La regulación hormonal de los testículos funciona mediante la actuación secuencial de una serie de hormonas, tanto en el estímulo como en la regulación negativa. El núcleo arcuato del hipotálamo secreta hormona liberadora de gonadotropinas (GnRh) que alcanza la adenohipófisis a través del sistema porta hipofisario y actúa liberando gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). La liberación de GnRh es pulsátil y se realiza mediante impulsos procedentes del Sistema Nervioso Central, de manera que la frecuencia y la amplitud de estos impulsos marca la liberación de LH o de FSH.

La LH se fija a receptores específicos de las células de Leydig, activando la adenil ciclasa y esta a su vez el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, lo que favorece el transporte de colesterol a las mitocondrias y estimula su conversión en pregnenolona, el primer paso de la síntesis de testosterona (T). Parte de la T pasa a la sangre y otra parte a los túbulos seminíferos actuando sobre el epitelio germinal y las células de Sertoli. La T actúa en la diferenciación de los caracteres sexuales masculinos y su mantenimiento en el adulto, además de en el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis. Por otra parte, realiza un feedback negativo sobre el hipotálamo y la adenohipófisis [13].

La FSH actúa sobre las células de Sertoli uniéndose a receptores específicos y siguiendo la vía adenilil ciclasa - adenosín monofosfato cíclico (AC-AMPc). Las células de Sertoli producen proteínas transportadoras, proteasas y antiproteasas, otras proteínas y factores de crecimiento, entre ellos la inhibina. Las células de Sertoli inducen la proliferación y división celular en

periodos prenatal y neonatal. Aumentan el metabolismo lipídico y energético, incorporando glucosa y produciendo lactato y piruvato para las células germinales. Promueven la síntesis y secreción de numerosos productos. A modo de resumen:

- La FSH, la LH y la T son necesarias para el desarrollo de la espermatogénesis a partir de la pubertad. En ausencia de T las células germinales degeneran, pero sólo en algunos estadios, mientras que en ausencia de FSH la espermatogénesis continúa por la acción de la T.
- Por otra parte, tanto la T como la inhibina actúan como feedback negativo, actuando sobre el hipotálamo y la adenohipófisis y regulando de esa forma la producción de FSH y LH.
- Multitud de potentes mecanismos locales controlan la estereoidogénesis y la espermatogénesis testicular, siendo la acción reguladora autocrina de la T el mejor documentado. La T intratesticular actúa localmente regulando la espermatogénesis, en la que se requieren concentraciones 200 veces superiores a las sanguíneas. Además, ejerce su función sobre las células germinales indirectamente actuando sobre las células de Sertoli, las células peritubulares o a través de receptores de la proteína transportadora de andrógenos; debido a que las células germinales no poseen receptores androgénicos ya que estos se encuentran presentes en las células de Sertoli, las células de Leydig, las arteriolas y las células mioideas peritubulares [13, 14].

Objetivos

- **Objetivo general:**

Elaborar un diseño experimental que permita estudiar y evaluar el posible efecto negativo que ejerce el uso diario del teléfono móvil y del ordenador portátil, así como el consumo de alcohol y tabaco, en la fertilidad masculina de una población determinada.

- **Objetivos específicos:**

1. Comprender cómo afectan cada uno de los factores a la fertilidad masculina atendiendo a la bibliografía existente al respecto.
2. Determinar criterios de inclusión y exclusión de las muestras obtenidas, con el fin de estudiar el efecto de los factores establecidos, aislando aquellos que puedan interferir en los resultados.
3. Elaborar una encuesta de hábitos que refleje la incidencia de cada uno de los factores de estudio en los individuos, con la finalidad de obtener datos que se contrastarán con los análisis de las muestras.

Metodología

1. Población de estudio

La participación en este estudio se establecerá de forma voluntaria y los individuos seleccionados deberán cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- **Edad comprendida entre los 18 y los 34 años.** Teniendo en cuenta que la calidad del semen es el indicador fundamental de la fertilidad masculina, se conoce que los hombres se vuelven progresivamente menos fértiles a medida que envejecen [15]. Basándose en otras investigaciones y mediante un estudio retrospectivo de 5.081 individuos con un rango de edad entre 16,5 y 72 años, Stone B.A. *et al.* en 2013 concluyeron que existe una disminución en la probabilidad de embarazo en las relaciones sexuales con hombres mayores de 34 años. Otros estudios mencionan que los análisis de las muestras de semen indicaron que la producción diaria de espermatozoides en los hombres a partir de los 34 años de edad disminuye un 2% por año, la concentración y la morfología de los espermatozoides disminuye un 0,8% por año a partir de los 40 años de edad y la proporción de espermatozoides móviles y los parámetros progresivos de los espermatozoides móviles disminuyen un 2% y un 0,8%, respectivamente, por año, después de los 43 años [16]. A pesar de que los mecanismos concretos que demuestran la disminución de la fertilidad masculina asociada a la edad no han sido determinados [17], estos cambios dependientes de la edad en la calidad del semen probablemente podrían atribuirse a: cambios fisiológicos normales en el tracto reproductivo que ocurren con el envejecimiento, la disminución de la capacidad para la reparación celular y tisular de los daños inducidos por la exposición a tóxicos o enfermedades y el aumento con la edad de las posibilidades de tener daños reproductivos como resultado de exposiciones exógenas como fumar o determinadas infecciones [15, 18].

- **Índice de masa corporal normal (IMC) <25 kg/m².** Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que un hombre adulto tiene sobrepeso cuando su IMC supera los 25 kg/m² y obesidad cuando supera los 30 kg/m² [19]. Los hombres con sobrepeso y obesidad se asocian con una disminución en la calidad espermática y un mayor riesgo de infertilidad [18]. Una revisión sistemática de 30 estudios, que comprende un total de 115.158 hombres muestreados, encontró que los individuos obesos tenían un mayor porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y una mayor fragmentación de ADN, junto con un menor potencial de membrana, lo que se asocia a un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS); esto supone una mayor probabilidad de ser infértiles [20, 21]. Además, se ha observado que a medida que aumentan el IMC y la circunferencia de la cintura, se produce una disminución en el volumen de eyaculación, en la concentración y en el conteo de espermatozoides [22]. Otro metaanálisis con 13.077 hombres muestreados, informó que la

obesidad favorece la oligozoospermia (baja cantidad de espermatozoides) o azoospermia (ausencia de espermatozoides) en comparación con los valores de peso considerados normales [23].

• **Hombres sanos, sin antecedentes de enfermedad actual o crónica y sin exposición a tratamientos agresivos a lo largo de su vida.** Se excluirán del estudio aquellos individuos que hayan sufrido o tengan cualquier tipo de cáncer o que hayan sido sometidos a tratamientos de quimioterapia, radioterapia o cirugía escrotal. También aquellos que presenten enfermedades de transmisión sexual, varicocele, hidrocele, criptorquidia o enfermedad febril o infecciosa en los últimos 90 días [24, 25, 26, 27].

• **Ocupación laboral no considerada de riesgo para la fertilidad.** La primera investigación que relacionó una mala calidad del semen con el factor de exposición laboral fue publicada en 1977 por Whorton *et al.*, quienes observaron los daños severos causados por el dibromocloropropano (DBCP) en la espermatogénesis de los trabajadores de varias plantas industriales que producen pesticidas en California [28]. A partir de este momento surge una preocupación con respecto al posible efecto de las diferentes exposiciones químicas y físicas en el ambiente laboral, en relación con la calidad espermática y por defecto con la fertilidad masculina, publicándose así numerosos estudios hasta la actualidad. Aunque no es posible estudiar con precisión toda la gama de exposiciones laborales, es de utilidad identificar los factores de riesgo ocupacionales que producen un empeoramiento de la calidad del semen [29]. En este estudio se van a excluir los individuos que se encuentren en contacto en su puesto de trabajo con los siguientes agentes físicos o químicos:

- Pesticidas: diferentes pesticidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP), 1,2-dibromoetano (EDB), vinclozolin y organofosforados han demostrado inhibir la concentración espermática y muchos estudios han demostrado que los agricultores que tienen una alta exposición a estos productos, tienen una mayor incidencia de infertilidad [30, 31, 32, 33, 34]. Otro pesticida organofosforado, el clorpirifós, produce daños en el ADN inducidos por ROS y en la peroxidación lipídica de los espermatozoides [35].
- Herbicidas: algunos herbicidas como el lindano, el metoxicloro y el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) se han correlacionado directamente con el estrés oxidativo y la disminución de la concentración de espermatozoides. La exposición al lindano también es perjudicial para el sistema reproductivo al dañar la morfología de las células de Sertoli, lo que resulta en una disminución de la espermatogénesis, e impide la función de enzimas esteroideogénicas, proteínas reguladoras y transportadoras esteroidales y, por lo tanto, reduce los niveles circulantes de testosterona [36, 37, 38, 39, 40, 41].
- Disolventes orgánicos: tienen una gran cantidad de aplicaciones en el ámbito industrial, de manera que sus trabajadores se encuentran a menudo expuestos a niveles altos de diferentes hidrocarburos orgánicos, debido a la alta volatilidad de estos compuestos. Existen datos que

sugieren el efecto negativo en la función reproductiva masculina de una serie de disolventes orgánicos utilizados frecuentemente en la industria [42]. Ejemplos de tales sustancias son:

- Tolueno: se encuentra en la pintura, el caucho, el pegamento, la gasolina y varios agentes de limpieza. Los estudios han demostrado que disminuye la concentración de espermatozoides epididimarios y los niveles de testosterona al inducir un estado de estrés oxidativo a través del exceso de producción de ROS o una disminución en la capacidad antioxidante de las células [33, 43].
 - Xileno: diferentes estudios evidencian que reduce la viabilidad, la motilidad y la actividad de acrosina de los espermatozoides induciendo un impedimento total de la respiración mitocondrial y estimulando la producción de ROS mitocondrial [43, 44].
 - Éteres de glicol: en particular el 2-etoxietanol y el 2-metoxietanol. Tienen un uso bastante extendido como, por ejemplo, constituyentes de la pintura, el pegamento, los colorantes, los diluyentes y la tinta de impresión. Por lo general han sido considerados seguros debido a su baja volatilidad, sin embargo, pueden ser absorbidos a través de la piel, produciendo efectos negativos en la calidad del semen [45].
- Metales pesados: los estudios muestran una correlación directa entre la exposición a metales pesados y el deterioro de la fertilidad masculina, en concreto el efecto negativo en la espermatogénesis y la concentración de espermatozoides [46, 47]. Los principales ejemplos son:
- Plomo inorgánico: su toxicidad en la fertilidad masculina se conoce desde hace tiempo, varios estudios transversales que han relacionado la exposición laboral al plomo inorgánico con un recuento reducido de espermatozoides y otras características espermáticas negativas [48, 49, 50]. El plomo probablemente interfiere con la función reproductiva masculina mediante acciones en varios sitios y niveles [42]. Por un lado, promueve la síntesis de ROS induciendo estrés oxidativo y se encuentra asociado con la inhibición de la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa [51, 52]. También se ha demostrado que puede interferir con la reorganización y el empaquetamiento del ADN espermático durante la espermatogénesis al competir con los sitios de unión a protamina de zinc, un elemento fundamental en este proceso [49].
 - Cadmio: se ha demostrado que está directamente relacionado con problemas en la fertilidad masculina, afectando al sistema reproductor de varias maneras. Inhibe de forma directa la concentración espermática debido a sus propiedades antiesteroideogénicas e impide la función de las células de Leydig, lo que conlleva a una secreción reducida de testosterona [53]. Tiene propiedades prooxidantes promoviendo la generación de ROS e inhibe la

- espermatogénesis reduciendo los niveles de zinc y alterando la barrera de sangre/testículos al modificar las uniones estrechas entre las células de Sertoli [54].
- Otros metales pesados: existen estudios que demuestran la toxicidad testicular de otros metales como el zinc, el cobre, el mercurio, el boro, el manganeso y el cromo hexavalente; aunque en algunos casos este efecto se evidencia en investigaciones con ratas y ratones, habiendo datos escasos para humanos [55, 56, 57, 58].
 - Policloruro de vinilo (PVC): existen evidencias que demuestran la disminución de la concentración y la movilidad de los espermatozoides en trabajadores expuestos al PVC. Este efecto puede deberse al di-(2-etihexil) ftalato o DEHP, una sustancia plastificante que se encuentra en gran medida en el PVC, por su bajo coste. [29]. Se ha observado una asociación negativa entre los niveles de ftalato en los individuos y la calidad espermática, viéndose afectadas la concentración, la morfología y la movilidad de la muestra [59].
 - Altas temperaturas y trabajo sedentario: la posición de los testículos por fuera del cuerpo es una característica exclusiva de los mamíferos que surge como adaptación evolutiva, para mantener estos órganos reproductores a una temperatura media de 3-4°C más baja que la temperatura abdominal interna, la cual es normalmente de 37°C. Cualquier fluctuación de la temperatura de los testículos puede alterar este sistema susceptible de homeostasis y afectar a la espermatogénesis [59, 60]. La exposición del cuerpo a temperaturas elevadas en el ámbito laboral se ha correlacionado con un efecto negativo en parámetros del perfil espermático, tales como el recuento de espermatozoides, la morfología y la motilidad. De esta manera, muchas investigaciones advierten del daño que supone a trabajadores de la fundición de metal, panaderos, trabajadores de la cerámica y soldadores, entre otros [62, 63, 64]. Los hombres con una posición sedentaria en el trabajo durante largos períodos de tiempo presentan una temperatura escrotal por encima de los valores normales. Hjollund *et al.* en 2002 observaron que los individuos que se sientan en el trabajo durante 8 horas al día tenían una temperatura escrotal media 0,7°C más alta en comparación con aquellos que estaban menos tiempo en esa posición [65]. Se ha correlacionado de forma directa una disminución del 40% de la concentración de espermatozoides por cada 1°C de cambio en la temperatura escrotal diurna [66]. Posteriormente, Jurewicz *et al.* en 2014 obtuvieron resultados similares al observar una asociación fuerte entre estar sentado durante 6 o más horas y un conteo y motilidad de espermatozoides reducidos [29]. De forma similar, los conductores profesionales muestran un deterioro en la calidad seminal y la espermatogénesis [67]. Un estudio de los taxistas de Roma encontró que tenían un menor número de espermatozoides con morfología normal, observándose un efecto más pronunciado en los individuos que llevaban más años trabajando en ese oficio [68]. Bujan *et al.* en el año 2000

encontraron que la temperatura escrotal aumentó significativamente después de 2 horas de conducción, en comparación con caminar [69].

Atendiendo a los agentes comentados, se excluirán del estudio los individuos con ocupaciones en los siguientes campos laborales:

- Agricultura o producción de pesticidas y herbicidas.
- Industrias o sectores con exposición a inhalación o contacto con disolventes orgánicos.
- Metalurgia, siderurgia y soldadura, en contacto con metales pesados.
- Producción de PVC.
- Fundición de metales, panadería, ceramistas o proximidad a altas temperaturas.
- Ocupaciones con períodos de tiempo sentado de más de 6 horas y conductores profesionales (taxistas, chóferes, etc.).

El objetivo de estos criterios de inclusión-exclusión pretende reducir o impedir la posibilidad de que la calidad de las muestras que van a ser analizadas se encuentre afectada por cualquier factor distinto a los seleccionados en el estudio, de manera que los resultados muestren los efectos que se esperan observar con la mayor fidelidad y precisión posible.

2. Recolección y análisis de las muestras biológicas

Los hombres que van a producir una muestra deberán permanecer entre 3 y 5 días en abstinencia. Las muestras se obtendrán mediante masturbación y se depositarán de forma completa en un recipiente estéril de vidrio o de plástico, perteneciente a un lote no tóxico para los espermatozoides, el cual se colocará en una incubadora a una temperatura de 37°C para que el semen se licue durante unos 30 minutos, como máximo. Posteriormente se realizará un análisis evitando que el tiempo de licuefacción supere 1 hora después de la eyaculación, para evitar deshidratación o cambios en la temperatura que afecten a la calidad del semen.

La técnica del estudio del semen debe ser sencilla y barata, de alto rendimiento, no tóxica para los espermatozoides y que seleccione a los funcionales óptimos y elimine al resto que no cumplan esta condición. De ello dependerán luego los estudios a los que se deseen someter las muestras. Según la OMS [70] el análisis del semen o seminograma es una de las pruebas que se realizan al varón, incluidas dentro del estudio de esterilidad de la pareja. Se desarrolla en 3 partes diferenciadas:

- Análisis del semen.
- Preparación del semen.
- Valoración de la calidad de la muestra.

Hay que valorar el resultado conjuntamente con la historia clínica de la pareja. El análisis del semen (espermograma o seminograma) según las recomendaciones de la OMS de 2010, consta de:

- Fase preanalítica: se rige por el cumplimiento de una serie de normas o criterios: autorización administrativa, material, sistema de calidad, factores que influyen, recogida de muestras, recogida de muestras especiales y prevención de riesgos.
- Fase postanalítica: comienza tras el cumplimiento del apartado anterior, descartando el análisis y volviendo a programarlo, en caso negativo. Esta fase consta de evaluación macroscópica y evaluación microscópica:
 - Evaluación macroscópica: licuefacción, viscosidad, apariencia, volumen y pH.
 - Licuefacción: tras la eyaculación el semen muestra un estado coagulado, licuándose al completo tras 60 minutos en condiciones normales, mediante efecto gravitacional.
 - Viscosidad: una viscosidad elevada puede deberse a una disfunción prostática.
 - Volumen: la cantidad eyaculada normal tras 3-5 días de abstinencia es aproximadamente de 1,5 ml. Un volumen inferior a este límite de referencia indica hipospermia.
 - Color: habitualmente el semen es blanco opalescente, ligeramente amarillento, de manera que otro color debe tenerse en cuenta para estudiar su causa.
 - pH: el valor debe ser igual o superior a 7,2 ya que lo contrario podría indicar azoospermia o procesos inflamatorios crónicos.
 - Evaluación microscópica: agregaciones, aglutinaciones, células no espermáticas, concentración y movilidad.
 - Concentración o número total de espermatozoides: el valor normal es de 15 millones de espermatozoides por mililitro eyaculado o 39 millones en la totalidad de la muestra. Si no se alcanzan esos valores se habla de oligozoospermia.
 - Movilidad: el límite inferior de referencia de movilidad total es un 40%, mientras que el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (movilidad activa, ya sea linealmente o en un círculo grande) debe superar el 32% para que no se considere astenoospermia.
 - Vitalidad: el porcentaje de espermatozoides vivos debe superar el 58%, si es inferior se habla de necrozoospermia.
 - Morfología: en un espermiograma normal debe haber un 4% o más de espermatozoides normales, ya que por debajo de este valor se denomina teratoospermia. El análisis de la morfología se realiza mediante extensiones fijadas y teñidas, donde las más empleadas son Papanicolaou o Diff-Quick, en las que se consideran los aspectos de forma de la cabeza, contorno total, región acrosómica, cola, pieza intermedia y gotas citoplasmáticas y vacuolas, dentro de la cabeza de los espermatozoides; para determinar los parámetros normales o anormales de esta característica.

La Tabla 1 representa la evolución los valores espermáticos de referencia según los criterios de la OMS en las últimas 4 ediciones.

Edición	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a
Año	1987	1992	1999	2010
Volumen (ml)	2	2	2	1,5
Concentración espermática (× 10 ⁶ /ml)	20	20	20	15
Espermatozoides/eyaculado (× 10 ⁶)	40	40	40	39
Movilidad progresiva (%)	50	50	50	32
Vitalidad (%)	50	75	75	58
Morfología normal (%)	50	30	(15)	4
pH	7,2-7,8	7,2-8,0	≥ 7,2	≥ 7,2
Leucocitos (× 10 ⁶ /ml)	< 1	< 1	< 1	< 1
Anticuerpos (MAR, %)	< 10	< 10	< 50	< 50
Anticuerpos (IBT, %)	< 10	< 20	< 50	< 50
Zinc en plasma seminal (μmol/eyaculado)	≥ 2,4	≥ 2,4	≥ 2,4	> 2,4
Fructuosa (μmol/eyaculado)	≥ 13	≥ 13	≥ 13	≥ 13
Glucosidasa neutra (mU/eyaculado)	—	≥ 20	≥ 20	≥ 20

Tabla 1. Evolución de los valores de referencia espermáticos (ediciones publicadas por la OMS).

• Preparación de muestras de semen:

En la preparación de las muestras de semen se tiene como objetivo la Recuperación de Espermatozoides Móviles (REM) que consiste en aislar un alto porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y móviles de los que principalmente no cumplen estas características. Existen tres técnicas que la OMS describe para llevar a cabo la REM:

- Lavado simple: consiste en diluir el semen con un determinado medio de cultivo (dilución 1+1) y centrifugar. Normalmente se utiliza para muestras de semen de buena calidad y en ocasiones para muestras con una concentración de espermatozoides muy baja, tras valoración macroscópica y microscópica, iniciales. Este procedimiento proporciona el mayor rendimiento de REM.
- Swim-up directo: se seleccionan los espermatozoides por su capacidad de nadar de forma ascendente, donde es necesario no diluir o centrifugar la muestra previamente, ya que se pretende obtenerlos por su motilidad y es un procedimiento útil cuando el porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra es bajo, tras valoraciones microscópicas iniciales. La técnica consiste en

añadir 1 ml de semen en un tubo cónico de 15 ml y depositar cuidadosamente 1,2 ml de medio de cultivo, inclinando el tubo unos 45° e incubando posteriormente 1 hora a 37°C, donde finalmente se recupera la fracción superior de aproximadamente 1 ml.

- Gradientes de densidad (Figura 1): este método proporciona la mejor selección de espermatozoides de buena calidad, debido a que los separa de otros tipos de células y desechos del semen que no son objeto de la REM. Se efectúa utilizando la centrifugación de plasma seminal sobre gradientes de densidad, formado por sílice coloidal recubierto con silano que separa a las células por su densidad. Los espermatozoides móviles nadan activamente a través del material del gradiente, formando un sedimento blanco en la parte inferior del tubo.

La forma más utilizada de preparar estos gradientes de densidad es colocando una capa inferior de 80% ò 90% (v/v), una capa superior de 40% ò 45% (v/v) y finalmente, la muestra de semen. Posteriormente, se centrifuga entre 300-400 g durante 15-30 minutos.

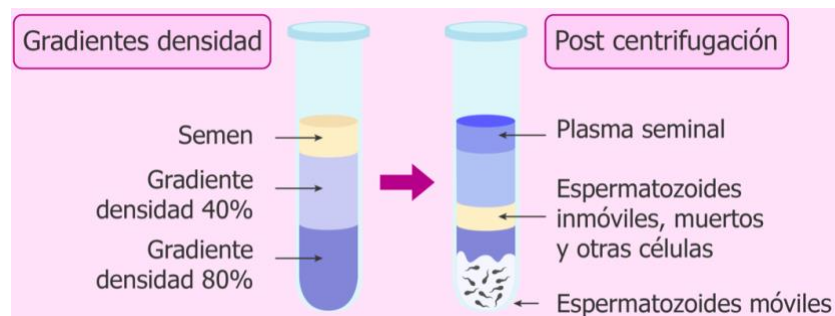


Figura 1. Gradientes de densidad para la capacitación del semen [70].

La elección de la técnica de preparación de semen es determinada por las características de la muestra, siendo un ejemplo con la utilización del swim-up directo para muestras de semen normales, mientras que en los casos de oligozoospermia severa o teratozoospermia, la técnica de elección sería los gradientes de densidad.

Cada laboratorio debe determinar la fuerza centrífuga y el tiempo de centrifugación necesario para recuperar un número suficiente de espermatozoides, sobre todo si el número de espermatozoides es extremadamente bajo.

• Estudio básico del espermiograma:

La concentración de espermatozoides es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de la fertilidad masculina. Tradicionalmente, el recuento de espermatozoides se realiza utilizando la cámara de Neubauer® que se ha convertido en un patrón y método recomendado por la OMS. Sin embargo, se han diseñado otras cámaras como la Makler® que utilizan muestras sin diluir, aumentando la precisión del procedimiento y la reproducibilidad de los resultados [72]. Los espermatozoides se

cuentan en una franja de 10 cuadrículas, cuyo número representa su concentración en millones por ml. Se debe repetir este conteo en otra tira, para determinar el promedio. En el caso de la muestra de pacientes oligospermicos, se sugiere contar en toda el área de la cuadrícula. Entonces, se añaden 5 ceros al número contado y el resultado es la concentración en millones por ml (Figura 2) [73].

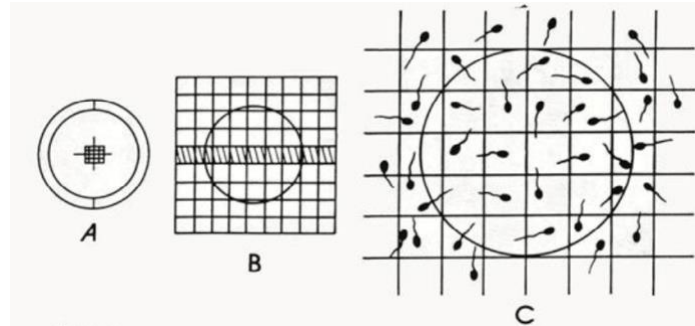


Figura 2. Cuadrículas de la cámara Mackler® [72].

3. Factores de estudio

El estudio del efecto producido por los factores seleccionados conlleva una revisión bibliográfica previa que permita entender cómo afectan a la calidad espermática y la fertilidad masculina en general. Con la interpretación de los resultados obtenidos en otras investigaciones, se establecerán los grupos de individuos para cada factor, según la frecuencia de exposición a cada uno de ellos. La división inicial planteada puede cambiar dependiendo de los resultados obtenidos tras analizar las muestras, estableciendo así otros grupos que representen de mejor forma a la población estudiada y reflejen resultados más fiables.

3.1. Nuevas tecnologías:

La interacción negativa que se produce entre las nuevas tecnologías y la calidad del semen está en consonancia con el efecto producido por las ondas electromagnéticas de radiofrecuencia (RF-EMW) y el calor, que son desprendidos por estos aparatos o la red wifi a la que se encuentran conectados de forma inalámbrica.

- **Teléfono móvil:**

A la hora de analizar el efecto del teléfono móvil se tendrán en cuenta: el tiempo diario de uso, ya sea hablando, conectado a internet o jugando, y la distancia con respecto a él a la que suele situarse la mayor parte del día. Agarwal *et al.* en 2008 analizaron muestras de semen de 4 grupos de individuos divididos según el tiempo de conversación telefónica diaria con su dispositivo móvil: un grupo control sin uso, uno de menos de 2 horas, otro entre 2-4 horas y el último de más de 4 horas diarias. Los resultados mostraron que a medida que aumentaba el tiempo de uso del teléfono móvil al día, se

observaba una disminución en el conteo de espermatozoides, la movilidad, la viabilidad y la morfología normal. Además, estos valores fueron significativos por encima de las 4 horas diarias, concluyendo que el uso del teléfono móvil se asocia con una disminución en la calidad del semen, ya que descartaron la posibilidad de que el efecto observado fuera causa de la calidad inicial de las muestras, al incorporar caracteres de inclusión y exclusión para las mismas [74]. Al año siguiente, en 2009, Agarwal *et al.* demostraron que la radiación emitida por el teléfono móvil causa estrés oxidativo en el semen puro y conduce a una reducción de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. Mediante un estudio *in vitro* del semen en contacto con RF-EMW, observaron un aumento en los niveles de ROS en las muestras, hecho que atribuyen a la estimulación del sistema de réplica de la membrana plasmática en los espermatozoides por el efecto de estas ondas, al aumentar la actividad de la enzima NADH oxidasa espermática, o al efecto sobre los leucocitos presentes en el semen puro. Los espermatozoides producen constantemente ROS que son neutralizadas por los antioxidantes presentes en el semen, sin embargo, cuando la producción de ROS excede la capacidad de los antioxidantes, se crea un estado de estrés oxidativo. Por lo tanto, la disminución en la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides en este estudio la relacionan con la concentración del anión superóxido en el semen [75]. Cuando el superóxido se produce extracelularmente, puede oxidar los fosfolípidos de la membrana y provocar una disminución de la viabilidad [76]. Posteriormente, Zilberlicht *et al.* en 2015 [77] encontraron que los individuos de su estudio que hablaban por teléfono móvil durante más de 1 hora diaria o que llevaban constantemente el dispositivo a una distancia ≤ 50 cm de la ingle tenían una menor concentración de espermatozoides. Aunque la asociación no alcanzó significación estadística, afirmaron que los parámetros de calidad espermática pueden verse afectados incluso cuando el móvil se encuentra en modo de espera, es decir, encendido aunque no se esté usando. De manera similar, Kilgallon y Simmons [78] informaron que los hombres que llevaban un teléfono celular en el bolsillo de la cadera o en el cinturón tenían un 11% menos de espermatozoides móviles y Davoudi *et al.* [79] concluyeron que los hombres que llevaban un teléfono móvil en su cinturón ≥ 6 h al día durante 5 días seguidos, tenían una caída del 19% en los espermatozoides altamente móviles en comparación a sus concentraciones previas. Zhang *et al.* en 2016 [80], estudiaron muestras de individuos jóvenes durante 3 años y concluyeron que el uso de internet una media de 1,5 horas diarias en 2013 y el tráfico mensual medio de datos de redes móviles de 0,2 GB en 2014 y 0,5 GB en 2015, se asociaron con una disminución en la concentración de espermatozoides y el volumen de semen. Estos resultados indicaron que el acceso a internet a través de redes móviles debería tenerse suficientemente en cuenta en futuros estudios sobre los efectos del uso del teléfono móvil en la calidad del semen.

En vista a lo expuesto anteriormente, en esta investigación se plantea inicialmente el estudio por separado del tiempo de uso del teléfono móvil y de la distancia con respecto a la ingle durante la mayor

parte del día. Para el primer caso, las muestras se dividirán en 3 grupos: <1 hora de uso diario, entre 1-4 horas de uso diario y >4 horas de uso diario. Para evaluar el efecto de la distancia entre el dispositivo móvil y la ingle de los individuos, se plantean 2 grupos: ≤ 50 cm de la ingle y >50 cm de la ingle.

- **Ordenador portátil:**

Para evaluar el posible daño producido por el ordenador portátil se tendrá en cuenta exclusivamente su uso sobre las piernas o el regazo de los individuos que se van a muestrear. Flores Garcés en 2012 [75] estudió el efecto del calor y las RF-EMW en individuos expuestos durante 20 días a un tiempo mínimo de 1 hora diaria de uso del ordenador portátil sobre las piernas. Para observar si se producía un deterioro en la calidad espermática, realizó espermogramas antes y después del periodo de exposición. De esta manera, observó una disminución en la concentración espermática, la motilidad y la morfología normal de los espermatozoides. El daño en la concentración espermática lo atribuyó al aumento de la temperatura escrotal comparando sus resultados con los de Bujan y Mieusset de 1995 [81], los cuales afirman que se debe a la activación del proceso de muerte celular programada en condiciones de calor. La motilidad espermática reducida la compara con el estudio *in vitro* de Avendaño *et al.* de 2010 [82] concluyendo que se debe a efectos no térmicos por radiación wifi. Finalmente, afirma que tanto la radiación wifi como el calor son los responsables del cambio en la concentración de espermatozoides con morfología normal, citando la investigación de Agarwal *et al.* de 2009 [83] para el primer caso y otros estudios con respecto al aumento de la temperatura escrotal en estados febriles para justificar el efecto del calor, tales como el de Sergerie *et al.* de 2007 [84]. Por otro lado, Avendaño *et al.* en 2012 [85] estudiaron *in vitro* el efecto de las RF-EMW producidas por la wifi durante 4 horas a una distancia de 3 cm de la muestra, simulando la distancia entre los ordenadores portátiles sobre las piernas y los testículos y controlando el resto de condiciones ambientales. El primer hallazgo relevante de este estudio fue una disminución significativa en la motilidad progresiva espermática, lo cual lo atribuyen a la formación de campos electromagnéticos que inducen la oxidación de los fosfolípidos, componente principal en la cubierta mitocondrial de los espermatozoides. Además, se produjo un daño en el ADN de los espermatozoides por un efecto no térmico.

En el caso del ordenador portátil, para este estudio se plantea dividir a los individuos en 3 grupos según el tiempo de uso sobre el regazo: <1 hora al día, entre 1-4 horas al día y >4 horas al día.

3.2. Hábitos tóxicos:

- **Tabaco:**

Los mecanismos subyacentes a los efectos del tabaquismo en la calidad espermática no se han aclarado por completo, sin embargo, tras numerosos estudios se cree que puede deberse a los roles combinados de estrés oxidativo elevado, daño en el ADN y apoptosis celular, lo que podría explicar no

solo la reducción en la calidad del semen, sino también la espermatogénesis alterada [18, 86, 87, 88]. Ramlau-Hansen *et al.* en 2007 [89] identificaron los datos de semen y tabaquismo adecuados para 2.542 hombres y dividieron a los individuos en 4 grupos según la cantidad de cigarrillos consumidos diariamente: no fumadores, 1-10 cigarrillos/día (tabaquismo leve), 11-20 cigarrillos/día (tabaquismo medio) y > 20 cigarrillos/día (tabaquismo alto). De esta manera, observaron que la concentración de espermatozoides, el volumen de semen y el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyeron con el aumento del tabaquismo, donde el conteo total de espermatozoides en los hombres que fumaban >20 cigarrillos por día fue un 29% menor que en los no fumadores. También observaron un aumento de los niveles de FSH e inhibina B, hecho que en el sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal, causa que los niveles de testosterona e inhibina B aumenten y posteriormente induzcan una disminución de FSH y de LH por retroalimentación negativa. Por ello, sugieren que los componentes del humo de tabaco pueden alterar la función normal de este sistema, y encontraron evidencias de un "fallo compensada de las células de Leydig" en los fumadores. Nadeem *et al.* en 2012 [90], analizaron muestras de semen de hombres no fumadores y fumadores, para comparar los resultados de calidad espermática. En este estudio, el 33,3% de los no fumadores mostró una motilidad espermática por debajo del 5%, en contraste con el 66,6% de fumadores. En cuanto a la morfología, solo el 25,9% de los no fumadores mostraron un porcentaje de espermatozoides normales inferior al 3%, frente al 71% de los casos entre los individuos fumadores. Además, tras formar diferentes grupos de fumadores según la cantidad de cigarrillos consumidos diariamente, observaron un efecto negativo muy pronunciado en la motilidad, la morfología y la concentración espermática, por encima de los 20 cigarrillos/día.

Se plantean 4 grupos para clasificar a los individuos que participarán en este estudio según el consumo de tabaco diario: no fumadores (grupo control), 1-10 cigarrillos/día (fumadores leves), 11-20 cigarrillos/día (fumadores moderados) y >20 cigarrillos/día (fumadores empedernidos).

- **Alcohol:**

Existen numerosos estudios que evidencian el efecto negativo del consumo de alcohol en la función reproductiva masculina, si bien no se ha determinado la cantidad exacta a partir de la cual aumenta el riesgo de infertilidad. En ocasiones concretas, se puede deducir que cierto grado de alcohol puede conferir algunos beneficios a los parámetros de calidad del semen, como es el caso de la cerveza o el vino que contienen polifenoles como el resveratrol o el xanthohumol, que han demostrado tener un gran potencial terapéutico y de protección celular [91]. De esta manera, en la mayor parte de los casos parece que el efecto negativo se limita a consumidores diarios, categorizados como bebedores crónicos. Las acciones del alcohol en el sistema reproductivo masculino parecen ocurrir en todos los niveles del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Parece que el alcohol interfiere con la producción de la hormona

liberadora de gonadotropina (GnRH), FSH, LH y T, y también altera las funciones de las células de Leydig y de Sertoli. Como resultado, la producción, el desarrollo morfológico y la maduración de los espermatozoides podrían verse afectados [92]. Muthusami *et al.* en 2005 [93] analizaron un grupo de individuos que consumía durante 5 o más días a la semana un mínimo de 180 mililitros de alcoholes con graduación alta, tales como whisky o brandy, con un contenido de un 40-50% de alcohol. En este estudio observaron una disminución de los niveles de testosterona (T) debida a dos causas fundamentales: el déficit de la síntesis de T por la reducción de los niveles de progesterona (P), un precursor fundamental en este proceso; y el aumento de la conversión de T en estradiol (E₂) por la estimulación de la enzima aromatasa en un proceso denominado aclaramiento metabólico de T. Los niveles de T en plasma son clave para la homeostasis de las gonadotropinas (LH y FSH) que regulan la espermatogénesis y la maduración de las células espermáticas. Además, concluyen que, a nivel de los túbulos seminíferos, el alcohol disminuye el volumen de semen, la concentración total de espermatozoides, la motilidad de los espermatozoides, el número de espermatozoides morfológicamente normales y la viabilidad de los espermatozoides. Por otro lado, Dahchour *et al.* en 2005 [94] sugieren que el alcohol afecta negativamente el sistema reproductivo promoviendo la sobreproducción de radicales libres como ROS e induciendo un estado de estrés oxidativo en los testículos, así como induciendo hipoxia y causando daño tisular en un sistema que es muy sensible a los cambios en el suministro de oxígeno. Un estudio sobre los hombres de parejas con infertilidad primaria, encontró que la teratozoospermia estaba presente en el 63% y el 72% de los varones que bebían alcohol moderadamente (40-80 g/día) y en exceso (>80g/día), respectivamente. Ninguno de los grandes bebedores de alcohol fueron normozoospermicos (parámetros espermáticos normales) y la mayoría fueron oligozoospermicos (64%), lo que sugiere un daño testicular progresivo en relación con el aumento de la ingesta diaria de alcohol [95]. De forma similar, otro estudio halló que las tasas de consumo de alcohol eran significativamente más altas en los hombres con oligozoospermia grave y con azoospermia no obstructiva en comparación con los controles fértiles [96]. Un metaanálisis reciente que involucró a 16.395 hombres informó que la ingesta de alcohol tiene un efecto perjudicial sobre el volumen del semen y la morfología de los espermatozoides [97].

A partir de estos datos, en el presente estudio se plantean 5 grupos de individuos según la frecuencia y el tipo de alcohol consumido a la semana: no bebedores (grupo control), bebedores ocasionales de bebidas alcohólicas de graduación baja (cerveza, vino y otras bebidas fermentadas), bebedores ocasionales de bebidas alcohólicas de graduación alta (bebidas destiladas, >30% alcohol), bebedores diarios de bebidas alcohólicas de graduación baja y bebedores diarios de bebidas alcohólicas de graduación alta.

4. Encuesta de hábitos

Para valorar el posible efecto de los factores de estudio en los análisis de las muestras, se realizarán encuestas anónimas a todos los hombres que produzcan muestra (Anexo I). Las preguntas están relacionadas con los hábitos diarios o semanales, dependiendo del factor, en relación con: el uso del teléfono móvil y el lugar donde se guarda la mayor parte del día, el uso del ordenador portátil sobre las piernas y el consumo de tabaco y alcohol. El desarrollo y fundamento de las encuestas se basa en la bibliografía, tal como se describe en el apartado anterior.

5. Análisis estadísticos

Tras el análisis de las muestras se realizará un estudio estadístico para observar el efecto de los factores sobre cada uno de los parámetros de calidad espermática. Dependiendo del carácter cuantitativo o cualitativo de los parámetros mencionados, se llevarán a cabo diferentes test estadísticos.

Las variables cuantitativas para valorar la calidad espermática son: volumen, pH, concentración de espermatozoides, motilidad, morfología y vitalidad. Para ello se realizará un análisis de la varianza (ANOVA). Los factores o variables independientes en este caso son el uso del teléfono móvil y el ordenador portátil y el consumo de alcohol y de tabaco. Para todos estos factores se realizará un ANOVA de una vía, a excepción del teléfono móvil para el que se hará un ANOVA de dos vías debido a que se estudian dos variables, el tiempo de uso y la distancia con respecto a la ingle. Este test estadístico nos permite comprobar la variación o la dispersión que existe asociada a las condiciones de cada uno de los grupos que forman cada factor y la variabilidad debida al azar o las condiciones intrínsecas dentro de cada una de las condiciones experimentales, es decir, la variación que existe de cada uno de los sujetos con respecto a la media de su grupo (varianza residual). Para poder aplicar el ANOVA deben cumplirse los siguientes supuestos:

- Normalidad: los valores a analizar deben cumplir una distribución normal. Dependiendo de si la muestra es mayor o menor a 50 se llevará a cabo el test de Kolmogorov-Smirnoff o el test de Shapiro-Wilks. En caso de no cumplirse este supuesto se pueden realizar alternativas tales como eliminar los valores extremos (outliers) o transformar los datos para intentar que la nueva distribución cumpla la normalidad.
- Homocedasticidad: las varianzas de cada uno de los grupos deben ser similares entre sí, esto se comprueba con el Test de Levene. En algunas ocasiones, cuando el tamaño de los diferentes grupos es dispar, puede no cumplirse este supuesto. Las alternativas al ratio F con el que se valora este supuesto en el ANOVA, son el test de Brown-Forsythe F y el test de Welch F que ajustan F teniendo en cuenta los grados de libertad, eliminando los problemas de no cumplimiento de

homogeneidad de varianzas y controlando el error de tipo I. El test de Welch tiene mayor potencia a menos que la media sea muy grande y tenga una varianza muy grande.

- **Independencia:** los valores que se obtienen en cada grupo no están influenciados por otro, es decir, los resultados de los análisis se incluyen sólo en uno de los grupos. La alternativa a este supuesto es utilizar un ANOVA de medidas repetidas.

En caso de que no se cumplan los supuestos mencionados anteriormente, la alternativa no paramétrica al ANOVA, en caso de que no se cumplan los supuestos es el test de Krustal-Wallis.

El objetivo del ANOVA de dos vías o factores que se utilizará para evaluar el efecto del teléfono móvil en los parámetros de calidad espermática, es ver si los valores de estos parámetros dependen de los 2 factores (tiempo de uso y distancia) o de la interacción de ambos. Se deben cumplir los mismos supuestos que para el ANOVA de una vía, con la diferencia de que tenemos dos variables en lugar de una, por lo que se tiene que asumir que ambas son normales y tienen la misma varianza y que de cada una de ellas tenemos una muestra aleatoria de observaciones independientes entre sí e independientes de las observaciones del resto de las muestras.

Las variables de tipo cualitativo o categórico se estudiarán con el test de chi-cuadrado (χ^2) de Pearson, para ver si existe asociación significativa. Se parte de la hipótesis de que no existe relación entre las variables, es decir, que son independientes. Para poder realizar este test es necesario que las frecuencias esperadas no sean inferiores a 5 en más del 20% de los casos. El contraste de χ^2 sirve para comprobar la independencia y no se puede considerar como una medida de asociación entre las variables, de manera que si se quisiera estudiar se utilizarían otros métodos como la regresión logística [98].

6. Aplicación del estudio

El planteamiento y desarrollo de esta investigación tiene como propósito inicial observar el efecto en la calidad espermática de la exposición a los factores de estudio seleccionados, para concienciar a la población que se encuentre en edad reproductiva con el propósito de tener descendencia. Sin embargo, en el caso de que se obtengan resultados significativos y fiables, se podría aplicar o incorporar este estudio en los tratamientos de reproducción asistida (TRA). Los varones de parejas diagnosticadas con infertilidad de origen desconocido podrían someterse a la encuesta planteada y el espermiograma complementario, de manera que se evalúe el posible efecto de los hábitos tóxicos y la utilización de las nuevas tecnologías mencionadas en su día a día, con el fin de prescribirles recomendaciones que favorecerán a su calidad espermática. De esta manera, si da resultado, las parejas que acuden a TRA podrían economizar el coste de las técnicas empleadas habitualmente (como la inseminación artificial o la fecundación *in vitro*), además de suponer también un ahorro en el gasto sanitario público y privado.

Conclusiones

1. La infertilidad masculina es responsable aproximadamente del 50% de los casos de infertilidad de las parejas.
2. La fertilidad masculina puede verse afectada por la exposición a las nuevas tecnologías, tales como el uso del teléfono móvil y del ordenador portátil, y a los hábitos tóxicos, como el consumo de alcohol y tabaco. Estos factores han sido seleccionados por su mayor prevalencia en la población sexualmente activa.
3. El diseño de la encuesta permite establecer un filtro en la población de estudio, agilizando la selección de muestras que no se encuentren afectadas por factores ajenos a los establecidos en la metodología.
4. El estudio de los hábitos diarios de los individuos, en conjunto con el análisis de las muestras de semen, pueden proporcionar información que permita proponer recomendaciones favorables para la obtención de una calidad seminal óptima, que pueda aumentar la probabilidad de tener descendencia.
5. La obtención de resultados óptimos en este estudio puede dar lugar a su aplicación en el ámbito de la reproducción asistida, permitiendo reducir gastos sanitarios.

Conclusions

1. Male infertility is responsible for approximately 50% of cases of infertility in couples.
2. Male fertility can be affected by exposure to new technologies, such as the use of mobile phones and laptops, as well as toxic habits, such as the use of alcohol and tobacco. These factors have been chosen because of their higher prevalence in the sexually active population.
3. The survey design allows establishing a filter for the study population, speeding up the selection of samples that are not affected by factors far from those chosen for the methodology.
4. The study of the daily habits of individuals, together with the analysis of semen samples, can provide information that allows to propose favorable recommendations for obtaining optimal seminal quality, which can increase the probability of having offspring.
5. Obtaining optimal results in this study can lead to its application in the field of assisted reproduction, enabling to reduce healthcare costs.

Anexo I: Encuesta de hábitos



Nº MUESTRA:

SECCIÓN DE
BIOLOGÍA | FACULTAD
DE CIENCIAS

Encuesta anónima de colaboración a la investigación

AUTOR: Mikel Santos Arrieta

Investigación: Incidencia de las nuevas tecnologías y algunos hábitos tóxicos en la fertilidad masculina.

** Se ruega contestar a todos los apartados con total sinceridad. En aquellas preguntas con varias opciones a elegir se debe seleccionar solo una de las presentes. Rodear el punto que acompaña a la respuesta seleccionada y no rellenar los apartados que se encuentren dentro de un recuadro.*

Edad: _____

Peso: _____

Altura: _____

Índice de masa corporal (IMC)

IMC =

1. ¿Tiene hijos?

- No.
- Sí, con pareja actual.
- Sí con pareja anterior.
- Sí, con varias parejas.

2. Responder en caso de tener hijos: ¿Su pareja o parejas han tenido algún aborto? ¿Cuántos?

- No.
- Sí, sólo con 1 pareja: ____
- Sí, con más de 1 pareja: ____

3. Indique si su ocupación laboral actual se engloba dentro de los siguientes campos. En caso contrario, escríbala en "otras".

- Agricultura.
- Producción de pesticidas, herbicidas o PVC.
- Industrias o sectores con exposición a inhalación o contacto con disolventes orgánicos.
- Metalurgia, siderurgia y soldadura, en contacto con metales pesados.
- Fundición de metales, panadería, ceramistas o proximidad a altas temperaturas.
- Ocupaciones con períodos de tiempo sentado de más de 6 horas y conductores profesionales (taxistas, chóferes, etc.).
- Otras: _____

4. ¿Ha sufrido algún traumatismo en la zona genital?

- Sí.
- No.

5. ¿Suele exponerse a altas temperaturas? (Saunas, baños termales, etc.)?

- Sí.
- No.

6. ¿Ha superado algún tipo de cáncer o se ha sometido a tratamientos de quimioterapia, radioterapia o cirugía escrotal a lo largo de su vida?

- Sí.
- No.

7. ¿Presenta algún tipo de enfermedad de transmisión sexual (VIH, Hepatitis, Sífilis, etc.) o padece o ha padecido varicocele, hidrocele, criptorquidia o alguna enfermedad febril o infecciosa en los últimos 90 días?

- Sí.
- No.

8. En términos generales, ¿cuánto tiempo utiliza el teléfono móvil diariamente? (Llamadas, uso de datos, SMS, juegos, etc.).

- Menos de 1 hora al día.
- Entre 1 y 4 horas al día.
- Más de 4 horas al día.

9. ¿A qué distancia con respecto a la ingle sitúa su teléfono móvil durante la mayor parte del día?

- A 50 cm o menos (bolsillo del pantalón, cinturón, etc.).
- A más de 50 cm.

10. ¿Utiliza el ordenador portátil sobre las piernas o sobre su regazo? En caso afirmativo, seleccione el tiempo de uso diario en esta posición.

- No.
- Sí, entre 1 y 4 horas al día.
- Sí, menos de 1 hora al día.
- Sí, más de 4 horas al día.

11. ¿Consume tabaco? Seleccione la opción que más se asemeje.

- No.
- Sí, entre 1 y 10 cigarros al día.
- Sí, entre 11 y 20 cigarros al día.
- Sí, más de 20 cigarros al día.

12. ¿Consume alcohol? Seleccione la opción que más se asemeje.

- No.
- Sí, ocasionalmente bebidas con bajo porcentaje de alcohol (bebidas fermentadas como la cerveza, el vino, la sidra, etc.).
- Sí, diariamente bebidas con bajo porcentaje de alcohol.
- Sí, ocasionalmente bebidas con alto porcentaje de alcohol (bebidas destiladas como el vodka, el ron, el whisky, la ginebra, el coñac, el tequila, etc.).
- Sí, diariamente bebidas con alto porcentaje de alcohol.

Bibliografía

- [1] **Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L. & van de Poel, S.** 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>.
- [2] **Vander Borgh, M., & Wyns, C.** 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>.
- [3] **Brugo-Olmedo, S., Chillik, C. & Kopelman, S.** 2003. Definición y causas de la infertilidad. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(4), 227–248. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195214309003>.
- [4] **Inhorn, M.C., & Patrizio, P.** 2014. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>.
- [5] **Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P.** 2008. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reprod Update.*, 14(6), 605–621.
- [6] **Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A.** 2012. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Medicine*, 9(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>.
- [7] **García Velasco, J. A.** 2012. Epidemiología de la esterilidad. *Bloque Esterilidad Femenina* 1–9.
- [8] **World Health Organization.** 2014. Campos electromagnéticos y salud pública: teléfonos móviles. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/electromagnetic-fields-and-public-health-mobile-phones>. Consultado el 15 de junio de 2018.
- [9] **Instituto Nacional de Estadística.** 2017. Equipamiento de productos TIC en las viviendas principales por tamaño del hogar, hábitat, ingresos mensuales netos del hogar y tipo de equipamiento. http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t25/p450/base_2011/a2017/10/&file=03001.px. Consultado el 15 de junio de 2018.
- [10] **World Health Organization.** 2006. ¿Qué son los campos electromagnéticos? <http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/es/index3.html>. Consultado el 15 de junio de 2018.
- [11] **Instituto Nacional de Estadística.** 2017. Uso de ordenador en los últimos 3 meses por características demográficas y frecuencia de uso. http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t25/p450/base_2011/a2017/10/&file=04005.px. Consultado el 15 de junio de 2018.
- [12] **Sendino R., Álvarez E., Brime B., Llorens N., Ruiz A. & Sánchez, E.** 2017. INFORME 2017: Alcohol, Tabaco y Drogas ilegales en España. Observatorio Español de La Droga y Las Toxicomanias. Ministerio de Sanidad y Servicios Sociales. <https://doi.org/10.1517/13543784.7.5.803>.
- [13] **López García, M. J., Urbano Felices, A., & Cárdenas Povedano, M.** 2012. Manual de laboratorio para el análisis del semen. <https://doi.org/10.3926/oss.5>.
- [14] **Carlson, B. M.** 2009. Embriología humana y biología del desarrollo. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 52 (12).
- [15] **Eskenazi, B., Wyrobek, A. J., Slotter, E., Kidd, S. A., Moore, L., Young, S., & Moore, D.** 2003. The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2), 447–454. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg107>.
- [16] **Stone, B. A., Alex, A., Werlin, L. B., & Marrs, R. P.** 2013. Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertility and Sterility*, 100(4), 952–958. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.046>.
- [17] **Belloc, S., Hazout, A., Zini, A., Merviel, P., Cabry, R., Chahine, H., Copin, H. & Benkhalifa, M.** 2014. How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility. *Maturitas*, 78(1), 22–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.02.011>.
- [18] **Durairajanayagam, D.** 2018. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 10–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.004>
- [19] **World Health Organization.** 2017. Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Consultado el 20 de mayo de 2018.
- [20] **Campbell, J. M., Lane, M., Owens, J. A., & Bakos, H. W.** 2015. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(5), 593–604. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.07.012>.
- [21] **Lobascio, A. M., De Felici, M., Anibaldi, M., Greco, P., Minasi, M. G., & Greco, E.** 2015. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology*. 3(2), 265–270. <https://doi.org/10.1111/andr.302>.
- [22] **Eisenberg, M. L., Kim, S., Chen, Z., Sundaram, R., Schisterman, E. F., & Buck Louis, G. M.** 2014. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: Data from the LIFE study. *Human Reproduction*, 29(2), 193–200. <https://doi.org/10.1093/humrep/det428>.
- [23] **Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Shayeb, A. G., Bonde, J. P., Jensen, T. K., Van Wely, M., Cao, J., Martini, A. C., Eskandar, M., Chavarro, J. E., Koloszar, S., Twigt, J. M., Ramlau-Hansen, C. H., Borges, E. Jr., Lotti, F., Steegers-Theunissen, R. P. M., Zorn, B., Polotsky, A. J., La Vignera, S., Eskenazi, B., Tremellen, K.,**

- Magnusdóttir, E. V., Fejes, I., Herberg, S., Lévy, R. & Czernichow, S.** 2013. BMI in relation to sperm count: An updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(3), 221–231. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms050>.
- [24] **Carlsen, E., Andersson, A. M., Petersen, J. H., & Skakkebaek, N. E.** 2003. History of febrile illness and variation in semen quality. *Human Reproduction*, 18(10), 2089–2092. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg412>
- [25] **Gulum, M., Cece, H., Yeni, E., Savas, M., Ciftci, H., Karakas, E., Celik, H., Yagmur, I.** 2012. Diffusion-Weighted MRI of the testis in hydrocele: A pilot study. *Urologia Internationalis*, 89(2), 191–195. <https://doi.org/10.1159/000339132>.
- [26] **Meirow, D. & Schenker, J.G.** 1995. Infertility: Cancer and male infertility. *Human Reproduction*, 10(8), 2017–2022. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136228>.
- [27] **Tanrikut, C., & Schlegel, P. N.** 2010. Varicocele and Male Infertility. *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice*. p: 445–451 https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1436-1_28
- [28] **Whorton, D., Krauss, R., Marshall, S., & Milby, T. H.** 1977. Infertility in male pesticide workers. *The Lancet*, 310(8051), 1259–1261. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)92665-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92665-4).
- [29] **Jurewicz, J., Radwan, M., Sobala, W., Radwan, P., Bochenek, M., & Hanke, W.** 2014. Effects of occupational exposure - Is there a link between exposure based on an occupational questionnaire and semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(4), 227–233. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.907837>.
- [30] **Oliva, A., Spira, A., & Multigner, L.** 2001. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction*, 16(8), 1768–1776. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.8.1768>.
- [31] **Ratcliffe, J. M., Schrader, S. M., Steenland, K., Clapp, D. E., Turner, T., & Hornung, R. W.** 1987. Semen quality in papaya workers with long term exposure to ethylene dibromide. *British Journal of Industrial Medicine*, 44(5), 317–326. <https://doi.org/10.1136/oem.44.5.317>.
- [32] **Uzumcu, M., Suzuki, H., & Skinner, M. K.** 2004. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function. *Reproductive Toxicology*, 18(6), 765–774.
- [33] **Wong, W. Y., Zielhuis, G. A., Thomas, C. M. G., Merkus, H. M. W. M., & Steegers-Theunissen, R. P. M.** 2003. New evidence of the influence of exogenous and endogenous factors on sperm count in man. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 110(1), 49–54.
- [34] **Zober, A., Hoffmann, G., Ott, M. G., Will, W., Germann, C., & van Ravenzwaay, B.** 1995. Study of Morbidity of Personnel with Potential Exposure to Vinclozolin. *Occupational and Environmental Medicine*, 52(4), 233–241. <http://www.jstor.org/stable/27730307>.
- [35] **Kovacic, P.** 2003. Mechanism of Organophosphates (Nerve Gases and Pesticides) and Antidotes: Electron Transfer and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 10(24), 2705–2709.
- [36] **Chitra, K. C., Sujatha, R., Latchoumycandane, C., & Mathur, P. P.** 2001. Effect of lindane on antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Asian Journal of Andrology*, 3(3), 205–208. <http://europemc.org/abstract/MED/11561191>.
- [37] **Defamie, N., Mograbi, B., Roger, C., Cronier, L., Malassine, A., Brucker-Davis, F., Fenichel, P., Secretain, D. & Pointis, G.** 2001. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis*, 22(9), 1537–1542. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.9.1537>.
- [38] **Latchoumycandane, C., Chitra, K. C., & Mathur, P. P.** 2003. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Archives of Toxicology*, 77(5), 280–284. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0439-x%0A>.
- [39] **Latchoumycandane, C., & Mathur, P. P.** 2003. Induction of oxidative stress in the rat testis after short-term exposure to the organochlorine pesticide Methoxychlor. *Archives of Toxicology*. 76(12), 692–698.
- [40] **Saradha, B., Vaithinathan, S., & Mathur, P. P.** 2008. Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats. *Toxicology*, 244(2-3), 190–197.
- [41] **Vaithinathan, S., Saradha, B., & Mathur, P. P.** 2008. Transient inhibitory effect of methoxychlor on testicular steroidogenesis in rat: an in vivo study. *Archives of Toxicology*, 82(11), 833–839. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0301-2>.
- [42] **Jensen, T. K., Bonde, J. P., & Joffe, M.** 2006. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occupational Medicine*, 56(8), 544–553. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql116>.
- [43] **Edelfors, S., Hass, U., & Hougaard, K. S.** 2002. Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene. *Pharmacology and Toxicology*, 90(1), 26–31. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2002.900106.x>.
- [44] **Xiao, G. B., Pan, C. B., Cai, Y. Z., Lin, H., & Fu, Z. M.** 2001. Effect of Benzene, Toluene, Xylene on the Semen Quality and the Function of Accessory Gonad of Exposed Workers. *Industrial Health*, 39(2), 206–210. <https://doi.org/10.2486/indhealth.39.206>.

- [45] Ratcliffe, J. M., Schrader, S. M., Clapp, D. E., Halperin, W. E., Turner, T. W., & Hornung, R. W. 1989. Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *British Journal of Industrial Medicine*, 46(6), 399–406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1009793>.
- [46] Naha, N., & Chowdhury, A. R. 2006. Inorganic Lead Exposure in Battery and Paint Factory: Effect on Human Sperm Structure and Functional Activity. *Journal of UOEH*, 28(2), 157–171.
- [47] Xu, D. X., Shen, H. M., Zhu, Q. X., Chua, L., Wang, Q. N., Chia, S. E. & Ong, C. N. 2003. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 155–163. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00274-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00274-7).
- [48] Alexander, B. H., Checkoway, H., van Netten, C., Muller, C. H., Ewers, T. G., Kaufman, J. D., Mueller, B. A., Vaughan, T. L. & Faustman, E. M. 1996. Semen quality of men employed at a lead smelter. *Occupational and Environmental Medicine*. 53(6), 411–416.
- [49] Bonde, J. P., Joffe, M., Apostoli, P., Dale, A., Kiss, P., Spano, M., Caruso, F., Giwercman, A., Bisanti, L., Porru, S., Vanhoorne, M., Comhaire, F. & Zschiesche, W. 2002. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occupational and Environmental Medicine*, 59(4), 234–242. <https://doi.org/10.1136/oem.59.4.234>.
- [50] Wildt, K., Eliasson, R., & Berlin, M. 1983. Effects of Occupational Exposure to Lead on Sperm and Semen. *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*. p: 279–300. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9346-1_10.
- [51] Ercal, N., Neal, R., Treeratphan, P., Lutz, P. M., Hammond, T. C., Dennerly, P. A., & Spitz, D. R. 2000. A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed fisher 344 rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(2), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s002440010102>.
- [52] Farmand, F., Ehdai, A., Roberts, C. K., & Sindhu, R. K. 2005. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environmental Research*, 98(1), 33–39.
- [53] Yang, J. M., Arnush, M., Chen, Q. Y., Wu, X. D., Pang, B., & Jiang, X. Z. 2003. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology*, 17(5), 553–560.
- [54] Benoff, S., Auburn, K., Marmar, J. L., & Hurley, I. R. 2008. Link between low-dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenozoospermia in a rat model. *Fertility and Sterility*. 89(2 Suppl), e73–e79. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.035>.
- [55] Apostoli, P., Kiss, P., Porru, S., Bonde, J. P., & Vanhoorne, M. 1998. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. ASCLEPIOS Study Group. *Occupational and Environmental Medicine*, 55(6), 364–374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1757597/>.
- [56] Bonde, J. P. 1993. The risk of male subfecundity attributable to welding of metals. *Studies of semen quality, infertility, fertility, adverse pregnancy outcome and childhood malignancy*. *International Journal of Andrology*, 16(Suppl 1), 1–29.
- [57] Hubbard, S. A. 1998. Comparative toxicology of borates. *Biological Trace Element Research*, 66(1), 343–357. <https://doi.org/10.1007/BF02783147>.
- [58] Yuyan, L., Junqing, W., Wei, Y., Weijin, Z., & Ersheng, G. 2008. Are serum zinc and copper levels related to semen quality?. *Fertility and Sterility*, 89(4), 1008–1011.
- [59] Jurewicz, J., & Hanke, W. 2011. Exposure to phthalates: Reproductive outcome and children health. A review of epidemiological studies. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 24(2), 115–141. <https://doi.org/10.2478/s13382-011-0022-2>.
- [60] Sheiner, E. K., Sheiner, E., Hammel, R. D., Potashnik, G., & Carel, R. 2003. Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Industrial Health*, 41(2), 55–62.
- [61] Werdelin, L., & Nilsson, Å. 1999. The Evolution of the Scrotum and Testicular Descent in Mammals: a Phylogenetic View. *Journal of Theoretical Biology*, 196(1), 61–72.
- [62] Bonde, J. P. 1992. Semen quality in welders exposed to radiant heat. *British Journal of Industrial Medicine*. 49(1), 5–10
- [63] Figa-Talamanca, I., Dell’Orco, V., Pupi, A., Dondero, F., Gandini, L., Lenzi, A., Lombardo, F., Scavalli, P. & Mancini, G. 1992. Fertility and semen quality of workers exposed to high temperatures in the ceramics industry. *Reproductive Toxicology* 6(6), 517–523.
- [64] Thonneau, P., Bujan, L., Multigner, L., & Mieusset, R. 1998. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Human Reproduction*. 13(8), 2122–2125.
- [65] Hjøllund, N. H., Storgaard, L., Ernst, E., Bonde, J. P., & Olsen, J. 2002. The relation between daily activities and scrotal temperature. *Reproductive Toxicology*, 16(3), 209–214.
- [66] Hjøllund, N. H., Bonde, J. P., Jensen, T. K., & Olsen, J. 2000. Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *International Journal of Andrology*, 23(5), 309–318.
- [67] Sas, M., & Szollosi, J. 1979. Impaired spermiogenesis as a common finding among professional drivers. *Archives of Andrology*, 3(1), 57–60.
- [68] Figa-Talamanca, I., Cini, C., Varricchio, G. C., Dondero, F., Gandini, L., Lenzi, A., Lombardo, F., Angelucci, L., Di Grezia, R. & Patacchioli, F. R. 1996. Effects of prolonged automobile driving on male reproduction function: a study among taxi drivers. *American Journal of Industrial Medicine*, 30(6), 750–758.

- [69] Bujan, L., Daudin, M., Charlet, J. P., Thonneau, P., & Mieusset, R. 2000. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Human Reproduction*, 15(6), 1355–1357.
- [70] **World Health Organization**. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Cervical Mucus-Semen Interaction (5th ed.). Cambridge University Press.
- [71] Rodrigo, A. 2017. ¿En qué consiste la capacitación de los espermatozoides? Reproducción Asistida ORG. <https://www.reproduccionasistida.org/capacitacion-espermatoca/>.
- [72] Cardona-Maya W., Berdugo J. & Cadavid A. 2008. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler® y la cámara de Neubauer®. Grupo Reproducción. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. Vol. 32(4), 443-445.
- [73] Cámara Makler® Sefi. Manual de operaciones. Optisum. www.optisum.com.
- [74] Agarwal, A., Deepinder, F., Sharma, R. K., Ranga, G., & Li, J. 2008. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertility and Sterility*, 89(1), 124–128.
- [75] Agarwal, A., Desai, N. R., Makker, K., Varghese, A., Mouradi, R., Sabanegh, E., & Sharma, R. 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertility and Sterility*, 92(4), 1318–1325.
- [76] Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H.R., Schill, W. B. & Kruger, T. F. 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, 83(3), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.022>.
- [77] Zilberlicht, A., Wiener-Megnazi, Z., Sheinfeld, Y., Grach, B., Lahav-Baratz, S., & Dirnfeld, M. 2015. Habits of cell phone usage and sperm quality - Does it warrant attention? *Reproductive BioMedicine Online*, 31(3), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.006>.
- [78] Davoudi, M., Brössner, C., Kuber, W. 2002. The influence of electromagnetic waves on sperm motility. *Journal fur Urologie und Urogynakologie*. 9(3), 18-22.
- [79] Kilgallon, S. J., & Simmons, L. W. 2005. Image content influences men's semen quality. *Biology Letters*, 1(3), 253–255. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0324>.
- [80] Zhang, G., Yan, H., Chen, Q., Liu, K., Ling, X., Sun, L., Zhou, N., Wang, Z., Peng, Z., Wang, X., Tan, L., Zhihong, C., Ziyuan, Z., Jinyi, L., Ao, L & Cao, J. 2016. Effects of cell phone use on semen parameters: Results from the MARHCS cohort study in Chongqing, China. *Environment International*, 91, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.028>.
- [81] Avendaño, C., Mata, A., Villanueva, A. M. J., Martínez, V. S., & Sarmiento, C. A. S. 2010. Laptop expositions affect motility and induce DNA fragmentation in human spermatozoa in vitro by a non-thermal effect: a preliminary report. *Fertility and Sterility*, 94(4), S73. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.284>.
- [82] Flores Garcés, L. 2012. Efectos del calor y radiación electromagnética sobre algunos parámetros del semen en usuarios de notebook. Universidad de Concepción. <http://repositorio.udec.cl/handle/11594/739>.
- [83] Mieusset, R., & Bujan, L. 1995. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International Journal of Andrology*, 18(4), 169–184.
- [84] Sergerie, M., Mieusset, R., Croute, F., Daudin, M., & Bujan, L. 2007. High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertility and Sterility*, 88(4), 970.e1-970.e7.
- [85] Avendaño, C., Mata, A., Sarmiento, C. A. S., & Doncel, G. F. 2012. Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, 97(1), 39–45.e2.
- [86] Cui, X., Jing, X., Wu, X., Wang, Z., & Li, Q. 2016. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Molecular Medicine Reports*, 14(1), 753–761. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5318>.
- [87] Harlev, A., Agarwal, A., Gunes, S. O., Shetty, A., & du Plessis, S. S. 2015. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health*, 33(3), 143–160. <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534%2Fwjmh.2015.33.3.143>.
- [88] Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A., & Esteves, S. C. 2016. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European Urology*, 70(4), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.010>
- [89] Ramlau-Hansen, C. H., Thulstrup, A. M., Aggerholm, A. S., Jensen, M. S., Toft, G., & Bonde, J. P. 2007. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Human Reproduction*, 22(1), 188–196. <https://doi.org/10.1093/humrep/del364>.
- [90] Nadeem, F., Fahim, A., & Bugti, S. 2012. Effects of cigarette smoking on male fertility. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(SUPPL.2), 1400–1405. <https://doi.org/10.3906/sag-1107-25>.
- [91] Wogatzky, J., Wirleitner, B., Stecher, A., Vanderzwalmen, P., Neyer, A., Spitzer, D., Schuff, M., Schechinger, B. & Zech, N. H. 2012. The combination matters - distinct impact of lifestyle factors on sperm quality: a study on semen analysis of 1683 patients according to MSOME criteria. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-115>.

-
- [92] **Emanuele, M. A., & Emanuele, N. V.** 1998. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health and Research World*, 22(3), 195–201.
- [93] **Muthusami, K. R., Phil, M., & Chinnaswamy, P.** 2005. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and Sterility*, 84(4), 919–924.
- [94] **Dahchour, A., Lallemand, F., Ward, R. J., & De Witte, P.** 2005. Production of reactive oxygen species following acute ethanol or acetaldehyde and its reduction by acamprosate in chronically alcoholized rats. *European Journal of Pharmacology*, 520(1–3), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.07.012>.
- [95] **Gaur, D. S., Talekar, M. S., & Pathak, V. P.** 2010. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol*, 53(1), 35–40. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.59180>
- [96] **Zhang, Z. B., Jiang, Y. T., Yun, X., Yang, X., Wang, R. X., Dai, R. L., & Liu, R. Z.** 2012. Male infertility in Northeast China: a cytogenetic study of 135 patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(1), 83–87. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9670-1>.
- [97] **Ricci, E., Al Beitawi, S., Cipriani, S., Candiani, M., Chiaffarino, F., Viganò, P., Noli, S. & Parazzini, F.** 2017. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 34(1), 38–47.
- [98] **Pardo, A. & San Martín, R.** 2010. *Análisis de datos en ciencias sociales y de la salud II* (2ª edición). Editorial Síntesis. Madrid. España. p. 74-291.