

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**SALUD REPRODUCTIVA EN JÓVENES
Y SU RELACIÓN CON EXPOSICIÓN A
DISRUPTORES ENDOCRINOS**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas el Licenciado IGNACIO DURÁN SALAS**

D NICOLAS OLEA SERRANO, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Medicina Física del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.

CERTIFICA:

Que **D. IGNACIO DURAN SALAS**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **SALUD REPRODUCTIVA EN JOVENES Y SU RELACION CON EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 30 de Julio de 2007

Dña, MARIANA FERNANDEZ CABRERA, Doctora en Ciencias Químicas e investigadora del Laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y colaboradora del departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que **D. IGNACIO DURAN SALAS**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **SALUD REPRODUCTIVA EN JOVENES Y SU RELACION CON EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 30 de Julio de 2007

D. CRISTOBAL AVIVAR OYONARTE, Doctor en Farmacia y Especialista en Análisis Clínicos. Jefe de Servicio del Área Integrada de Biotecnología de la Empresa Pública Hospital de Poniente de El Ejido de Almería y de los Centros Hospitalarios de Alta Resolución de Guadix de Granada y de El Toyo de Almería.

CERTIFICA:

Que **D. IGNACIO DURAN SALAS**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **SALUD REPRODUCTIVA EN JOVENES Y SU RELACION CON EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 30 de Julio de 2007

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por el licenciado en Ciencias Biológicas D. IGNACIO DURAN SALAS en el Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada

Granada, 30 de Julio de 2007

Fdo. Prof. Dr. Vicente Pedraza Muriel

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título **SALUD REPRODUCTIVA EN JOVENES Y SU RELACION CON EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS**, ha sido presentada por el Ldo. Ignacio Duran Salas para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, habiendo sido dirigida por D. Nicolás Olea Serrano, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Dña. Mariana Fernández Cabrera, Investigadora del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, y por D. Cristóbal Avivar Oyonarte, Doctor en Farmacia y Jefe del Área Integrada de Biotecnología del Hospital de Poniente de El Ejido, Almería.

Fdo. Ignacio Durán Salas

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias a los Proyectos Europeos del VI Programa Marco nº QLRT-1999-01422 y nº QRLT-2001-00603 que llevan por título “INCREASING INCIDENCE OF HUMAN MALE REPRODUCTIVE HEALTH DISORDERS IN REALTION TO ENVIRONMENTAL EFFECTS ON GROWTH-AND SEX STERID-INDUCED ALTERATIONS IN PROGRAMMED DEVELOPMENT” y “EDEN-ENDOCRINE DISRUPTERS: EXPLORING NOVEL ENDPOINTS, EXPOSURE, LOW-DOSE AND MIXTURE-EFFECT IN HUMANS, AQUATIC WILDLIFE AND LABORATORY ANIMALS”, respectivamente.

Se agradece, igualmente, la ayuda recibida de la Fundación Hospital Clínico de Granada, Hospital de Poniente de El Ejido y de la Universidad de Almería.

Sin duda son muchas las personas a las que debo agradecer su ayuda y apoyo, sin las cuales este trabajo no se habría hecho realidad, en especial a José Antonio por su tenaz insistencia y ayuda; a Toñi, a Belén y a Richard por no dejar de darme ánimos; a toda mi familia, en especial a mi madre y hermanas; a mi gato Federico por sus aportaciones sobre el teclado del ordenador; y, en definitiva, a todos mis amigos y compañeros por su interés y colaboración durante estos años.

Al Dr. Ignacio Durán Martínez, mi padre.

In Memoriam

Índice

	Página	
1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	CAPACIDAD BIOLÓGICA DE CONCEBIR (FERTILIDAD)	2
1.2	FERTILIDAD MASCULINA EN ESPAÑA	4
1.3	ESTUDIO DE LA FERTILIDAD EN EL VARÓN	5
13.1	Factores para valorar la calidad del semen	5
	Volumen del eyaculado	6
	Color	6
	Viscosidad, licuación, aglomeraciones y aglutinaciones	7
	pH	7
	Concentración	7
	Número total de espermatozoides	8
	Vitalidad y Morfología	8
	Movilidad	9
1.3.2	Exploración andrológica	10
	Historial general	10
	Nivel de androgenización	10
	Examen del pene	11
	Examen de los testículos	11
	Examen de los epidídimos	12
	Examen de los vasos deferentes	13
	Varicocele	13
	Examen inguinal	13
	Examen de la próstata y las vesículas seminales	14
1.3.3	Perfil Hormonal	14
1.4	HORMONAS Y CALIDAD SEMINAL	15
1.5	DISRUPTORES ENDOCRINOS	17
1.5.1	Concepto de Disruptor Endocrino	17
1.5.2	Compuestos organoclorados persistentes disruptores endocrinos	21
	Alquilfenoles	21
	Absorbentes de la radiación ultravioleta	22
	Bisfenol A y derivados	23

	Ftalatos	24
	Bifenilos policlorados (PCBs)	26
	Dioxinas y Furanos	28
	Plaguicidas organoclorados	29
	i) DDT y Metabolitos	30
	ii) Hexaclorociclohexano (HCH)	33
	iii) Aldrín, Dieldrín y Endrín	34
	iv) Endosulfán y derivados	35
	v) Metoxicloro	37
	vi) Mirex	38
	vii) Hexaclorobenceno	38
	viii) Vinclozolina	40
1.5.3	Exposición Humana a Disruptores Endocrinos	42
1.5.4	Síndrome de Disgenesia Testicular	46
1.5.5	Factores medioambientales y calidad seminal	50
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
3	MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	59
3.2	POBLACIÓN DE ESTUDIO	60
3.2.1	Población de referencia	60
3.2.2	Participación y tamaño muestral	61
3.3	CAPTACIÓN DE VOLUNTARIOS	62
3.4	CENTRO DE RECLUTAMIENTO	63
3.5	VARIABLES DEL ESTUDIO	63
	Encuesta epidemiológica	64
	Hoja de no respuesta	64
	Sección: preguntas generales	64
	Sección: Condiciones de salud	65
	Sección: Estilo de vida y condiciones de trabajo	65
	Historial reproductivo	65
3.5.2	Exploración andrológica	65
3.5.3	Muestras de Sangre	67
3.5.4	Análisis de las muestras de semen	67

3.5.4.1	Recogida de la muestra	67
3.5.4.2	Parámetros estudiados	68
	Licuación	68
	Aspecto	69
	Volumen	69
	Viscosidad	69
	pH	69
	Concentración espermática	70
	Número total de espermatozoides	71
	Elementos celulares diferentes de los espermatozoides	71
	Movilidad espermática	71
	Morfología espermática	72
	Cálculo del tiempo de abstinencia	74
	Intervalo de tiempo entre eyaculación y comienzo del análisis	74
3.5.4.3	Material empleado	75
3.5.4.4	Control de calidad	75
3.5.4.5	Entrega de informes	77
3.5.6	Análisis hormonal	77
3.5.7	Análisis del residuo de plaguicidas en suero	78
3.5.7.1	Purificación de las muestras de suero mediante Sep-Pak	78
3.5.7.2	Análisis cuantitativo/cualitativo mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones	79
3.5.7.3	Cromatografía de gases/espectrometría de masas	81
3.5.8	Determinación de lípidos totales en muestras de suero	82
3.6	ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO	83
3.6.1	Variables seleccionadas de la encuesta epidemiológica	84
3.6.2	Variables seleccionadas del análisis químico	85
3.6.3	Variables seleccionadas de la exploración física	86
3.6.4	Variables seleccionadas del análisis de semen	87
3.6.5	Variables de las determinaciones bioquímicas y hormonales	88
3.7	IDENTIFICACIÓN Y CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	88
4	RESULTADOS	91
4.1	POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	91

4.2	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	92
4.2.1	Características de los jóvenes	92
	Edad	92
	Peso	93
	Talla	94
	Índice de masa corporal (IMC)	94
	Salud general	95
	Enfermedad crónica a lo largo de la vida	96
	Consumo de medicamentos en los últimos tres meses	96
	Consumo de tabaco	97
	Consumo de <i>cannabis</i>	98
	Consumo de alcohol	98
	Nivel de estudios	99
	Actividad laboral	99
	Residencia de los jóvenes en el momento del reclutamiento	100
4.2.2	Características de los padres	100
	Lugar de nacimiento del padre	100
	Lugar de nacimiento de la madre	101
	Residencia de la madre durante el embarazo	101
	Duración de la gestación	102
	Madre fumadora durante el embarazo	102
	Madre trabajadora durante el embarazo	102
	Tipo de trabajo desempeñado durante el embarazo	103
4.3	EXPLORACIÓN ANDROLÓGICA DE LOS JÓVENES	103
	Presencia o ausencia de cicatriz en la zona inguinal o genital	104
	Desarrollo del vello púbico: Estadios de Tanner	104
	Alteraciones del pene	104
	Disposición de los testículos	105
	Consistencia de los testículos	106
	Tamaño de los testículos	106
	Presencia de tumores	107
	Epidídimos	108
	Vasos deferentes	108

	Varicocele	108
	Hidrocele	109
4.4	ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES	109
4.4.1	Características cronológicas, macroscópicas, químicas y citológicas	109
	Estación del año	109
	Tiempo de Abstinencia	110
	Acidez-alcalinidad de las muestras (pH)	110
	Licuación/viscosidad	111
	Volumen	112
	Aglomeraciones	112
	Presencia de Células redondas	113
4.4.2	Concentración espermática	113
4.4.3	Número total de espermatozoides (NTE)	114
4.4.4	Movilidad espermática	115
	Movilidad tipo a, o movilidad progresiva rápida	115
	Movilidad tipo b, o movilidad progresiva lenta	116
	Movilidad progresiva (a+b)	116
	Movilidad tipo c, o movilidad no progresiva	117
	Movilidad total (a+b+c)	118
	Movilidad tipo d, o Inmóviles	118
4.4.5	Número total de espermatozoides móviles (NTEM)	119
4.4.6	Morfología espermática	119
	Formas normales	119
	Formas anormales	120
	Cabezas anormales	120
	Piezas intermedias anormales	121
	Flagelos anormales	121
	Restos citoplasmáticos	121
	Índice de teratozoospermia	122
4.5	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HORMONALES	122
4.5.1	Colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos en suero	122
4.5.2	Perfil hormonal sérico	124
	Testosterona	124

	Globulina transportadora de las hormonas sexuales (SHBG)	124
	Inhibina B	125
	Hormona luteinizante (LH)	125
	Hormona folículo estimulante (FSH)	125
4.6	ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN MUESTRAS DE SANGRE	126
4.6.1	Número de residuos cuantificados por muestra	126
4.6.2	Concentración de plaguicidas organoclorados por muestra	127
	Exposición a aldrín, endrín y dieldrín	127
	Exposición a endosulfán, isómeros y metabolitos	129
	Exposición a DDT, isómeros y metabolitos	131
	Exposición a lindano, metoxicloro, mirex, hexaclorobenceno y vinclozolina	134
4.6.3	Relación entre los diferentes residuos de plaguicidas detectados	136
4.7	ANÁLISIS BIVARIANTE DE LAS VARIABLES INDICADORAS DE CALIDAD SEMINAL, CON DETERMINANTES CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS	145
4.7.1	ANÁLISIS BIVARIANTE PARA EL NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZOIDES Y SUS DETERMINANTES	146
4.7.1.1	Número total de espermatozoides y características de los jóvenes	146
	Edad	146
	Índice de masa corporal	146
	Salud general	147
	Consumo de medicamentos en los últimos tres meses	149
	Consumo de tabaco	150
	Consumo de Cannabis	151
	Consumo de alcohol	151
	Nivel de estudios	152
	Actividad laboral	153
	Lugar de residencia	154
	Características de los padres	154
4.7.1.2	Número total de espermatozoides y exploración andrológica	156

Presencia o ausencia de cicatriz quirúrgica	156
Tamaño y disposición de los testículos	156
Consistencia de los testículos	157
Epidídimo	158
Vasos deferentes, Varicocele e Hidrocele	158
4.7.1.3 Número total de espermatozoides y características seminales	158
Estación del año	159
Tiempo de abstinencia	160
Acidez-alcalinidad de la muestra seminal (pH)	160
Licuación, viscosidad, células redondas y aglomeración	161
Movilidad espermática	162
Morfología espermática	165
4.7.1.4 Número total de espermatozoides y determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre	167
4.7.1.5 Número total de espermatozoides y exposición a plaguicidas organoclorados	169
Número de plaguicidas por muestra	170
Exposición a plaguicidas	170
4.7.2 ANÁLISIS BIVARIANTE PARA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y SUS DETERMINANTES	177
4.7.2.1 Número total de espermatozoides móviles y características de los jóvenes	177
Edad	177
Índice de masa corporal	177
Salud general	179
Consumo de medicamentos en los últimos tres meses	180
Consumo de tabaco	182
Consumo de <i>cannabis</i>	183
Consumo de alcohol	183
Nivel de estudios	184
Actividad laboral	185
Lugar de residencia	186
Características de los padres	186

4.7.2.2	Número total de espermatozoides móviles y exploración andrológica	188
	Presencia o ausencia de cicatriz quirúrgica	188
	Tamaño y disposición de los testículos	189
	Consistencia de los testículos	190
	Epidídimo	191
	Vasos deferentes, Varicocele e Hidrocele	191
4.7.2.3	Número total de espermatozoides móviles y características seminales	191
	Estación del año	191
	Tiempo de abstinencia	193
	Acidez-alcalinidad de la muestra seminal (pH)	193
	Licuación, viscosidad, células redondas y aglomeración	194
	Morfología espermática	195
4.7.2.4	Número total de espermatozoides móviles y determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre	197
4.7.2.5	Número total de espermatozoides móviles y exposición a plaguicidas organoclorados	199
	Número de plaguicidas por muestra	199
	Exposición a plaguicidas	200
4.7.3	ANÁLISIS BIVARIANTE PARA LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y SUS DETERMINANTES	206
4.7.3.1	Morfología espermática y exposición a plaguicidas organoclorados	206
4.7.4	ANÁLISIS BIVARIANTE PARA LAS HORMONAS DEL EJE REPRODUCTIVO MASCULINO Y EXPOSICION A PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS	218
5	DISCUSIÓN	231
6	CONCLUSIONES	267
7	BIBLIOGRAFÍA	272
8	ANEXOS	295

Introducción

1. Introducción

En los últimos quince años han aparecido en la literatura científica especializada, numerosas publicaciones sobre alteraciones del sistema reproductor y problemas en su funcionalidad, tanto en el hombre como en las especies animales, que se creen consecuencia del desequilibrio hormonal entre estrógenos y andrógenos (Gillette et al., 1994, Jørgensen et al., 2001). Un incremento en la incidencia de cáncer de testículo (Adami et al., 1994), el descenso en el recuento espermático y la pobre calidad seminal (Carlsen et al., 1992), el aumento en la frecuencia de criptorquidia e hipospadia (Paulozzi et al., 1997), junto con el aparente crecimiento en la demanda de reproducción asistida, son algunos de los efectos mejor documentados en el hombre, sin que exista una hipótesis única sobre la causa.

1.1 CAPACIDAD BIOLÓGICA DE CONCEBIR (FERTILIDAD)

La reproducción en los mamíferos es un proceso complejo que depende de muchos factores, entre ellos, de la sinergia en la capacidad reproductora del macho y de la hembra, proceso en el que interactúan elementos fisiológicos, genéticos, de

comportamiento y ambientales. Tradicionalmente el potencial reproductivo masculino se ha asociado con la capacidad de hacer llegar, en condiciones y concentración óptima, los espermatozoides del varón al tracto genital femenino, por lo que ha sido la calidad del semen el principal objetivo de estudio, tanto desde el punto de vista de la andrología como desde el toxicológico. Entre las características consideradas críticas para determinar una aceptable calidad seminal destacan la morfología, el número y la motilidad de los espermatozoides. Variaciones sutiles en torno a valores umbrales establecidos para cada una de estas variables cualitativas y cuantitativas son determinantes para definir la viabilidad del espermatozoide. Quizás por ello, los valores umbrales han tenido que ser revisados a lo largo del tiempo porque el espermatozoide masculino, al igual que otras características de los individuos, ha experimentado algunos cambios en las últimas décadas. Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999) ha sustituido el término "normal", empleado habitualmente a la hora de definir las características del espermatozoide, por el de "referencia", estableciendo que es este último define el semen con buenas aptitudes para lograr la fertilidad.

En el año 1992 Carlsen y colaboradores publican que entre 1938 y 1991 hemos asistido a un descenso en el recuento espermático y en el volumen seminal; la caída en el recuento espermático, referida en el meta-análisis de 61 trabajos que incluye un total de 14.947 varones, llega hasta el 50% en las cinco décadas estudiadas, lo que supone una disminución del 1% anual. A partir de esa publicación comienzan a aparecer nuevos estudios que tanto contradicen y critican los resultados presentados por Carlsen, como apoyan sus observaciones y tratan de dar una explicación al descenso descrito. Entre las hipótesis barajadas por estos últimos destacan aquellas que relacionan la exposición a ciertos compuestos químicos introducidos en el medio ambiente por la actividad humana, con la aparición de nuevos síndromes y el desarrollo de enfermedades específicas de causa no bien conocida, entre las que se incluye la pérdida de la fertilidad de algunas especies. La preocupación por la incidencia creciente de este tipo de observaciones ha atraído la atención de clínicos e investigadores que tratan de formular, con mayor o menor éxito, nuevas aproximaciones conceptuales en la etiología de la enfermedad y tratan de explicar las hipótesis enunciadas (Ashford y Miller, 1998).

1.2 FERTILIDAD MASCULINA EN ESPAÑA

No son muchos los estudios epidemiológicos, realizados en España, que han tenido como objetivo investigar la calidad del semen de la población general, y las variaciones regionales o temporales de esta medida, en las últimas décadas. La mayoría de los estudios realizados se han limitado a poblaciones específicas, generalmente series de hombres con problemas de fertilidad o donantes de bancos de semen. Un estudio retrospectivo elaborado en la provincia de Barcelona incluyó un total de 22.759 varones procedentes de parejas infértiles que acudieron a clínicas especializadas durante los años 1960 a 1999. Después de ajustar por edad y tiempo de abstinencia se observó que los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad y morfología) no habían sufrido cambios importantes en la población de estudio durante los 36 años investigados con la excepción de la morfología y el volumen. El porcentaje de espermatozoides normales había disminuido en un 3,6% por año estudiado, y en un 0,2% anual la cantidad de eyaculado ([Andolz et al., 1999](#)).

Entre los estudios sobre calidad seminal realizados recientemente en población española encontramos el llevado a cabo por los miembros del Servicio de Esterilidad del Instituto Marqués, bajo los auspicios de la Sociedad Española de Andrología y la Sociedad Española de Fertilidad (Lopez Teijon et al., en prensa). En este estudio se reclutaron 1000 varones de edades comprendidas entre los 18 y los 65 años, con el objetivo de analizar las características del semen de los españoles partiendo de poblaciones heterogéneas de Barcelona y La Coruña, comparar los resultados con los de otros países y regiones, e intentar establecer los factores ambientales y de estilo de vida que pudieran asociarse con los resultados obtenidos. El 65,5% de los varones del área de Barcelona no cumplía los criterios de referencia de la OMS en cuanto a la movilidad de los espermatozoides, una vez excluidos aquellos varones que declararon ir buscando un embarazo. En este estudio el 17% de los varones participantes presentó oligozoospermia, y el 62,3% astenozoospermia.

Son muy escasos los estudios realizados en España con el objetivo de investigar la calidad del semen de la población española, y los pocos que se han realizado adolecen de sesgos de selección al incluir fundamentalmente sujetos que acuden a hospitales o centros de reproducción asistida con la intención de ser donantes de semen o con problemas de infertilidad. Así Martínez-Navarro y colaboradores (Martínez-Navarro et al., 1998) reclutaron 585 voluntarios jóvenes, estudiantes de universidad, con una edad

media de 22,7 años y con un rango comprendido entre 18 y 29 años, que acudían a la Unidad de Reproducción del Hospital Virgen de las Nieves en el periodo comprendido entre 1983 y 1995. El tiempo de abstinencia requerido fue de tres días. Los resultados obtenidos no revelaron cambios en el número de espermatozoides ni en el volumen del eyaculado en el periodo de estudio, aunque si lo hicieron la morfología y la motilidad tipo “a”. Los investigadores justificaron los efectos observados al cambio de criterios de clasificación más que a un descenso real de la calidad seminal.

Un año más tarde Andolz y colaboradores publicaban otro estudio realizado en la provincia de Barcelona, donde incluyeron 22 759 sujetos infértiles, con una edad media de 31,9 años y con un rango comprendido entre 15 y 74 años, en el periodo comprendido entre 1960 y 1996. El tiempo de abstinencia requerido fue de 3 a 7 días. En este estudio retrospectivo se clasificaron los sujetos en dos grupos según presentasen o no azoospermia. Después de ajustar por edad y tiempo de abstinencia el análisis multivariante no reveló evidencias de un deterioro en la calidad del esperma salvo en el porcentaje de espermatozoides normales que experimentó una reducción del 3,6% durante el periodo de estudio (Andolz et al., 1999).

1.3 ESTUDIO DE LA FERTILIDAD EN EL VARÓN

En el estudio de la fertilidad en el varón debemos distinguir tres apartados:

1.3.1 Factores para valorar la calidad del semen

El eyaculado es una mezcla de secreciones procedentes del testículo, donde se producen los espermatozoides, con las secreciones de la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretral y uretral. La mayor parte del volumen del eyaculado se debe a las secreciones de las glándulas de los órganos reproductores masculinos (próstata y vesículas seminales, fundamentalmente). El semen es un líquido blanquecino mezcla de todos los componentes citados y que se expulsa desde la uretra en la eyaculación.

La Organización Mundial de la Salud ([OMS, 1999](#)) ha proporcionado de forma regular las directrices para valorar la calidad del semen y del esperma. No obstante, hay que tener en cuenta que en esta valoración las técnicas empleadas y los resultados obtenidos pueden verse afectados por muchos factores, incluido el tiempo transcurrido entre la eyaculación y el análisis de la muestra, también la forma en qué o cómo se

guarda y se transporta la misma al laboratorio. Es importante tener en cuenta, además, la variabilidad de un individuo, incluso en el transcurso de unos pocos días. Todos estos factores han hecho que las directrices de la OMS hayan ido cambiando con el paso de los años hasta la actualidad y que se valoren distintos factores. La valoración del espermiograma o seminograma se inicia con sus características macroscópicas, que comprenden fundamentalmente al volumen, color, pH, licuefacción, viscosidad y olor. Posteriormente, se inicia el estudio microscópico, mediante el cual se estudian en forma cuantitativa y cualitativa a los espermatozoides, la aglutinación (cuando están vivos, unidos entre sí) o la agregación (cuando están probablemente muertos, unidos a otras células y *debris*), entre ellos y la existencia de otras células, como leucocitos (por medio de coloraciones de peroxidasa, tipo benzidina-cianosina o azul de Toluidina) (OMS, 1999).

Volumen del eyaculado

De acuerdo con los valores de referencia establecidos por la OMS, el volumen total seminal medio producido en la eyaculación debe estar comprendido entre 2 y 6 ml. Un volumen de eyaculado inferior a 2 ml, se denomina hipospermia y puede deberse a una disminución en la función de las vesículas seminales o a una obstrucción en los conductos de los testículos, del epidídimo, o de la uretra, aunque puede ocurrir también después de eyaculaciones muy frecuentes. Si el volumen del eyaculado es superior a 6 ml se denomina hiperespermia y puede ser provocado por un excesivo tiempo de abstinencia sexual o por hipertrofia de las vesículas seminales. Independientemente de las razones mencionadas es obvio que en primer lugar hay que asegurarse que el varón haya recogido correctamente la muestra, sin que se pierda una parte para lo cual se recomienda el uso de un recipiente estéril de boca ancha.

Color

El semen normalmente es blanco o grisáceo, pero a veces puede aparecer verdoso o amarillento indicando la existencia de infección seminal. El semen pardo, rojizo o muy oscuro sugiere la presencia de sangre, generalmente por inflamación o congestión a cualquier nivel de la vía seminal.

Viscosidad, licuación, agregaciones y aglutinaciones

El semen se coagula casi inmediatamente después de la eyaculación formando un líquido pegajoso con glóbulos gelatinosos. Si el líquido seminal es muy viscoso puede dificultar el movimiento de progresión de los espermatozoides por el efecto físico de la densidad. A veces el semen no se licua por completo y pueden quedar grumos gelatinosos o filamentos de moco que, si no se es cuidadoso a la hora de analizar la muestra pueden interferir en los resultados. El fenómeno de aglutinación (agrupaciones de espermatozoides) puede ser causado por anticuerpos antiespermáticos, por una gran concentración de espermatozoides o por infecciones. El fenómeno de las agregaciones o aglomeraciones (conglomerados de espermatozoides, otras células y filamentos) suele deberse a un tiempo excesivo entre la recogida y el análisis de la muestra así como a una mala homogenización de la misma. El semen se licua de nuevo después de 5 a 60 minutos tras la eyaculación. La dificultad para coagularse y a continuación licuarse puede causar problemas de fertilidad.

pH

La acidez/basicidad del semen también debe ser medida ya que variaciones notables en el pH por debajo del valor de referencia (OMS, 1999) son sugerentes de problemas de mayor o menor importancia. Un valor de pH bajo puede ser consecuencia de algún proceso infeccioso e incluso obstructivo de las vías seminales.

Concentración

La concentración espermática se calcula rápidamente mediante el empleo de cámaras especializadas, como: Makler, Horwell, Petroff-Hausser, Microcell, el hemocitómetro de Neubauer o el portaobjetos de Chartpak. Desde hace poco tiempo, se utilizan sistemas tecnológicos comerciales para análisis de imágenes digitales de cantidad, motilidad y características del movimiento de los gametos masculinos, conocidos como análisis espermático asistido por computadora (CASA), los cuales han venido superando las limitaciones originales y aunque permiten un examen más objetivo, aún no reemplazan al seminograma tradicional.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999) se considera el valor de referencia en una concentración de espermatozoides de 20 millones por mililitro o mayor. Una concentración inferior a este valor se denomina oligozoospermia. Sin embargo no hace muchos años los valores de referencia se hallaban en una

concentración de 60 millones y mas tarde de 40 millones (Pflieger-Bruss et al., 2004). Los valores de referencia establecidos por la OMS se basan en resultados de numerosos estudios en los cuales el 95% de los hombres incluidos, que han demostrado su fertilidad, tenían al menos esta concentración espermática. De igual forma se establecen los valores de referencia para los demás parámetros.

Número total de espermatozoides

Entendemos como tal al número de espermatozoides que se encuentra en el eyaculado. Este valor se expresa en millones y es el resultado de multiplicar la concentración espermática por el volumen del eyaculado.

Si como hemos dicho anteriormente se considera que el valor de regencia para el volumen es de 2 ml o más, el número total de espermatozoides en la eyaculación debe ser al menos de 40 millones.

Vitalidad y morfología

En un semen considerado normal, y cuya muestra ha sido recogida correctamente y analizada en el tiempo previsto, al menos el 50% de los espermatozoides deben estar vivos. La morfología representa una prueba global de la función espermática y está directamente relacionada con la capacidad fecundante del semen ya que solo aquellos de aspecto normal serán capaces de ascender desde la vagina hasta las trompas y fecundar el ovocito. Actualmente para valorar morfología, sobre todo, se utilizan los criterios estrictos de Kruger, según este autor, por debajo del 14% de formas normales la tasa de fertilización “in Vitro” disminuye, llegando a ser poco probable por debajo del 5% (Kruger et al., 2004). También con respecto a este parámetro la OMS ha ido adoptando niveles referenciales diferentes en estos últimos años, desde el “50% o mas” recomendado en 1987 (OMS, 1987), el “30% o más” recomendado en 1992 (OMS, 1992), al 14% o más de la última actualización en la que se recomienda aplicar los criterios estrictos de Kruger (OMS, 1999).

La morfología espermática se evalúa extendiendo la muestra de semen fresco y realizando una tinción tras su fijación apta para la observación de espermatozoides como la tinción de Papanicolau ó Panóptico rápido, recomendadas por la OMS. Según el tipo de tinción las medidas de referencia pueden variar ligeramente (Franken y Kruger, 2004), en el caso del panóptico rápido el espermatozoide debe observar una configuración ovalada regular, siendo el diámetro mayor de 5-6 μm y el menor de 2,5-

3,5 μm . El contorno de la cabeza ha de estar bien definido. La región acrosómica debe estar bien definida y ocupar del 40% al 70% del área de la cabeza, no deben de aparecer más de dos vacuolas pequeñas así como ninguna vacuola grande ni situarse dentro del área postacrosómica. La pieza intermedia debe ser delgada ($<1 \mu\text{m}$ de grosor), de una longitud aproximada entre 1 y 1/2 del diámetro mayor de la cabeza y con una inserción perpendicular al diámetro menor de la cabeza y bien centrada, si presenta restos citoplasmáticos, estos no deben de superar 1/3 del área de la cabeza. El flagelo debe estar derecho, ser uniforme y más fino que la pieza intermedia, desenrollado y aproximadamente de 45 μm de longitud. Los espermatozoides que según estas indicaciones se encuentren en una situación límite (borderline) se deben de considerar como anormales.

Movilidad

El porcentaje de espermatozoides móviles deberá ser mayor del 50%, y tener movimiento rápido ($\geq 25 \mu\text{m}/\text{seg}$ a 37°C) y lineal en al menos el 25% o bien presentar un mínimo de un 50% de espermatozoides con movilidad progresiva, es decir con un movimiento de avance lineal de al menos 5 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Una baja proporción de espermatozoides móviles es conocida como astenozoospermia. La movilidad se suele describir según los grados o tipo siguientes:

- “**Grado a**” o Movilidad Progresiva: porcentaje de espermatozoides con movimiento rápido y lineal ($\geq 25 \mu\text{m}/\text{sg}$ a 37°C).
- “**Grado b**”: porcentaje de espermatozoides con menor movilidad ($< 25 \mu\text{m}/\text{sg}$ a 37°C).
- “**Grado c**”: porcentaje de espermatozoides con movimiento solo vibratorio, sin movilidad progresiva ($< 5 \mu\text{m}/\text{sg}$ a 37°C).
- “**Grado d**”: espermatozoides inmóviles.
- “**Grado a+b**” o Movilidad Progresiva Total: suma de los porcentajes anteriores.
- “**Grado a+b+c**” o Movilidad Total: porcentaje de formas móviles.

La OMS establece la referencia a partir del 50% de movilidad total así como una movilidad “tipo a” $\geq 20\%$ ó $a+b \geq 50\%$.

1.3.2 Exploración andrológica

La exploración ha de centrarse en el aparato genitourinario siguiendo las recomendaciones de la OMS en su manual para la investigación estándar, diagnóstico y manejo del varón infértil (WHO, 1999). La temperatura del lugar del examen ha de permanecer entre 20 y 22°C, el paciente ha de permanecer en pie y desvestido durante unos 5 minutos antes de ser examinado. A temperaturas más bajas el escroto puede retraerse dificultando de ese modo la palpación. Durante el reconocimiento se examinarán las siguientes características:

Historial general

Se debe investigar sobre el padecimiento de enfermedades crónicas, la aparición de procesos febriles en meses previos a la colección de la muestra de semen (generalmente tres meses), intervenciones quirúrgicas en la zona inguinal y genital, así como sobre el estado de salud en general del sujeto.

Nivel de androgenización

La distribución del vello en el cuerpo puede ser un indicador de la producción de andrógenos. Las anomalías en el desarrollo sexual secundario pueden anotarse de acuerdo a la escala de desarrollo prepuberal de Tanner, centrándose principalmente en el vello púbico. Tanner (1962) establece cinco categorías o estadios en el desarrollo del vello púbico:

- Estadio 1: Preadolescente. El vello sobre el pubis no está desarrollado, tan solo aparece vello sobre el abdomen y no existe vello púbico.
- Estadio 2: Escaso crecimiento de pelos largos, poco pigmentados, finos (tipo “pelusa”) y lisos o ligeramente rizados, principalmente en la base del pene.
- Estadio 3: El pelo es considerablemente más oscuro, grueso y rizado, dispersándose de forma escasa hacia el final del pubis.
- Estadio 4: El pelo es ahora de tipo adulto aunque el área cubierta es inferior a la del adulto sin que llegue a crecer a la superficie media del muslo.
- Estadio 5: El pelo es adulto en cantidad y tipo, con una distribución en horizontal, crece hasta la superficie media de los muslos, pero no llega a superar la línea alba o la base del triángulo invertido.

Examen del pene

El pene ha de ser inspeccionado con el fin de detectar hipospadias, cicatrices quirúrgicas o traumáticas, placas u otras patologías. El prepucio debe retraerse si no hay fimosis aparente. El meato externo de la uretra debe ser identificable. La presencia de cicatrices derivadas de cirugía puede ser indicativa de alteraciones uretrales que podrían derivar en una disfunción eyaculadora. Por otra parte, la presencia de micropene es un fenómeno inusual aunque en caso de ser observado ha de ser tomado en cuenta.

Examen de los testículos

La posición de los testículos se determina con el hombre en pie, y ambos testículos deben situarse bajos en el escroto y palpables. Las principales anomalías en los testículos se categorizan a continuación:

- Testículos retráctiles: Esta condición ha de ser diferenciada de un descenso incompleto. Los testículos normalmente permanecen en el escroto pero, por mecanismos reflejos estos pueden retraerse hacia el anillo inguinal externo. Este reflejo es más común en niños de 5-6 años, pero puede persistir en algunos adultos.
- Testículos ectópicos: Los testículos se consideran ectópicos cuando existe una desviación en el camino de descenso. El tipo más frecuente de testículo ectópico es cuando este descansa en la superficie de la bolsa inguinal. Rara vez aparecen en otras localizaciones (canal femoral, región púbica o en el lado opuesto del escroto).
- Descenso incompleto: Los testículos pueden detenerse en cualquier punto de su camino de descenso hacia el escroto, entre la pared abdominal posterior y el anillo inguinal, pudiendo aparecer como:
 - * Alto en el escroto o en el cuello escrotal.
 - * Inguinal, permaneciendo en el canal inguinal.
 - * Impalpable.

Los testículos impalpables pueden estar situados en el canal abdominal o bien permanecer en la cavidad abdominal. La ausencia completa de testículos es rara pero se puede distinguir de una criptorquidia abdominal por el no aumento en suero de los niveles de testosterona tras la estimulación con gonadotropina coriónica humana (hCG).

Además de la posición, el eje de los testículos ha de ser estudiado también con el hombre permaneciendo en pie. Normalmente los testículos descansan en el escroto en

posición vertical con el epidídimo situado en la zona media. Los testículos pueden retraerse al canal inguinal siendo incluso doloroso durante el acto sexual.

La estimación del volumen testicular ha de ser realizada con la persona en posición recumbente, debido al riesgo de que esta sufra un síncope. La piel escrotal se estira sobre el testículo dejando el epidídimo a un lado, entonces el volumen de cada testículo es comparado con su homólogo, utilizando el orquidómetro de Prader de madera o bien medirse mediante un calibre. La mayor parte del volumen testicular pertenece a la masa que forman los túbulos seminíferos. Se conoce que existe una fuerte correlación entre el volumen testicular y el número de espermatozoides en el eyaculado. Los testículos de talla pequeña (<12 ml) pueden indicar una insuficiencia de epitelio seminífero. En hombres con síndrome de Klinefelter se encuentran testículos pequeños, normalmente con un volumen inferior a 3 ml, y en los casos de hipogonadismo hipogonadotrofo la talla testicular se halla entre los 5 y 12 ml. Un volumen testicular normal en un hombre azoospermico puede ser indicativo de una azoospermia obstructiva, testículos anormalmente grandes y asimétricos puede ser indicativo de un tumor testicular. Testículos grandes y simétricos (>30 ml), también llamado macroorquia ó megalotestes, pueden ser característicos de un síndrome X-frágil. En todos estos casos se recomienda un estudio ecográfico para excluir la presencia de un tumor. En casos de hidrocele puede ocurrir una falsa estimación del volumen testicular.

La consistencia testicular debe ser estimada ejerciendo presión con cuidado. La consistencia normal es similar a la de la goma. Unos testículos blandos suelen asociarse a una espermatogénesis defectuosa, y unos testículos excesivamente duros con un volumen normal o grande pueden estar asociados a la presencia de un tumor. Si los testículos son duros y pequeños, podemos sospechar que no encontramos con un síndrome de Klinefelter, mientras que unos testículos pequeños y blandos son más comunes en casos de hipogonadismo hipogonadotrofo.

Examen de los epidídimos

Un epidídimo normal es fácilmente palpable, una palpación cuidadosa no resulta dolorosa. La presencia de nódulos dolorosos puede indicar una epididimitis. Si esto ocurre en la cabeza del epidídimo puede deberse posiblemente a una infección por *Chlamydia trachomatis*. Cuando este fenómeno se localiza en la zona caudal puede ser debido a una infección por gonococos o por algún patógeno oportunista. Por otro lado la presencia de quistes en el epidídimo puede ser causa de un proceso obstructivo.

En el examen del epidídimo hay que tomar nota de los parámetros siguientes: ¿es el epidídimo palpable?; ¿está su posición anatómica en relación con el testículo normal?; ¿Hay presencia de quistes, induraciones o zonas nodulares y si es así, en que posición están?; ¿resulta dolorosa la palpación?

Examen de los vasos deferentes

Ambos vasos deferentes deben de ser palpables. Normalmente se palpan como un cordón fino, firme y apreciable al tacto entre los dedos. No obstante, a veces no se aprecian tan sencillamente, y en casos de azoospermia estos deben de ser reexaminados, más aun cuando el volumen testicular es normal y el eyaculado presenta valores bajos de pH. La agenesia congénita de los vasos deferentes, completa o no, suele asociarse a casos de fibrosis quística homo o heterocigótica. La ausencia unilateral de los deferentes es un fenómeno aun menos frecuente.

Cuando los vasos están presentes hay que tener en cuenta si la palpación resulta dolorosa (inflamación) y si se aprecian nódulos o alguna anormalidad.

Varicocele

Los varicoceles se clasifican en cuatro categorías o grados:

- Subclínico, cuando no hay un varicocele clínico pero se aprecian irregularidades en termografía escrotal o con ecografía doppler.
- Grado I: cuando no hay una distensión palpable o visible salvo cuando se realiza la maniobra de valsalva.
- Grado II: cuando la distensión de la vena escrotal es palpable pero no visible.
- Grado III: cuando el plexo venoso distendido abulta y es visible a través de la piel del escroto y a su vez es fácilmente palpable.

Examen inguinal

La exploración de la zona inguinal debe ser realizada con cautela con el fin de apreciar cicatrices quirúrgicas por criptorquidia o bien por los posibles daños que se hayan podido producir en los deferentes durante una operación de hernia. A veces estas cicatrices son difíciles de reconocer por la presencia del vello púbico. Las cicatrices en el área inguinal también pueden deberse a una infección pasada de tuberculosis o linfogranuloma venéreo. La presencia de nódulos linfáticos en la ingle debe ser registrada.

Examen de la próstata y vesículas seminales

El examen de la próstata y las vesículas seminales fue omitido debido los inconvenientes que presenta un examen rectal para los participantes.

1.3.3 Perfil hormonal

La evaluación endocrinológica se realiza en todos los hombres con parámetros seminales anormales o con alteraciones clínicas de baja androgenización, aunque se recomienda realizarla en todos los varones infértiles. Básicamente se miden FSH, LH y Testosterona. Cuando ocurre un hipogonadismo hipogonadotrópico, además hay que valorar la prolactina y la tirotropina (TSH) y realizar resonancia magnética nuclear de la silla turca, para investigar si existe la presencia de patología hipotalámico-hipofisiaria. Este último examen está indicado sobre todo en los casos cuando los testículos estén muy disminuidos de tamaño, la prolactina sea superior a 100 ng/ml o existan manifestaciones neurológicas por lesión de ocupación de espacio. Contrariamente, si se presenta un hipogonadismo hipergonadotrópico es conveniente realizar un cariotipo. Si este último resulta alterado es posible considerar realizar una biopsia testicular, sólo si el testículo es de buen tamaño (mayor de 5 ó 10 cc), pues de lo contrario la posibilidad de encontrar espermatozoides es prácticamente nula.

Además de los parámetros anteriormente señalados, un análisis de calidad seminal requiere el seguimiento de un protocolo adecuado para la recogida del semen y la evaluación del mismo que se podrían resumir en: i) abstinencia sexual, ya que el semen debe ser recogido tras una abstinencia de entre 3 y 7 días; ii) intervalo limitado entre la colección y el análisis; el semen debe ser entregado y analizado, como máximo, una hora después de haber sido recogido y en este intervalo no debe de sufrir cambios bruscos de temperatura; iii) medidas higiénicas, es importante procurar una buena higiene genital y de las manos previamente a la recogida, intentando no derramar la muestra para lo que se aconseja utilizar recipientes estériles de boca ancha; iv) examen físico, y iv) cuestionario, donde se recojan aquellas características que pudieran influir en los resultados obtenidos (por ejemplo episodios de fiebre en los meses previos a la recogida, cualquiera que sea la causa).

1.4 HORMONAS Y CALIDAD SEMINAL

Durante décadas se ha considerado a los estrógenos como las hormonas responsables del desarrollo de los órganos sexuales femeninos y, junto con la progesterona, esenciales para mantener el ciclo menstrual y la gestación. Más recientemente se ha empezado a otorgar a los estrógenos un papel importante en el desarrollo sexual del hombre.

Los estrógenos intervienen desde estadios tempranos en el desarrollo embrionario de los mamíferos y en el desarrollo de las gónadas. La acción de los estrógenos sobre la diferenciación sexual humana es controvertida, pero probablemente juegue un papel en la regulación y diferenciación de las células de Leydig.

Estudios con ratones *knockout* desprovistos de receptor de estrógenos (RE-/-) o en pacientes masculinos con receptor estrogénico defectuoso han contribuido a clarificar la posible importancia de los estrógenos en la biología del hombre. El receptor estrogénico está presente en todo el tracto reproductor masculino (Korach y McLachlan, 1995; Hess et al., 1997; Luconi et al., 2002). El testículo comienza a ser hormonalmente activo en la octava semana de gestación. Las células de Sertoli, bajo la acción de la hormona estimulante del folículo (FSH), producen la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS), la cual induce la regresión de dichos conductos –que se desarrollarían en oviductos, útero y parte superior de la vagina–, participa en la fase abdominal del descenso del testículo e incrementa el número de receptores androgénicos en la membrana de las células de Leydig (Gil Salom et al., 2002). La FSH actúa mediante un mecanismo de feedback negativo por lo que la actuación de los estrógenos exógenos *in útero* podría inhibir la secreción de esta hormona por la hipófisis del feto, lo que influiría negativamente en la proliferación de las células de Sertoli, que sólo tiene lugar en la vida fetal y neonatal temprana, reduciendo el número de células disponibles en la vida adulta para la producción de espermatozoides maduros (Sharpe et al., 1993). Cada célula de Sertoli puede nutrir a un número finito de células germinales que se desarrollaran en espermatozoides maduros (Carlsen et al., 1995).

Las hormonas desempeñan, además, un papel vital en la iniciación y mantenimiento de la función reproductiva masculina, aunque todavía no se conoce cómo la variabilidad en los niveles de algunas de las hormonas sexuales masculinas puede afectar a la calidad seminal del hombre. Además, el conocimiento de los valores hormonales como predictores de calidad seminal en estudios epidemiológicos es de

particular interés, ya que podría ayudar al resolver el grave problema planteado por la baja participación que normalmente acompaña a este tipo de estudios, y con ello reducir los potenciales sesgos de selección y clasificación inherentes. Algunos estudios han tratado de asociar los niveles circulantes de las hormonas sexuales masculinas con los parámetros seminales estudiados en la misma población (Jensen et al., 2004; Dhooge et al., 2007). Se cree que de entre todas las hormonas sexuales masculinas, inhibina B y FSH podrían considerarse como buenos marcadores de espermatogénesis y de función de las células de Sertoli, por lo que algunos autores han sugerido que la medida de estas dos hormonas, en suero, podría sustituir la medida convencional de los parámetros seminales en los estudios epidemiológicos de fertilidad (Jensen et al., 2004; Mabeck et al., 2005). Sin embargo, la relación entre hormonas reproductivas y calidad seminal no ha sido suficientemente estudiada como para poder tomar esta determinación. Algunos estudios han encontrado que la medida de inhibina B en suero se relaciona positivamente con la concentración espermática, mientras que FSH lo hace mediante relación inversa (Jensen et al., 2004). Incluso se ha podido establecer un valor umbral para estas dos hormonas para el cual la concentración espermática no superaría los valores de referencia establecidos por la OMS (20 millones/ml); esto es inhibina B < 80 pg/ml y FSH > 10 IU/l.

Inhibina B y FSH también han sido relacionadas con otros parámetros seminales como morfología y motilidad espermática. Un estudio clínico prospectivo americano en el se incluían 145 parejas normales en edad reproductiva y con fertilidad probada confirmó la asociación positiva y significativa entre inhibina B con concentración, morfología y movilidad espermática, mientras que FSH se relacionaba negativa y significativamente con concentración y morfología (Uhler et al., 2003).

Entre 1999 y 2003, 400 varones de entre 18 y 54 años participaron en un estudio realizado en Boston (EEUU) con el objetivo de analizar los efectos del medio ambiente sobre la salud reproductiva masculina. Los resultados de este estudio revelaron valores por debajo de los establecidos por la OMS como referencia para concentración espermática y para morfología en aquellos individuos con mayores niveles de FSH, así como valores por debajo de los establecidos por la OMS como referencia para concentración espermática y para movilidad en aquellos sujetos mayores niveles de inhibina B. En esta población, FSH y LH estaban inversamente asociadas con concentración espermática, morfología y movilidad; mientras que Inhibina B y testosterona libre estaban positivamente relacionadas con concentración espermática.

Testosterona libre también presentó una tendencia a la asociación con movilidad (Meeker et al., 2006).

1.5 DISRUPTORES ENDOCRINOS

1.5.1 Concepto de Disruptor Endocrino

Se estima en más de 100.000 las sustancias químicas producidas por el hombre, desde el inicio de la revolución industrial, fenómeno que no tiene parangón en la naturaleza. Fue a partir de los años cuarenta cuando comenzó la producción masiva de compuestos sintetizados por el hombre y la liberación medioambiental de muchos de ellos, de tal manera que se establece una media de 2.000 sustancias químicas nuevas las que se incorporan anualmente al censo de sustancias derivadas de la actividad humana. El hombre y su entorno resultan, pues, fácilmente expuestos a estos compuestos tanto desde el momento de su fabricación como a través de los procesos de distribución, uso y degradación final. La exposición ocurre porque estas sustancias químicas forman parte de la forma de vida actual y tiene lugar, ya sea, de forma conocida y programada, o bien como consecuencia de un proceso no intencionado, accidental o simplemente inadvertido (SACO 100EN, 1998).

Las alteraciones sobre la salud animal que han sido detectadas tras la exposición en distintas especies de animales (peces, reptiles, pájaros, mamíferos) e incluso en el hombre, incluyen de forma sorprendente enfermedades hormono-dependientes entre las que se encuentran: disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, desmasculinización, feminización y alteraciones del sistema inmune, e incluso incremento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer, además de el aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, y la pérdida en la eficacia del apareamiento (Colborn et al., 1993).

La hipótesis patogénica subyacente explica que algunas de estas sustancias químicas se comportan como hormonas, alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos, u hormonas tiroideas, a través de mecanismos de acción diversos (Miller y Sharpe, 1998). Aunque cualquier sistema hormonal es

susceptible de ser dañado, lo cierto es que los primeros compuestos exógenos o xenobióticos identificados se comportaban como estrógenos o andrógenos, es decir, interfiriendo con las hormonas sexuales, ya sea imitando, alterando o bloqueando su acción. De ahí que la información existente relativa a los xenoestrógenos o xenoandrógenos sea cualitativa y cuantitativamente más importante que para otros xenobióticos hormonales (Olea y Olea-Serrano, 1996).

La idea de que estas sustancias con actividad hormonal puedan tener un efecto adverso sobre la salud humana y animal no es un tema nuevo. A comienzos de los años 60, Raquel Carson (Carson, 1962) advirtió que ciertos productos químicos de síntesis utilizados para el control de plagas agrícolas se habían difundido de tal manera por todo el planeta que estaban afectando de manera universal e inadvertida al equilibrio entre las especies. Carson no sólo describió el modo en el que la naturaleza se estaba impregnando con estos productos sino que, además, puso en evidencia como estas sustancias se iban acumulando en los organismos vivos, advirtiendo que los efectos no se manifestaban necesariamente de forma inmediata y/o drástica, sino que permanecían latentes durante años expresándose de forma tardía incluso en generaciones posteriores.

Las observaciones experimentales, los estudios en distintas especies animales y los datos de laboratorio no hicieron más que incrementar la preocupación por estos hechos y motivaron la celebración de la conferencia “*Estrogens in the Environment*” en el Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente americano (NIEHS, 1997), donde se constató la presencia medioambiental de sustancias que se comportaban como hormonas. Se estableció, así mismo, de una manera sencilla que estos compuestos imitarían a la hormona uniéndose a su receptor, provocando el mismo espectro de efectos biológicos que la hormona natural, o bien antagonizarían el efecto hormonal bloqueando el receptor correspondiente. En ambos casos, el resultado final sería una alteración del sistema hormonal con consecuencias difícilmente predecibles. En 1979 no se tenía todavía mucha información sobre los efectos de estas sustancias sobre la salud humana, por lo que gran parte de las conclusiones eran puramente especulativas. No fue hasta la siguiente conferencia *Estrogens the Environment II* (NIEHS, 1985), celebrada en 1985, cuando se presentaron datos que revelaban el efecto de los xenoestrógenos sobre el desarrollo humano. Se demostró, así mismo, la ubicuidad de estas sustancias y se presentó información sobre la variabilidad de su potencia como hormonas exógenas, tanto de los agonistas como de los antagonistas hormonales (McLachlan, 1993). En el verano de 1991 se celebró la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, USA) donde un

grupo de 21 científicos, representando más de una docena de disciplinas, se reunieron para discutir la evidencia existente de cómo distintos compuestos químicos podían estar afectando a la reproducción y al desarrollo de los animales y a la salud humana. En esta conferencia se concluyó que *un gran número de sustancias químicas, sintetizadas por el hombre y liberadas al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen efecto sobre el sistema endocrino del hombre y de los animales. Se trata de compuestos persistentes, organohalogenados y bioacumulables que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), compuestos de síntesis y algunos metales*. Incluso se acuñó un nombre para este tipo de compuestos químicos, los cuales se conocen desde entonces con el nombre de **disruptores endocrinos** (Colborn y Clement, 1992). En España, este nombre fue aceptado por consenso en la primera Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos celebrada en Granada en 1996, y que de forma ininterrumpida ha actuado en San Sebastián, Barcelona, Lisboa, Madrid, Alicante y, la más reciente, celebrada en La Coruña en octubre de 2005.

Con posterioridad a la Conferencia de Wingspread, otras reuniones científicas como las celebradas en Weybridge 1996 (UK), de nuevo en Wingspread (1997), en Aronsborg (2001) y en Helsinki (2006) han servido para sentar las bases conceptuales de la disrupción endocrina, definir la forma de aproximación científica más apropiada y la correcta evaluación de la importancia de los disruptores hormonales en la salud humana y animal.

El término disruptor endocrino (Endocrine Disrupting Chemicals / EDCs) define hoy día a un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso. Se trata de sustancias exógenas al organismo, naturales o sintéticas, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo (COM, 1999). En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido efecto importante 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, en grandes cantidades y con gran libertad sin protección medio ambiental especial. 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 caracterizados POPs o contaminantes orgánicos persistentes, sobre los que sea han establecido medidas de control adecuadas (Porta et al., 2002; 2006).

Los efectos hormonales de los disruptores endocrinos pueden ser debidos a que: 1) mimetizan los efectos de hormonas endógenas, 2) antagonizan la acción normal de las hormonas, 3) alteran el patrón de síntesis y metabolismo de hormonas naturales, y/o 4) modifican los niveles de los receptores hormonales (Fernández et al., 1998).

Se ha sugerido que los disruptores endocrinos presentan características particulares que los hacen distintos a otros tóxicos medio ambientales y que condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad buscada entre exposición y enfermedad (Colborn et al., 1993), esta forma especial de toxicidad podría deberse a que:

1. El momento de la exposición es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto. Los efectos son distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto. Si actúan durante un periodo crítico, como por ejemplo en los estadios tempranos de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen lesiones irreversibles.

2. Los efectos pueden no aparecer en el momento de la exposición. Las consecuencias se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto. La exposición embrionaria puede tener consecuencias que no son evidentes hasta la madurez del individuo. El desarrollo anormal no se expresa necesariamente en el nacimiento; sus efectos pueden permanecer latentes durante años o hacerse patentes en la descendencia en lugar de en los individuos expuestos.

3. No existe un umbral de concentración preciso para el desarrollo del efecto toxicológico, o al menos, ese nivel de concentración es muy inferior al reconocido como límite de seguridad para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.

4. Es posible la acción combinada de los disruptores, que pueden adquirir al actuar conjuntamente un efecto paradójico, ya sea sinérgico, antagónico o simplemente aditivo.

Esta forma especial de acción toxicológica, que a veces escapa a las reglas más habituales del proceso de evaluación del riesgo, ha dado lugar a muy diversas interpretaciones del problema de la disrupción endocrina. Sirva como resumen de la perplejidad desencadenada la declaración del Comité de Expertos de la antigua Dirección General XXIV, hoy Comité Científico de la Toxicidad, Ecotoxicidad y el Medio Ambiente (1999), referente a lo que es, y lo que no es, disrupción endocrina ya que se dice textualmente que *disrupción endocrina no es un objetivo toxicológico per se*

como pudiera ser cáncer o alergia, es más bien el descriptor de un cambio fisiológico que puede conducir a un efecto adverso para la salud.

Como se ha dicho anteriormente, una de las acciones hormonales mejor documentada atribuible a los disruptores endocrinos es su capacidad de mimetizar o bloquear el efecto de los estrógenos, es decir, la posibilidad de actuar como un estrógeno o como un antiestrógeno. La potencia estrogénica de estos compuestos es muy variable y abarca desde mimetizadores tan potentes como el mismo estradiol a débiles agonistas que tan sólo tienen actividad parcial y a muy altas concentraciones (Olea y Olea Serrano, 1996; Olea et al., 1999). Todo esto ha llevado a considerar de forma especial dentro del grupo de los disruptores endocrinos a esta clase de moléculas que se incluyen todas bajo el epígrafe de xenoestrógenos, entendiendo por tales todos aquellos compuestos que manifiestan actividad estrogénica en ensayos *in vitro* e *in vivo* independientemente de su estructura química, procedencia y aplicaciones (Olea y Olea Serrano, 1996).

La hipótesis de causalidad de los disruptores endocrinos es relevante y plausible y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES), o las alteraciones observadas en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenoestrógenos (Soto et al., 1995). Desafortunadamente dentro de esta hipótesis general, la asociación entre exposición a compuestos químicos y riesgo de enfermedades hormono-dependientes tales como aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino ha sido escasamente explorada.

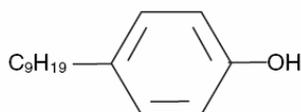
1.5.2 Compuestos organoclorados persistentes como disruptores endocrinos

Se presenta a continuación, de forma resumida, información sobre un grupo de compuestos Organoclorados persistentes que se clasifican dentro del grupo de disruptores endocrinos y que son de interés para el presente trabajo.

Alquilfenoles

Entre los usos de los alquilfenoles están el empleo como surfactantes en la síntesis de detergentes y como antioxidantes en forma de polietoxilatos (APE) (alquilfenolpolietoxilato) (Miller y Sharpe, 1998) para prevenir la decoloración de plásticos, como espermicidas, como aditivos de productos de cosmética y del petróleo y

en la industria textil y papelera. Las formulaciones industriales están compuestas generalmente por mezclas. Los principales alquilfenoles usados son nonilfenol y octilfenol y la longitud de la cadena del polietoxilato varía entre 1 y 50 unidades, dependiendo de su aplicación. Los APE no son estrogénicos *per se*, sino que parece que esta propiedad la adquieren durante su degradación microbiana. Los alquilfenoles son estrogénicos, siempre y cuando la cadena alquílica tenga al menos cuatro átomos de carbono en posición *para* con respecto al grupo hidroxilo (Perez et al., 1998). Aunque la primera evidencia de que los *para*-alquilfenoles podrían ser estrogénicos fue publicada en 1936 por Dodds and Lawson (Dodds and Lawson, 1936), no fue hasta la década de los 90 cuando el grupo de Soto, trabajando con células estrógeno-sensibles, advirtieron de forma accidental que las células proliferaban aún en ausencia de estrógenos. El responsable del efecto proliferativo era el nonilfenol de los tubos de plástico, componente utilizado en la fabricación de los mismos con poliestireno modificado para mejorar su resistencia a la rotura y prevenir su decoloración. Compuestos derivados del naftol, 6-bromonaftol y el ácido alenólico, y el butilhidroxianisol (BHA) se han incluido también en esta amplia familia (Soto et al., 1995).



Se ha demostrado que los alquilfenoles son relativamente persistentes y se acumulan en los organismos vivos. Están presentes en los sedimentos acuáticos y en la superficie de las aguas. La exposición ambiental a los alquilfenoles y su contribución a la carga de xenohormonal es desconocida. También se sabe muy poco de los derivados halogenados de los alquilfenoles, compuestos químicos resultantes de reacciones medioambientales de degradación y descomposición de los alquilfenoles polietoxilatos.

Absorbentes de radiación ultravioleta

Entre los productos químicos más utilizados como protectores de la radiación ultravioleta se encuentran la 3-benzofenona (3-Bp), el 4-metilbencilideno alcanfor, determinados ésteres del ácido salicílico, derivados alquilados del ácido *para*-aminobenzoico (PABA) y el octilmetoxicinamato. Estos productos se encuentran en una

gran variedad de fórmulas comerciales: cremas solares, espumas, geles de baño con burbujas, tintes, barras de labios y otros productos. Debido a su alta liposolubilidad, estas sustancias se bioacumulan en el medio ambiente y en el hombre. Se han detectado diferentes protectores de radiación ultravioleta en peces, por lo que es la alimentación la principal vía de exposición a través de la cual llegan estos compuestos al hombre. Recientemente, se ha observado que sustancias como el 4-metil-bencilideno alcanfor, el octilmetoxicinamato y la 3-Bp son capaces de producir una respuesta proliferativa en células MCF-7 de cáncer de mama y una respuesta uterotrópica en ensayos realizados con ratas (Schlumpf et al., 2001). De ahí la necesidad de realizar ensayos en animales para evaluar la toxicidad a largo plazo y los posibles efectos en la descendencia. Actualmente la información toxicológica sobre estas sustancias es escasa.

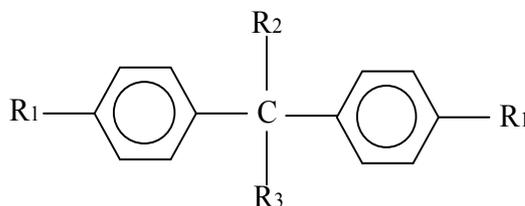
Bisfenol A y compuestos derivados

Dentro del grupo de sustancias ambientales hormonalmente activas se encuentran los monómeros de plásticos y de polímeros sintéticos. De éstos, el bisfenol A es el compuesto químico mejor estudiado. La producción europea de bisfenol-A (BFA) en 1998 fue de más de 700.000 Tm. Se emplea en la elaboración de plásticos (bolsas esterilizables), para el recubrimiento de latas de conserva, en albañilería, barnices, en materiales ortopédicos, en tintes y como base del composite dental. También se emplea como aditivo de otros materiales plásticos como resinas vinílicas y acrílicas y en gomas naturales y sintéticas. Se ha demostrado, asimismo, la presencia de BFA en alimentos, productos manufacturados y productos farmacéuticos (Fernandez et al., 2007; Vandenberg et al., 2007), por lo que el riesgo de exposición humana es considerable.

Su papel como mimetizador estrogénico fue descrito en 1936, por Dodds y Lawson al observar que la administración de bisfenoles a ratas ooforectomizadas ocasionaba cornificación vaginal e incremento de peso uterino (Dodds y Lawson, 1936), hecho confirmado, posteriormente, por otros autores tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Vandenberg et al., 2007).

Se ha demostrado que el bisfenol A también interfiere en la actividad tiroidea por su capacidad antagonista del receptor tiroideo beta (RT β), el cual mediatiza el efecto negativo de feedback de la hormona tiroidea sobre la glándula pituitaria mientras que, por el contrario, el BFA es menos eficaz como antagonista del RT α (Vandenberg et al., 2007).

La estrogenicidad *in vitro* de un amplio grupo de bisfenoles, incluidos los derivados halogenados y su dimetacrilato, ha sido estudiada recientemente. Se han determinado, así, las características de su estructura química que favorecen dicha función. De forma resumida se puede enunciar que: 1) La presencia de grupos cetónicos en el carbono central y de enlace éter y éster en los hidroxilos terminales se acompaña de una pérdida importante de estrogenicidad; 2) la sustitución de los hidrógenos del carbono central por cadenas hidrocarbonadas origina un aumento importante de la capacidad hormonal estrogénica (Pérez et al., 1998; Rivas et al., 2002). A pesar de que existen numerosos bisfenoles con distinta estructura química todos tienen en común la misma base.



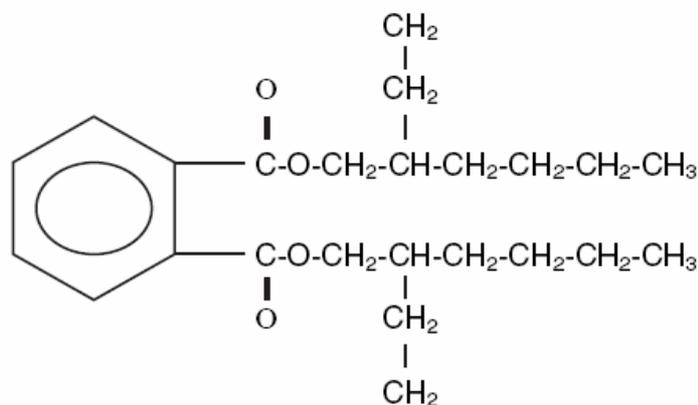
Bisfenoles

Ftalatos

Los ftalatos se utilizan como plastificantes en la manufactura de materiales plásticos y como antioxidantes en multitud de productos comerciales, muchos de ellos utilizados comúnmente para el empaquetado, conservación o almacenaje de artículos para el consumo humano. Se utilizan también para la fabricación de aceites lubricantes, adhesivos, tintas y perfumes. Su función es incrementar la flexibilidad y el manejo de polímeros de gran peso molecular. Se añaden generalmente a policlorovinilos (PVC).

Son compuestos químicos clasificados como ésteres del ácido ftálico o derivados del ácido benceno-orto-dicarboxílico. El plastificante que más se usa en la industria del PVC es el Bis-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP). En la mayoría de los casos, el plastificante representa una fracción minoritaria del peso total del producto final. Sin embargo, en algunos casos los ésteres de ftalato pueden representar el 50% del peso final del producto (Miller y Sharpe, 1998). Debido a su amplia distribución en el medioambiente, se han planteado problemas toxicológicos. Los ftalatos, debido a que no forman parte del polímero, se liberan poco a poco de la matriz plástica en la que se encuentran e

impregnan los materiales con los que se entran en contacto. En el suelo forman complejos con el ácido fúlvico, que es un componente del humus. Aparentemente, el ácido fúlvico favorece la movilización, transporte y solubilización de los ésteres de ftalato. Se ha demostrado también la presencia de ftalatos tanto en medios acuáticos como en aguas subterráneas, aguas superficiales e incluso agua de consumo, así como en aguas residuales y en los lodos procedentes de su depuración en gran variedad de localizaciones. La concentración a la que están presentes en medio acuático oscila entre nanogramos a miligramos por litro. El compuesto más frecuentemente encontrado es el bis-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) que está presente de forma muy frecuente en alimentos o en bebidas empaquetados con materiales plásticos y en productos lácteos como la leche, cremas, queso, mantequilla, pescado o en las fórmulas infantiles. También está presente en contenedores de comida de niños además de en embalajes de azúcar, pizza, hamburguesas, patatas fritas y margarinas (López-Espinosa et al., 2007), de los cuales pueden migrar al alimento y transformarse en una fuente más de exposición inadvertida.



Absorbidos por la piel humana, no se conoce bien el metabolismo de estos compuestos. Presentes en cantidades de miligramos por día, los compuestos comúnmente identificados son dibutilftalato (DBP), dimetilftalato, dietilftalato, di-*n*-octilftalato, bencilbutilftalato (BBP), bis-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) y bis-(2-etilhexil)-adipato (DEHA).

En general, los ésteres de ftalato presentan una toxicidad aguda baja y la DL50 en ratones es de 1,5 a 14,2 g/Kg. Se sabe que el DEHP incrementa la producción de tumores hepáticos en roedores. Probablemente la población expuesta a niveles

superiores de ftalatos sea la de los pacientes sometidos a algún tipo de terapia que utilice material plástico con DEHP, como bolsas de sangre, tubos y membranas de hemodiálisis y otros. Se conoce el efecto antiandrogénico del DEHP así como la acción tóxica con efectos reproductivos de muchos ésteres del ácido ftálico. Los estudios realizados indican que los ésteres de ftalatos afectan también al desarrollo y la reproducción al aumentar las causas de criptorquidia e hipospadia en animales de laboratorio, y al asociarse con distintos parámetros seminales. Además, se ha comprobado cómo la exposición temprana produce inactividad sexual en los machos, lo cual sugiere efectos en el sistema nervioso central (Hauser et al., 2005; Latini et al., 2006; Lottrup et al., 2006). Estudios de toxicidad realizados con DEHP muestran que 4 µg/ml son suficientes para destruir el 98% de células en cultivo. Esta concentración puede obtenerse cuando se almacena sangre para transfusión en bolsas de polivinilo por un periodo de uno a dos días. Además de su actividad estrogénica, algunos ftalatos como el di-n-butyl-ftalato bloquean la acción androgénica (Duty et al., 2003; Fisher et al., 2003 y 2004; Swan et al., 2005)

Según criterios toxicológicos, actualmente existen amplios márgenes de seguridad incluso para poblaciones muy expuestas o muy susceptibles, aunque el efecto de la exposición a ftalatos en la población humana se desconoce en buena medida.

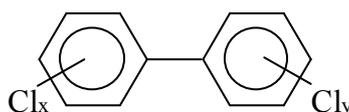
Bifenilos policlorados (PCBs)

Son un grupo de sustancias pertenecientes al subgrupo de hidrocarburos clorados aromáticos diseñados en 1930 bajo el nombre de Aroclor, Clophen, Phenoclor y Pyralene, entre otros. Por su gran estabilidad, resistencia al paso de la corriente eléctrica, inflamabilidad y lipofilia estos compuestos se empezaron a utilizar como lubricante hidráulico, fluido de transferencia térmica de aceites aislantes, coadyuvante de plaguicidas y líquidos selladores. Con el tiempo, estas sustancias han encontrado aplicación en una gran cantidad de productos de consumo. Sin embargo, estas mismas propiedades son las que han contribuido a su importante impacto ambiental, ya que una vez liberados al medio ambiente como consecuencia de accidentes, incineración o vertido incontrolado, su degradación es muy lenta, pudiéndose bioacumular en la cadena trófica.

Desde finales de los 70 su uso se prohibió en EE.UU, debido a que en ensayos en animales se observó un incremento de tumores hepáticos. Sin embargo, la industria química mundial ha generado más de un millón y medio de toneladas de PCBs en medio

siglo de producción, una gran parte de las cuales se ha liberado ya al medio ambiente. Actualmente, estos compuestos siguen presentes en transformadores y equipos cerrados.

Se conocen hasta ahora 209 congéneres que varían entre sí en el grado de cloración y en la posición de los átomos de cloro, aunque en las mezclas comerciales se han identificado 132 PCBs diferentes. Las muestras biológicas presentan una composición diferente a las mezclas comerciales tendiendo las primeras a tener un porcentaje mayor de isómeros con un grado menor cloración.



PCBs

La toxicidad de los PCBs depende de la estructura química y alguno de sus miembros ha demostrado poseer actividad estrogénica o antiestrogénica ([Kizu et al., 2003](#)). Los PCBs pueden absorberse por la piel, pulmones y tracto gastrointestinal. Se transportan por la sangre al hígado, desde donde son posteriormente redistribuidos al tejido adiposo. El metabolismo de los PCBs se realiza por medio del complejo enzimático citocromo P450 y comienza con la hidroxilación, proceso que origina hidroxibifenilos que siendo estrógenos más potentes *in vitro* que los PCBs nativos son capaces de producir un efecto uterotrópico ([Soto et al., 1995](#)). Hay numerosos estudios que relacionan los PCBs con alteraciones en la reproducción animal como pueden ser: disminución de la fertilidad, menor tamaño del útero, disminución del tamaño de los testículos en cerdos expuestos intraútero y durante lactancia y fertilidad reducida e inhibición de la conducta de apareamiento en ratas expuestas en la lactancia ([Toppari et al., 1996](#); [Richthoff et al., 2003](#); [Rignell-Hydbom et al., 2004](#); [Pocar et al., 2005](#)).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica los PCBs como probables cancerígenos (2A). Además los PCBs de uso comercial se han relacionado con hepatomegalia, hígado graso, letalidad aguda, pérdida de peso, atrofia de timo, inmunosupresión, efectos en el desarrollo y en la reproducción, toxicidad dérmica, neurotoxicidad, modulación endocrina y carcinogénesis.

Por otra parte, un estudio llevado a cabo en Córdoba para determinar niveles de PCBs en muestras de glándula mamaria de 123 mujeres en el que se consideraron los hábitos alimentarios, la edad y la ocupación pasada y actual, dio como resultado que el

compuesto encontrado en mayor concentración fue el PCB 180 (0,134 microg/g) y la existencia de una correlación positiva entre edad y niveles tisulares de los PCBs más abundantes. Estos resultados han sido recientemente confirmados por nuestro grupo de trabajo (Fernandez et al., 2007).

Estudios de dieta total realizados en E.E.U.U muestran una tendencia a la baja en la ingesta de PCBs desde 7 µg/día a principios de los 70 hasta 0,1 µg/día a finales de los 80. Una tendencia similar se ha observado en otros países como Japón, Canadá y Dinamarca. En España, en distintas Comunidades Autónomas, también se ha observado este efecto. Así, mientras que a principios de los 90 la ingesta de PCBs con comportamiento toxicológico similar al de las dioxinas era de 315 pg de equivalentes tóxicos/día, a finales de la misma década se redujo a 121 pg de equivalentes tóxicos/día.

En términos generales:

1) el carácter estrogénico depende del porcentaje de cloro de la molécula (a menos cloro mayor estrogénicidad); 2) la estabilidad se incrementa con la cloración.

Debido a su mayor o menor grado de cloración y a las posiciones de los átomos de cloro en su molécula los PCBs. Si las posiciones 2,2',6 y 6' no tienen ningún cloro los bifenilos se mantienen coplanares, hablando por tanto de PCBs coplanares o no-orto. Si tenemos una posición sustituida en cada lado, son PCBs mono-orto sustituidos, y el resto son los PCBs no coplanares. Los PCBs coplanares tienen importancia medioambiental y analítica debido a su toxicidad, parecida a la de las dibenzodioxinas policloradas (PCDD) y [dibenzofuranos policlorados](#) (PCDF), posiblemente debido a la coplanaridad de la molécula. La toxicidad de los PCBs coplanares es sensiblemente mayor que la de los PCBs no coplanares, debido a su estructura, aunque se encuentran en menores concentraciones en las matrices biológicas con respecto al resto de PCBs no coplanares, representando sobre un 5% o menos del total de PCBs cuantificados.

Dioxinas y furanos

La generación de policloro dibenzoparadioxinas (PCDDs), dioxinas, policloro dibenzofuranos (PCDFs) y furanos tiene lugar durante combustiones y otros procesos de síntesis orgánica en los que se encuentra presente materia orgánica y una fuente disponible de cloro (incineración, producción de PVC o papel, síntesis de plaguicidas, metales, blanqueantes, disolventes clorados). Debido a su estructura química (dos anillos aromáticos y varios átomos de cloro) las dioxinas son lipofílicas, bioacumulables y tienen una vida media en el hombre de 7-8 años. La incineración controlada o no de

residuos, junto con la fabricación de pentaclorofenol, hace que estos compuestos estén presentes en nuestro entorno. De todos ellos, el compuesto más importante desde el punto de vista toxicológico y el más estudiado es la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD).

Al igual que los PCBs estas sustancias presentan una amplia distribución ambiental, lipofilidad, larga vida media, una extremada resistencia a la degradación y biodegradación, y, por tanto, capacidad para bioacumularse en las cadenas tróficas. Hasta finales de los años 80 los niveles de dioxinas en Europa estaban en ascenso. Sin embargo, a partir de este año el control de las emisiones en las incineradoras hizo que los niveles en la población comenzaran a disminuir. La dieta es la principal vía de exposición a dioxinas contribuyendo en más del 95% de la exposición total. Otras fuentes de exposición son la placenta y la lactancia materna.

La IARC considera actualmente al TCDD como un agente cancerígeno relacionado con el cáncer de pulmón, sarcomas de tejido blando y linfomas no-Hodgkin. Por otro lado, el TCDD es el más potente inductor del receptor de andrógenos, lo cual tiene efectos adversos en el desarrollo y función del sistema reproductor masculino (Henriksen et al., 1996).

Plaguicidas organoclorados

Según la FAO/OMS, el término *pesticida-plaguicida* define las sustancias o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir o controlar cualquier especie de plantas o animales perjudiciales para otras plantas, animales o el propio hombre; incluye también otras sustancias o mezclas de ellas utilizadas como reguladoras de crecimiento de las plantas, defoliantes y desecantes. Este término no se aplica a los antibióticos, ni a los fertilizantes, ni a otros productos químicos administrados a los animales con objetivos diferentes, como son el estímulo de su crecimiento y el comportamiento reproductivo. En términos concretos, *pesticida agrícola* es todo producto químico, natural o sintetizado, destinado a luchar contra los parásitos animales o vegetales que atacan los cultivos, excluyendo los productos de uso en veterinaria.

Entre los plaguicidas organoclorados se engloban una gran diversidad de compuestos pertenecientes a las siguientes categorías: diclorodifeniletanos (DDT, DDD, DDE, dicofol, metoxicloro), ciclodienos (clordano, oxiclordano, heptacloro, aldrín, dieldrín, endrín y endosulfán), hexaclorobenceno, hexaclorociclohexanos y algunas estructuras químicas particulares como, por ejemplo, la vinclozolina o 3(3,5-

diclorofenil)-5-metil-5-viniloxazolidin-2,4-diona, incluida desde el punto de vista químico dentro de las carboximidazoles o la de los herbicidas fenoxiacidos.

Debido a su diversidad estructural, los plaguicidas se clasifican atendiendo a cualidades derivadas de su comportamiento frente a organismos vivos, su vida media o su patrón de degradación medio ambiental. Así, es frecuente que se agrupen en función de la persistencia en el medio ambiente, definida como el tiempo necesario para que un 75-100% del compuesto desaparezca del medio. Los plaguicidas organoclorados se incluyen dentro de los compuestos químicos persistentes. Aunque inicialmente la persistencia de estos productos se consideró como una cualidad deseable para su empleo, pasado el tiempo se han puesto de manifiesto los inconvenientes de este comportamiento ya que la alta lipofilia junto con la estabilidad química aumentan los efectos biológicos.

Debido a su naturaleza lipofílica los plaguicidas se acumulan en la cadena alimentaria, de forma que los animales que se sitúan en la cima de la misma son susceptibles de máxima exposición (Toppari et al., 1996). Ello hace que pueda encontrarse en los medios naturales y por ende en individuos no expuestos de forma directa.

La característica toxicológica general de los plaguicidas organoclorados es la estimulación del sistema nervioso central, aunque algunos pueden producir un efecto antagónico. El mecanismo de actuación para ciclodienos, HCB y HCH se produce mediante la interferencia de los receptores GABA (ácido γ aminobutírico). El DDT y derivados actúan alterando el transporte de Na^+ y K^+ e inhibiendo la actividad neuronal de las ATPasas y de la calmodulina. Por otro lado, estudios realizados tanto en animales de experimentación como en animales de diversos ecosistemas han mostrado que la exposición a organoclorados produce efectos estrogénicos que interfieren directa o indirectamente con la fertilidad y la capacidad reproductiva (Colborn et al., 1993).

i) DDT y metabolitos

El DDT fue el primero de los insecticidas de segunda generación. Se trata de un hidrocarburo aromático clorado (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) introducido en el mercado como insecticida en la década de los 40. Su hallazgo supuso el Nobel al químico suizo Müller por el papel de dicha sustancia en la lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores y plagas. Tal es la importancia que el DDT supuso en sus primeros años de uso que además del gran beneficio en la protección de

cosechas y en el aniquilamiento de insectos domésticos, se evitó la muerte de 5 millones de personas cada año. Un claro ejemplo de esta acción es el caso de la India, país en el que en 1952 hubo 75 millones de casos de malaria y en 1964, después de usar masivamente el DDT, tan sólo 100.000 casos. La máxima producción del insecticida se alcanzó en 1970 y a partir de entonces se fue prohibiendo su uso. La razón de ello fueron los graves problemas que se detectaron con su utilización. Uno de los principales efectos se puso de manifiesto en la reproducción de las aves, cuyos huevos tenían unas cáscaras extraordinariamente finas y frágiles y muchos se rompían durante la incubación. Ello hizo que las poblaciones de algunas especies de aves disminuyeran de forma alarmante (Colborn y Clement, 1992). Otro importante problema fue que muchos organismos desarrollaron resistencia y para luchar contra ellos había que emplear cantidades cada vez mayores del producto y con menor eficacia.

El DDT se acumula en la cadena trófica debido a su baja solubilidad en agua. Esta propiedad hace que no se elimine en orina, alcanzando los niveles más altos en el tejido adiposo.

Un hecho curioso en relación con el DDT es que cuando se aplica sobre una extensión de cultivo suele encontrarse en una concentración bajísima en las plantas mientras que en los insectos que se alimentan de ellas se acumula en concentraciones diez veces mayores. Si el insecto resiste al DDT resulta atrapado por ranas, por ejemplo, la concentración en ellas alcanza valores 100 veces mayores a los de las plantas. Las rapaces que comen a las ranas llegan a tener concentraciones 1000 veces mayores. De esta manera se produce una magnificación de las concentraciones hasta alcanzar sus máximos en las especies que ocupan los lugares más altos de las cadenas tróficas, como es el caso del hombre. Todas las poblaciones humanas, en cualquier parte del mundo, están expuestas a DDT y presentan niveles tisulares y séricos apreciables (Porta et al., 2002; Rivas et al., 2001; Botella et al., 2004; Cerrillo et al., 2004).

Aunque su uso está prohibido actualmente en los países occidentales, todavía se utiliza para el control de la malaria en los países en vías de desarrollo. Por esta razón la producción mundial de DDT es mayor en la actualidad que en el pasado. El DDT comercial está formado por aproximadamente un 77% de *p,p'*-DDT, un 15% de *o,p'*-DDT, un 4% de *p,p'*-DDE y porcentajes menores de otros isómeros. El metabolito lipofílico más estable del *p,p'*-DDT es el *p,p'*-DDE, que es el resultado de la dehidrocloración en el medio ambiente y en el hombre. Su presencia en los seres humanos puede reflejar tanto una exposición temprana al DDT como la exposición

directa al DDE medio ambiental. En general, los niveles de DDT/DDE representan un índice útil para evaluar el tiempo en que ocurrió la exposición. En comparación con otros países europeos, los niveles de DDT y DDE en la población española se encuentran en el rango medio-alto (Porta et al., 2002 y 2006; Botella et al., 2004).

La posibilidad de una exposición actual al pesticida no degradado aún existe en nuestro país. La orden que prohibió el uso del DDT entró en vigor en 1977 pero no está documentado cuando terminó realmente su utilización, si es que ha terminado completamente. Esta duda obedece a varias razones. En primer lugar, a que el DDT se sigue usando para fabricar productos, como el herbicida dicofol, que en consecuencia contiene DDT (Van de Plassche et al., 2003). En segundo lugar, existen indicios de que cantidades menores de DDT podrían estar entrando ilegalmente en España procedentes de otros países. En tercer lugar, periódicamente se tiene noticia de usos ocasionales en explotaciones agrícolas y ganaderas. En cuarto lugar, hay información de que el Instituto de Toxicología recibe periódicamente notificaciones y consultas relacionadas con personas que sufren episodios de intoxicación aguda por DDT (Porta et al., 2002).

Recientemente, se ha descubierto que países como África, Asia y Latinoamérica (con una más reciente exposición a DDT y DDE) tienen mayores niveles de estos compuestos en tejido adiposo que Europa y EEUU (Cocco et al., 2004; Dalvie et al., 2004). Como se verá más adelante, numerosos estudios han intentado determinar la existencia de una asociación significativa entre exposición a DDT y/o sus metabolitos y un mayor riesgo de padecimiento de algunas enfermedades como el cáncer de mama aunque no se han obtenido resultados concluyentes (van't Veer et al., 1997; López-Carrillo et al., 1997; Ibarluzea et al., 2004). La hipótesis que relaciona a estos compuestos con la etiología de cáncer mamario se fundamenta en su capacidad de alterar la diferenciación celular de la glándula mamaria, además de promover el crecimiento tumoral (Soto et al., 1995). Por otro lado el *p,p'*-DDE y el *o,p'*-DDE se han identificado como estrógenos débiles y/o como antiandrógenos, sugiriéndose que podrían actuar contrarrestando el efecto inhibitor de los andrógenos en los tumores de mama (Soto et al., 1995; Kelce et al., 1995 y 1997). El *p,p'*-DDE actúa como ligando del receptor de andrógenos y antagoniza la actividad transcripcional *in vitro*. En estudios *in vivo*, la exposición a este compuesto causa malformaciones en el tracto reproductivo masculino en neonatos, incluyendo disminución del peso de la próstata, supresión de los genes regulados por andrógenos, reducción del pezón y disminución del tamaño de la próstata ventral (Kelce et al., 1997). De todos los derivados del DDT el

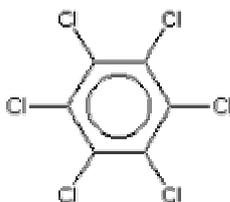
o,p'-DDT es el más estrogénico, si bien el *p,p'*-DDT muestra también una leve actividad estrógenica. Recientemente, la IARC ha clasificado al DDT como posible cancerígeno para el hombre.

El DDT ha pasado de ser un benefactor a un enemigo de la humanidad en los años 1970-80. Tras su prohibición y su hipotético desuso, se ha producido la incorporación de nuevos productos de estructura química similar a la suya en la lucha contra plagas y enfermedades, pero con características mucho menos peligrosas.

Estudios realizados en EE.UU. reflejan que los niveles de DDT y sus derivados en tejido adiposo eran de 5 ppm a principios de los 50, aumentaron entre tres y cuatro veces a finales de esa década y descendieron progresivamente en las tres décadas posteriores. Una tendencia similar se ha observado en los niveles sanguíneos de estos organoclorados. La evolución de los niveles poblacionales de DDT y sus metabolitos ha sido estudiada en profundidad en muy diversas partes del planeta ([Longnecker et al., 1997](#)).

ii) Hexaclorociclohexano

El lindano es el pesticida organoclorado más utilizado dentro de este grupo. Es uno de los cinco isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), concretamente el isómero gamma. Tiene actividad insecticida y constituye el 15% del total del HCH. Sigue en la historia al DDT dentro del grupo de los pesticidas organoclorados. Actualmente su uso está prohibido en los países occidentales o bien es muy restringido. Ha sido utilizado en agricultura y también en salud pública para el control de vectores y es uno de los pesticidas organoclorados más antiguos. A pesar de todo, el lindano se sigue vendiendo en las farmacias españolas para el tratamiento contra la sarna y se sigue utilizando en diversas zonas agrícolas. Su estructura química se indica a continuación:



El riesgo de exposición al HCH no ha desaparecido todavía debido al carácter persistente y estable en el ambiente de su molécula. Su acumulación en los tejidos más

grasos como la glándula mamaria, el sistema nervioso y el hígado se produce y su vía de entrada al organismo es respiratoria, cutánea y gastrointestinal.

El HCH tiene propiedades estrogénicas claramente demostradas. Destacan entre ellas la proliferación de células de cáncer de mama en ensayos *in vitro* (Soto et al., 1995) producida por el isómero β , y los efectos a nivel de epitelio uterino o vaginal en hembras ooforectomizadas en ratas, ratones y carneros expuestos a lindano o a β -HCH. En machos produce atrofia de los conductos seminíferos y células de Leydig y un comportamiento reproductivo atenuado (Li et al., 1998; Ulrich et al., 2001).

El efecto cancerígeno en el hombre no está demostrado aunque sí se ha observado este efecto en algunos modelos animales.

iii) Aldrín, dieldrín y endrín

Son un grupo muy homogéneo de pesticidas derivados del dimetano-naftaleno. El dieldrín es el principal metabolito del aldrín. Los tres compuestos tienen una toxicidad aguda mayor que otros pesticidas como los DDT, lo cual indica que son menos persistentes. El aldrín es un plaguicida ciclodieno ampliamente utilizado como insecticida en cultivos de maíz y algodón en las décadas de los 50 y 70, que se transforma rápidamente en dieldrín tanto en el medio ambiente como tras ser absorbido por el organismo. El endrín ha sido usado en agricultura como insecticida en el cultivo del tabaco, manzana, algodón, caña de azúcar y grano, así como en el control de roedores y aves. El dieldrín es tanto un pesticida en sí mismo como un metabolito oxigenado del aldrín. El endrín aunque muy similar en su estructura y función tiene algunas diferencias que lo distinguen del aldrín y dieldrín. El aldrín es el más volátil y se estima que su vida media en el suelo es de 1,5-5,2 años (Jorgerson, 2001). La exposición a aldrín y dieldrín ocurre mayoritariamente a través de la ingesta de comida contaminada, pero también tras inhalación y a nivel dérmico. Aldrín y dieldrín alcanzan concentraciones cada vez mayores en el cuerpo humano tras años de exposición y pueden afectar al sistema nervioso. En 1987, la EPA prohibió todos los usos de aldrín y dieldrín, debido a la preocupación sobre el daño al medioambiente y la salud humana.

El dieldrín se acumula en el tejido adiposo, mostrando una concentración en este compartimento 100 veces superior a la encontrada en sangre. Una vez que el aldrín se transforma en dieldrín, éste se metaboliza en el hígado y se excreta en heces y orina. La leche materna también puede ser una vía de excreción importante. La medida de

dieldrín en tejido adiposo y sangre se ha empleado para monitorizar la exposición a ambos compuestos.

Además del tejido adiposo, el dieldrín se concentra en el hígado, leche humana y semen. También se acumula en el cuerpo lúteo del ovario, placenta, glándula mamaria y en la médula espinal de la mujer (Lopez Espinosa et al., 2007). A diferencia del DDT y otros organoclorados en los que la concentración en la médula ósea es menor que en el tejido adiposo, existen datos que demuestran que el dieldrín se concentra en la médula ósea 19 veces más que en el tejido adiposo. Otros estudios han mostrado que el dieldrín pasa a través de la placenta y se acumula en el feto, particularmente en el hígado, grasa e intestino (Lopez Espinosa et al., 2007). A diferencia del DDT, los niveles de dieldrín que atraviesan la placenta no se incrementan con la edad de la madre. El dieldrín se encuentra en más del 99% de las muestras de leche humana analizadas en muchos países. A pesar de ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que los residuos de dieldrín en la leche humana no implican riesgo para el niño.

La actividad estrogénica del dieldrín se ha demostrado en ensayos *in vitro* con células estrógeno-dependientes de cáncer de mama y su nivel de actividad es comparable con el del DDT (Soto et al., 1995). La exposición al mismo es seguida en ocasiones de alteraciones en la fertilidad masculina (Toppari et al., 1996).

Aunque algunos estudios han sugerido un mayor riesgo de cáncer de mama en pacientes con niveles elevados de dieldrín en sangre y de aldrín en tejido adiposo (Ibarluzea et al., 2004), el poder carcinogénico de estos compuestos no se encuentra bien definido aún.

iv) Endosulfán y derivados

El insecticida endosulfán es un derivado del biciclohepteno que ha alcanzado gran importancia en la agricultura. Durante años ha sido el pesticida organoclorado más utilizado en plantaciones intensivas del sureste de España. El endosulfán es una mezcla de dos isómeros, I y II. El isómero I representa el 64-67% del producto técnico y el isómero II el resto. Aunque su uso en agricultura no está prohibido, se han rechazado partidas de alimentos animales y vegetales por su alto contenido en endosulfán. Su utilización en determinadas zonas como en el Delta del Ebro está hoy prohibida (DOGC núm. 1009, de 27 de junio de 1988).

De acuerdo con la información disponible, España ha sido el principal país consumidor de endosulfán dentro de la Unión Europea, seguido de Italia, Grecia y

Francia. En algunos países, por ejemplo Francia, el uso de endosulfán disminuyó considerablemente entre 1996 y 1997.

El efecto hormonal de endosulfán se sospechó al observar atrofia testicular y una caída de los niveles de testosterona en ratas y ratones expuestos al mismo, pero hasta 1995 no se presentó el primer informe sobre la estrogenicidad de endosulfán en el que se demuestra el efecto proliferativo que ejerce dicho compuesto sobre células humanas de cáncer de mama mantenidas en cultivo. Estos mismos investigadores han señalado también su afinidad por el receptor de estrógenos y su capacidad para inducir la síntesis y secreción de proteínas estrógeno-inducidas (Soto et al., 1995). Se ha demostrado, asimismo, que endosulfán mimetiza el efecto estrogénico en muy diversos modelos *in vitro* e *in vivo* (Andersen et al., 1999). Otros estudios han atribuido a endosulfán actividades hormonales distintas de la estrogenicidad, al ser un buen competidor para el receptor de progesterona, aunque otros autores sugieren que la actividad hormonal de endosulfán es independiente del receptor.

Datos recientes indican que endosulfán causa efectos de disrupción endocrina en especies tanto acuáticas como terrestres: alteraciones en el apareamiento de anfibios, reducción de la secreción de cortisol en peces, atrofia testicular y caída espermática en mamíferos (Wirth et al., 2002; Gormley et al., 2003). Existen informes que han confirmado los datos de estrogenicidad para endosulfán y endosulfán sulfato en células humanas sensibles a estrógenos (Soto et al., 1995), por lo que endosulfán se clasifica hoy entre los pesticidas estrogénicos (Vonier et al., 1996; Andersen et al., 1999). Recientemente, se ha demostrado que algunos de sus metabolitos (endosulfán éter y endosulfán diol) también inducen la proliferación celular estrógeno dependiente (Rivas et al., 2001).

El endosulfán es un compuesto liposoluble con una larga vida media ambiental que se almacena en tejido adiposo. En su metabolismo se producen diversidad de metabolitos que en buena medida son hidrosolubles, lo cual facilita su excreción. Entre todos sus metabolitos, endosulfán sulfato es el más importante. Este puede ser transformado a endosulfán éter, que está en equilibrio con endosulfán diol. La persistencia media de endosulfán I y II es de 800 y 60 días, respectivamente.

Las grandes áreas de agricultura intensiva en Europa se encuentran en el Sureste español, cerca de la costa mediterránea. Este tipo de agricultura requiere el uso de grandes cantidades de pesticidas (Olea et al., 1999). Apoyándose en este hecho el grupo de trabajo del profesor Olea llevó a cabo un estudio (Cerrillo et al., 2004) en mujeres y

niños de la zona de Granada y Almería con objeto de analizar los niveles de endosulfán y metabolitos en los diferentes compartimentos corporales y su distribución corporal. Los resultados del mismo señalan que la mayor concentración de endosulfán comercial I y II se produce en el tejido adiposo, seguido de leche humana, hecho que apoya la idea de la eliminación de compuestos lipofílicos a través de la misma. Los metabolitos más hidrofílicos se encontraron en placenta y sangre de cordón umbilical en concentraciones elevadas (endosulfán diol presentó un valor medio 13,23 ng/ml). Estos resultados sugieren que en el Sur de España las mujeres, durante la edad reproductiva, han estado y siguen estando expuestas a endosulfán. Además, debido a su movilización durante el embarazo y la lactancia es necesaria una investigación adicional acerca de las consecuencias que estos compuestos pueden tener en la salud infantil. En relación con ello es importante hacer notar que en la población infantil de Murcia y Granada se ha encontrado residuos de endosulfán y algunos metabolitos en el 40% y 30% de las muestras de grasa analizadas, respectivamente. En la población femenina afecta de cáncer mamario alcanza un nivel de concentración de hasta el 68% de frecuencia (Botella et al., 2004; Cerrillo et al., 2004).

v) Metoxicloro

El metoxicloro es otro pesticida organoclorado de interés. Es, sin duda, el más conocido y empleado de los análogos del DDT. Tiene un espectro de toxicidad para los insectos más limitado que el DDT y presenta la ventaja de ser menos tóxico para los mamíferos. El metoxicloro ha demostrado ser útil para el control de las plagas domésticas, tales como mosquitos, moscas y polillas, las plagas del ganado como moscas y piojos, el escarabajo mejicano de las judías, y una gran variedad de insectos que atacan las frutas, verduras y cosechas de forraje. Una ventaja adicional del empleo del metoxicloro sobre otros pesticidas es su más rápido metabolismo y mayor biodegradabilidad en los organismos animales. En el caso concreto de los animales de sangre caliente, el metoxicloro se detoxifica por desmetilación. Ello parece contribuir a la reducción de los efectos crónicos inducidos por otros hidrocarburos clorados.

El metoxicloro presenta actividad proestrogénica, es decir, necesita ser activado *in vivo* o *in vitro* usando microsomas hepáticos para la génesis del metabolito activo. Su actividad hormonal estrogénica ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* (Bulger et al., 1978). Cuando se administra *in vivo* produce efectos adversos sobre la fertilidad y sobre la actividad uterina en hembras. También se han descrito efectos adversos en animales

macho (alteración del comportamiento sexual) expuestos intraútero (Cummins, 1997). No está completamente determinado si los efectos en la función reproductora del metoxicloro son debidos a una acción agonista o antagonista hormonal. Hall y colaboradores (Hall et al., 1997), estudiando los efectos de este pesticida sobre la implantación y el desarrollo del embrión en ratones, llegaron a la conclusión de que el metoxicloro actúa como agonista estrogénico a nivel del útero y oviducto pero presenta una acción antiestrogénica en el ovario. Por otra parte, parece que el metoxicloro altera la preimplantación normal.

En la conferencia de Estocolmo de 2001 sobre contaminantes orgánicos persistentes se concluyó que su producción y uso es aceptable en la lucha contra los vectores de ciertas enfermedades. Con el propósito de reducir y eliminar la utilización del DDT, la Conferencia alentó a los países que utilizan dicha sustancia a que elaboren un plan de acción en el que se apliquen productos, métodos y estrategias alternativas (Porta et al., 2002 y 2006).

vi) Mirex

El mirex pertenece al grupo de derivados del pentaclorociclododecano. Estos insecticidas derivan de una estructura en forma de *caja*. El mirex se emplea como retardador del fuego originado por plásticos, pinturas, y utensilios eléctricos y su uso está restringido o prohibido actualmente en la mayoría de los países. Al presentar un alto grado de cloración y dificultad de metabolización o eliminación se facilita su acumulación. Tiene un período de hasta diez años en el sedimento. Al igual que el resto de organoclorados se acumula en el tejido adiposo y se excreta con mucha dificultad. Por lo tanto, se trata de un insecticida que sufre biomagnificación de miles de veces en la cadena alimentaria (Ahlborg et al., 1995). Ha habido pocos estudios sobre exposición humana a mirex, y existen pocos datos sobre sus efectos en salud humana. Dosis de mirex similares a las ingeridas en la dieta han inducido reacciones adversas en animales.

vii) Hexaclorobenceno

El Hexaclorobenceno (HCB) es un conocido disruptor endocrino que, por mecanismos biológicos comunes a los descritos para compuestos orgánicos similares, se concentra en la grasa de los organismos vivos. El HCB fue introducido en 1945 como fungicida para enlentecer la tasa de crecimiento de los hongos. El HCB puede persistir en el medioambiente durante años, con una vida media estimada en el suelo de 23 años.

Ha sido usado como fungicida para proteger las cebollas, las semillas de trigo y otros granos. Su producción, con este fin, fue prohibida en 1971 en Norte América, pero todavía se sigue utilizando en la fabricación de solventes, compuestos que contienen cloro en su molécula y pesticidas. La Agencia de Protección Medioambiental (EPA) ha revelado que se han encontrado niveles detectables de HCB en los tejidos del 95% de la población, aproximadamente. Cientos de personas estuvieron expuestas a HCB en el Kurdistán (este de Turquía) entre 1955 y 1961. El HCB está presente en alimentos, por ejemplo, margarinas, leche humana (Campoy et al., 2001), leche esterilizada y alimentos grasos como el queso. Para medir la ingesta diaria de HCB en la población catalana, Falcó y colaboradores (Falco et al., 2004) determinaron las concentraciones de HCB en muestras de comida en siete ciudades, entre junio y agosto del 2000. En general, los residuos de HCB resultaron ser bastante bajos excepto para los productos de consumo diario (0,869 ng/g de peso húmedo). En 1994, un estudio realizado en la población de Flix (Ribera del Ebro, Tarragona) puso en evidencia que sus habitantes presentaban unas concentraciones séricas muy elevadas de HCB debido a la proximidad a una empresa electroquímica (Sala et al., 1999). Asimismo se observó que los niños nacidos en dicha población entre 1997 y 1999 presentaban, en el momento de nacer, concentraciones muy elevadas de HCB, así como concentraciones detectables de PCB y *p,p'*-DDE en sangre (Sala et al., 2001). Aunque los niveles de contaminación por HCB en esta población continúan siendo elevados, se ha comprobado que las mujeres de 18-40 años presentaron concentraciones en sangre venosa un 61% más bajas en 1997-1999 que en 1994 (4,1 ng/ml frente a 10,6 ng/ml). Las concentraciones de *p,p'*-DDE y lindano también mostraron esta tendencia a la baja, aunque su disminución no fue estadísticamente significativa (Ribas-Fitó et al., 2003). Otros estudios han encontrado también niveles de HCB en la población española (Barcelona). Por ello, a pesar de que la exposición ha sido reducida, la población estudiada aún acumula cantidades significativas de este posible carcinógeno.

El HCB es muy persistente en el medio ambiente y sus efectos en animales de laboratorio resultan ser los siguientes: alteración de la función ovárica, disminución de la fertilidad y disminución del peso de ambas vesículas seminales y de la próstata ventral (Foster et al., 1996). La exposición en niños puede afectar el desarrollo reproductivo, físico y mental. Se ha demostrado que las muestras de tejido de niños con criptorquidismo presentaban elevados niveles de HCB en comparación con sus pacientes controles (Hosie et al., 2000). Otro estudio sugiere que, tanto *in vivo* como *in*

vitro, el HCB agoniza débilmente la acción de los andrógenos y, como consecuencia, bajos niveles de HCB incrementan la acción de los andrógenos mientras que altos niveles la reducen (Ralph et al., 2003).

Existe controversia en cuanto a si el HCB está asociado o no al cáncer de mama. Mussalo-Rauhamaa y colaboradores (Mussalo-Rauhamaa et al., 1990) han descrito niveles mayores de HCB en el tejido graso mamario de pacientes con cáncer de mama que en sus controles. Otros autores, sin embargo, no apoyan esta hipótesis.

viii) Vinclozolina

La vinclozolina es un fungicida sistémico del grupo de las dicarboximidias. Es efectiva en el control de enfermedades causadas por las especies *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilinia*. Su uso como fungicida ha estado registrado en EEUU desde 1981. Los fungicidas del grupo de las dicarboximidias han sido ampliamente usados en Europa para proteger uvas, frutas, vegetales, plantas ornamentales, lúpulo y césped del daño de los hongos. La vinclozolina se aplica típicamente en forma de spray. Se estima que la exposición a vinclozolina es de 2 µg/kg/día a través de la ingesta, aunque la exposición ocupacional puede ser mayor. La población general puede estar expuesta a vinclozolina y sus metabolitos a través de la dieta (EPA R.E.D. FACTS, October 2000). Por ejemplo, el vino tinto, los kiwis (0,47 mg/kg) y otros productos alimenticios contienen residuos de vinclozolina (Oliva et al., 1999).

En el año 2000, Vanni y colaboradores propusieron al compuesto 3,5-DCA como producto final de la degradación de los fungicidas dicarboximídicos. Su determinación aún no ha sido prevista por los políticos. Para evitar la reintroducción de sustancias potencialmente carcinogénicas en el ciclo productivo agrario, el análisis de residuos de fungicidas y sus metabolitos es importante ya que muchas veces su acción tóxica es superior a la del compuesto original (Vanni et al., 2000).

Actualmente, la EPA considera que el riesgo carcinogénico atribuible a la vinclozolina a través de la dieta se debe al compuesto 3,5-DCA, que es también un metabolito común de la degradación de otros dos fungicidas, iprodiona y procymidona. El anillo 2,4-oxazolidinediona de la vinclozolina sufre un proceso de hidrólisis resultando dos productos, M1 y M2, hasta ahora identificados (Molina-Molina et al., 2006). Aunque la conversión de vinclozolina a M1 es irreversible, la conversión a M2 no lo es. La vinclozolina y sus metabolitos son potencialmente muy móviles en el

suelo y en el agua. La vida media del total de residuos (vinclozolina más metabolitos que contienen dicloroanilina) va desde 179 hasta más de 1000 días. La persistencia del total de los residuos parece ser atribuible a la resistencia que presenta la 3,5-DCA a la degradación.

Los efectos de la exposición *in vivo* a vinclozolina están mediados por la formación de los metabolitos antiandrogénicos M1 y M2 debido a que la competición de la vinclozolina por el receptor de andrógenos es muy débil. En el caso de los metabolitos M1 y M2 ésta competencia es del orden de 10 a 100 veces más efectiva que la de la vinclozolina (Kelce et al., 1997). Por tanto, cualquier medida del riesgo potencial de la vinclozolina en salud debe incluir el estudio, no sólo del compuesto parental sino también de sus productos de hidrólisis encontrados en la tierra, las plantas y los animales expuestos.

Los efectos más dramáticos que ejerce la vinclozolina ocurren durante las etapas de desarrollo de los animales (Gray et al., 2001) (etapa pre o neonatal). Destacan entre ellos: hipospadias, testículos ectópicos y agénesis de la próstata ventral. En las hembras, por el contrario, la descendencia resulta ser fenotípicamente normal (Gray et al., 1994 y 2001). La exposición a 50 mg de vinclozolina/kg por día durante el desarrollo (día gestacional 14 a día postnatal 3) causa infertilidad y reduce la cantidad de esperma eyaculado en la descendencia de machos adultos debido fundamentalmente a hipospadias severas. Sin embargo, la fertilidad no se ve afectada en ratas macho adultas tras una prolongada y alta exposición (100 mg/kg por día durante 25 semanas). Estos resultados indican que el feto es particularmente sensible a disruptores endocrinos tipo vinclozolina. Por otra parte, la exposición peripuberal a vinclozolina en ratas retrasa la pubertad, inhibe el desarrollo de los tejidos dependientes de andrógenos y altera otras funciones dependientes de los andrógenos. En otras especies de animales como los peces se altera también el desarrollo testicular y la gametogénesis, además de causar desmaculinización, y en las aves se modifica el comportamiento reproductivo y endocrinológico (Guillette, 1994; Gray et al., 2001).

En ensayos *in vitro* de estrogenicidad, androgenicidad y actividad aromatasa, la vinclozolina reacciona como un potente antagonista de receptor de andrógenos (Kelce et al., 1997). Existe también evidencia de que la vinclozolina puede afectar el desarrollo de la función del sistema neuroendocrino ya que se ha demostrado en ratas que la exposición a vinclozolina durante la etapa neonatal podría afectar el comportamiento durante el juego.

En humanos, las disfunciones al nacimiento más comúnmente observadas son consecuencia de la inhibición del receptor de andrógenos y tienen como efecto alteraciones en el tracto reproductor masculino. Las hipospadias se han ligado a exposición fetal de compuestos estrogénicos durante el primer trimestre. Otro problema que los antiandrógenos ambientales como la vinclozolina pueden exacerbar es el aumento de la incidencia de cáncer de mama en mujeres (Kelce et al., 1997). Los andrógenos son naturalmente antiestrogénicos en el tejido mamario y suprimen el crecimiento tanto de las células normales como cancerígenas en la mama. Los antiandrógenos naturales pueden interferir con esta acción. Además, vinclozolina y/o sus metabolitos se han encontrado asociados con tumores testiculares (células de Leydig) (Yu et al., 2004).

1.5.3 Exposición humana a disruptores endocrinos

La contaminación por disruptores endocrinos (DE) de la población general es un hecho relevante desde una perspectiva de salud pública. Es, asimismo, importante para el sistema sanitario asistencial y para las políticas ambientales, alimentarias, industriales y económicas. En España los conocimientos sobre la contaminación de los alimentos por disruptores endocrinos presentan grandes vacíos temporales y geográficos, pero aún es menor la información sobre sus concentraciones en las personas ya que no existe ningún estudio representativo de una población general sana, efectuado en una zona geográfica amplia.

Los estudios disponibles indican que en un 80-100% de la población existen concentraciones detectables de DDE, policlorobifenilos, heclaclorobenceno o hexaclorociclohexanos, entre otros compuestos (Sala et al., 1999 y 2001; Campoy et al., 2001; Rivas et al., 2001; Covaci et al., 2001; Porta et al., 2002 y 2006; Olea et al., 2002; Chu et al., 2003; Botella et al., 2004, Cerrillo et al., 2005 y 2006; Carreño et al., 2007; Lopez Espinosa et al., 2007; Fernandez et al., 2007). Pero incluso para los compuestos mejor caracterizados aún hay cuestiones por resolver, como por ejemplo, a qué factores obedece la presencia de DDT en la sangre o en la placenta de los recién nacidos en nuestro país (Olea et al., 1999 y 2002; Sala et al., 1999; Lopez Espinosa et al., 2007; Fernandez et al., 2007). La prohibición de este compuesto y su degradación a DDE deberían hacer pensar que no se detectase en ellos.

Por otra parte, para añadir más complejidad a este asunto, el número de estudios sobre los efectos que los disruptores endocrinos tienen en las personas es aún muy exiguo, lo que sugiere que concentraciones de algunos disruptores endocrinos por debajo de las que normalmente se consideran “seguras” pueden causar efectos biológicos y clínicos relevantes ([Porta et al., 2002 y 2006](#))

Muchos de los disruptores endocrinos tienen una gran inercia química (persistencia en el medio, efectos a largo plazo, bioacumulación), se han dispersado y contaminan amplias zonas del planeta, son muy difíciles de excretar por el cuerpo humano, en el que tienen una larga vida media, y se acumulan en los tejidos grasos ([European Workshops on Endocrine Disrupters, 2001](#); [Olea et al., 2002](#)). Por ejemplo, un disruptor endocrino tipo pesticida organoclorado, cuando penetra en los tejidos vegetales y animales puede metabolizarse, es decir, sufrir una biotransformación, que puede ser detoxificadora, pero también cabe la posibilidad de que se convierta en una forma molecular más tóxica que el plaguicida original. Además de metabolizarse, el pesticida una vez dentro del organismo, puede almacenarse en grasa o excretarse sin cambio alguno. En conjunto, las biotransformaciones permiten cambiar un xenobiótico apolar en derivados polares, más fáciles de eliminar por vía renal o biliar. De hecho, las diferencias de toxicidad entre especies se explican por un metabolismo diferente. Pero estas diferencias pueden ser, no sólo cualitativas o de mecanismo, sino también cuantitativas. Es decir, que tiene gran importancia el ritmo de detoxificación y eliminación, pues cuanto más persisten los residuos en el organismo, más probables son los efectos a largo plazo ([Olea et al., 2002](#)).

Muchos de estos disruptores endocrinos persistentes llegan hasta nuestro organismo a través de una exposición ambiental “de fondo”, continua, a dosis muy bajas, fundamentalmente a través de la dieta, sobre todo a partir de la grasa de los alimentos, sobre todo de la grasa reciclada que se utiliza para fabricar productos de pastelería y piensos. Diversos estudios han observado que, en España, muchas muestras de carne, pescado, huevos, leche, mantequilla, queso o cereales contienen residuos de DDE, PCB, hexaclorobenceno e isómeros del lindano ([Badia-Vila et al., 2001](#); [Blasco et al., 2004](#); [Falco et al., 2004](#); [Porta et al., 2002 y 2006](#)). De esta forma, la vía digestiva se convierte en la principal ruta de exposición a xenoestrógenos persistentes para el hombre debido a su acumulación en la cadena alimentaria, aunque las formas de exposición y las vías de entrada de los contaminantes hormonales son muy diversas.

Tanto es así que la composición de las mezclas lipofílicas encontradas en los tejidos humanos varía de acuerdo con las diferencias regionales en el uso de estos compuestos y con los hábitos dietéticos de las poblaciones expuestas ([Archibeque-Engle et al., 1997](#)).

Además de los alimentos, la exposición a disruptores endocrinos de la población general puede ocurrir también a través de la contaminación existente en aire, agua (superficial y subterránea), agua de bebida, suelo, flora y fauna. Esta contaminación ambiental ha sido documentada en recientes análisis, especialmente en áreas dedicadas a la agricultura intensiva ([García-Rodríguez et al., 1996](#); [Olea et al., 1999](#); [Carreño et al., 2007](#)); y afecta a las poblaciones que residen en estas áreas geográficas ([Rivas et al., 1999](#); [Campoy et al., 2001](#); [Botella et al., 2004](#); [Cerrillo et al., 2006](#)).

En cuanto a la exposición ocupacional, ésta afecta fundamentalmente a trabajadores expuestos en aplicaciones terrestres y aéreas de estas sustancias en la agricultura, a aquellos que realizan trabajos agrícolas en zonas tratadas con pesticidas o próximas a ellas y a los que participan en su fabricación ([Cocco et al., 2004](#); [García et al., 1999](#)). Es grande, por todo esto, la dificultad para identificar la exposición a xenoestrógenos.

Para la mayoría de los productos químicos descritos hay un patrón de incremento de la carga corporal con la edad. Ello es probablemente consecuencia de tres factores ([Ahlborg et al., 1995](#)):

1. La acumulación de los productos a través del tiempo.
2. La mayor exposición en personas de mayor edad debido a que vivieron en periodos de gran uso de derivados organoclorados.
3. El metabolismo más lento y la imposibilidad de detoxificación a través de la lactancia o el embarazo en individuos de mayor edad.

En España, sólo se ha publicado un estudio que haya medido las concentraciones de disruptores endocrinos en una población humana de forma longitudinal; es decir, que haya efectuado mediciones de disruptores endocrinos con la misma metodología en la misma población y en más de un momento. Se trata de un trabajo efectuado en Mataró a raíz de la apertura de una planta incineradora. El hallazgo más importante del mismo es que durante los 4 años de seguimiento las concentraciones de dioxinas y furanos aumentaron un 45% en la población de Mataró que vive lejos de la planta y un 40% en el grupo que reside cerca de ella. La explicación más probable es la contaminación

alimentaria. Además, el valor de dioxinas en ambas poblaciones es aproximadamente un 25% superior al observado en otros países (Sala et al., 1999).

Como ya se ha comentado anteriormente, varios estudios realizados en España han identificado pesticidas históricos clasificados como disruptores endocrinos presentes en distintos alimentos según su concentración en materia grasa y su procedencia. Así por ejemplo, en un estudio realizado en Zaragoza se analizaron seis tipos diferentes de alimentos cárnicos, encontrándose valores de *p,p'*-DDE de 4 µg/kg de grasa (Porta et al., 2002; 2006). Un año después, se analizaron los niveles de DDT y hexaclorociclohexano en leche pasteurizada, obteniéndose valores positivos del 96% y el 74% respectivamente (Porta et al., 2002; 2006). Un estudio posterior observó que el 50% de los alimentos basados en pescado contenía residuos de PCBs (Lázaro y col, 1999). Un estudio reciente ha confirmado que la contaminación por organoclorados en los alimentos españoles es más importante que la del resto de Europa al encontrar diferencias significativas en los niveles de lindano, HCB y β-HCB en mantequillas españolas en relación con las de otros países (Badia-Vila et al., 2000). Otros autores han encontrado diferencias en los niveles de lindano, DDE y dieldrín medidos en el tejido graso de las aves españolas del norte y del sur. El grupo de las triazinas fue el principal grupo de plaguicidas detectado en el agua de los ríos que suministran a la ciudad de Barcelona. También se han encontrado niveles de siete organoclorados en el hígado, músculo, riñón y suprarrenales de animales salvajes de la provincia de Galicia, siendo el *p,p'*-DDE el más frecuente y abundantemente encontrado. Análisis llevados a cabo en aguas de ríos próximos a Madrid revelan un uso reciente del *p,p'*-DDT debido a que sus niveles han resultado ser mayores que los de su metabolito *p,p'*-DDE (Porta et al., 2002).

Al analizar el tejido graso de la población infantil de nuestro país se ha puesto de manifiesto la presencia de endosulfán y de valores apreciables de organoclorados como aldrín, dieldrín, DDT, DDE y lindano en la mayor parte de las muestras analizadas (Olea et al., 1996; Lopez Espinosa et al 2007). En un trabajo realizado sobre leche materna de mujeres de Almería y Granada, aparece una correlación positiva entre los valores encontrados de *p,p'*-DDD y metoxicloro y la ingesta total de grasa de la población. También se ha encontrado una relación significativa entre la ingesta de vegetales y los niveles de endosulfán-lactona. En este estudio se concluye que los niveles de organoclorados encontrados en leche materna, suero y tejido adiposo de mujeres embarazadas muestran claramente un riesgo de exposición fetal a estas

moléculas (Campoy et al., 2001). De acuerdo con nuestros datos, la acumulación de xenoestrógenos en tejido graso durante la vida de la madre puede suponer una importante fuente de exposición para el hijo, tanto durante la gestación como a través de la lactancia (Olea et al., 1999). Sólo esta vía de exposición placentaria y por la leche materna es capaz de explicar los niveles de algunos disruptores detectados en grasa de niños de corta edad (Olea et al., 1999; Cerrillo et al., 2004; Lopez Espinosa et al., 2007; Fernandez et al., 2007). Además del empleo de insecticidas y fertilizantes ya aludido en esta presentación, otras fuentes de exposición a otros tipos de disruptores endocrinos son igualmente inquietantes: i) la producción cárnica descansa en un amplio uso de estimulantes del crecimiento y antibióticos; ii) el rápido desarrollo del uso de plásticos ha resultado ser una fuente de exposición a compuestos químicos que llegan a los alimentos; iii) el número de medicamentos ha aumentado enormemente y la eliminación de sus metabolitos por vía urinaria y fecal contamina los cursos del agua.

1.5.6 Síndrome de disgenesia testicular

En 2001, el equipo liderado por el profesor Niels Skakkebaek publicaba un artículo en la revista *Human Reproduction* en el que se revisaba de forma pormenorizada las pruebas que sugerían que una serie de alteraciones de la salud reproductiva tenían, como base pato-fisiológica común, cambios que ocurrían durante el desarrollo fetal del testículo. Así, sugerían que el incremento en la incidencia de cáncer de testículo (Adami et al., 1994), la pobre calidad seminal y el descenso en el recuento espermático en algunas regiones del mundo (Carlsen et al., 1992), el incremento en la frecuencia de criptorquidias e hipospadias (Paulozzi et al., 1997), junto con el aparente crecimiento en la demanda de reproducción asistida, no eran más que signos de un problema de salud, con una base común, al que denominaron *Síndrome de Disgenesia Testicular* (TDS). La hipótesis patogénica de Skakkebaek y colaboradores propone que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo, variaciones sutiles de los niveles hormonales pueden dar lugar a lesiones que conducen a disfunción orgánica y, en última instancia, a enfermedad clínica. La hipótesis incluye como principal causa etiológica a los factores ambientales y al estilo de vida, que determinan la exposición a sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal. Estos factores exógenos tienen un mayor peso en la asociación causal que otros factores endógenos o de base genética. Esto no excluye, no obstante, la predisposición particular del

individuo relacionada con la presencia de polimorfismos genéticos específicos, potencien el papel de los factores ambientales (Nef et al., 2000; Skakkebaek et al., 2001).

Datos de investigación básica, clínica y epidemiológica sugieren que en el origen de las patologías anteriormente citadas puede encontrarse una alteración importante en la diferenciación de las células germinales que afectaría a la funcionalidad de las células de Sertoli y de Leydig (Rajpert-De Meyts et al., 2000). En la hipótesis patogénica tanto los factores ambientales, entre los que se incluyen las sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal (disruptores endocrinos), como algunos defectos genéticos, afectan a la funcionalidad de las células de Sertoli o de Leydig (Rajpert-De Meyts et al., 2000). En el primero de los casos, una función celular de Sertoli alterada da lugar a una alteración importante de la diferenciación de las células germinales que en última instancia se manifiesta clínicamente ya sea como pobre calidad seminal o mediante la transformación maligna hacia cáncer testicular. En la otra vía, la disminución de la función de las células de Leydig trae consigo una insuficiencia androgénica que se manifiesta clínicamente como hipospadias y/o criptorquidia. En el origen de estos cuadros está, por tanto, un único proceso, el síndrome de disgenesia testicular como causa de este abanico de enfermedades.

Para añadir más complejidad al enunciado patogénico, se establecen relaciones de conexión entre las dos grandes vías (Sertoli y Leydig) y se propone que la expresión de los síntomas clínicos variará con la severidad del síndrome, de tal manera que algunos individuos presentarán más patología que otros, pero siempre dentro del ámbito del cuadro descrito. Mientras que en los casos más leves tan solo es apreciable un problema en calidad y cantidad de producción espermática y el riesgo de cáncer testicular es mínimo, en los casos más severos junto a las alteraciones en la espermatogénesis, aparecerán alteraciones en el descenso testicular y una mayor probabilidad de cáncer de testículo.

Los datos epidemiológicos recogidos por Skakkebaek y sus colegas parecen indicar que la prevalencia del síndrome descrito es mayor de lo que se suponía, ya que el síndrome, en su forma leve, podría estar afectando a cerca de un quinto de la población danesa, si se consideran los datos de calidad seminal en ese país (Andersen et al., 2000).

Quizás una de las repercusiones mayores de la nueva hipótesis planteada por el equipo danés radica en el hecho de que los estudios epidemiológicos en calidad espermática, no descenso testicular e hipospadias y cáncer de testículo, deberían considerar aquellos aspectos que permitan establecer una asociación de causalidad entre estas patologías y factores medioambientales (García et al., 1999; Weidner et al., 1998). A este respecto, es de capital importancia el papel otorgado a la exposición fetal a sustancias químicas con actividad hormonal ya que tanto los datos observacionales en animales, como la epidemiología humana y los estudios de laboratorio orientan sobre el papel de las hormonas y sus mimetizadores y antagonistas sobre cada una de las enfermedades de interés (Sharpe y Skakkebaek, 1993).

En palabras de Skakkebaek, la hipótesis de causalidad de las hormonas medioambientales o disruptores endocrinos es relevante y plausible y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES) o las alteraciones en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenohormonas (Newbold y McLachlan, 1985). El hecho de que estemos asistiendo a un incremento importante de estas patologías en determinadas áreas geográficas y que estos cambios estén ocurriendo en el curso de unas pocas generaciones orienta sobre la búsqueda de causas ambientales actuando (Toppari et al., 1996), quizás, sobre un fondo de predisposición genética que implicaría alguna forma de susceptibilidad individual (Nef et al., 2000).

La experimentación animal ha servido para demostrar que los animales de laboratorio expuestos en útero o perinatalmente a estrógenos exógenos como DES, etinilestradiol o bisfenol-A y anti-andrógenos como flutamida, vinclozolina y DDE (Kelce et al., 1997) desarrollan hipospadias, no descenso testicular y baja cuenta espermática y, en los casos más extremos, condiciones intersexuales, tumores de Leydig y teratomas (Newbold y McLachlan, 1985; Walter et al., 1990). Afortunadamente, con la excepción de los tumores germinales para los cuales no hay modelos de experimentación animal adecuados, el resto de las situaciones clínicas pueden ser producidas en el modelo animal adecuado tras la exposición a los compuestos químicos apropiados. A este respecto, dos hechos son de especial consideración: i) la observación de que de que en los animales de experimentación el impacto de los tratamientos se presenta como un síndrome complejo, presentando mayor o menor severidad en cada uno de sus manifestaciones clínicas; ii) aunque los síntomas clínicos se manifiestan

post-natalmente, la causa de base tiene carácter irreversible y está relacionada con la disgenesia testicular durante el desarrollo fetal.

Desde la perspectiva de la clínica humana, uno de los hechos mas relevantes es que bajo la luz de la hipótesis del síndrome de disgenesia testicular una gran parte de los problemas derivados tienen un origen pre o perinatal. De hecho esta particularidad es evidente y universalmente aceptada para aquellas enfermedades diagnosticadas en el momento del nacimiento (hipospadias y criptorquidia), pero de menor claridad para el caso del cáncer testicular. Gran parte de la actividad científica del grupo danés durante los últimos veinte años, se centró en la propuesta de que el cáncer testicular tiene origen en las anomalías celulares que se producen durante el desarrollo fetal intrauterino ([Giwercman et al., 2006](#)).

Destaca, en la propuesta de un origen prenatal de los cuadros clínicos de referencia, la evidencia existente en lo que respecta a la calidad seminal. Se han sugerido tres razones de diferente significación: i) la relación directa entre calidad seminal y número de células de Sertoli, siendo éste determinado durante la vida fetal y, en cualquier caso, con anterioridad a la pubertad; ii) la ocurrencia de baja cuenta espermática en casos de enfermedades de claro origen intrauterino y perinatal como hipospadias y criptorquidia; iii) la indicación epidemiológica de que la calidad seminal tiene una clara asociación con cohortes de nacimiento.

La hipótesis de una asociación entre las entidades clínicas descritas dentro del síndrome de disgenesia testicular (alteraciones del tracto genitourinario, calidad seminal y cáncer testicular) tiene, en opinión de Skakkebaek y colaboradores, un soporte observacional de indudable interés: i) algunos casos de cáncer testicular ligados a mutaciones génicas se asocian también con criptorquidia e hipospadia; ii) individuos con cáncer testicular presentan con mayor frecuencia criptorquidia ([Moller y Skakkebaek, 1997](#)); iii) los individuos con antecedentes de criptorquidismo son mas frecuentemente infértiles que los individuos sin ese problema de desarrollo; iv) el testículo contralateral al que tiene cáncer clínico, presenta frecuentemente las observaciones histológicas del síndrome de disgenesia testicular; v) el cáncer testicular diagnosticado se acompaña de un recuento espermático mas bajo de lo esperado para la pérdida de la función de un solo testículo ([Berthelsen y Skakkebaek, 1983](#)); vi) alteraciones espermáticas particulares son observadas en algunos individuos que con posterioridad desarrollan cáncer testicular ([Moller y Skakkebaek, 1999](#); [Jacobsen et al., 2000](#)) y, por último, vii) los individuos que desarrollan cáncer testicular presentan

frecuentemente una fertilidad reducida con anterioridad al desarrollo de la enfermedad (Petersen et al., 1998).

1.5.7 Factores medioambientales y calidad seminal

Dentro de los factores medioambientales, deberíamos distinguir tres grupos: factores físicos (temperatura, luz, radiaciones ionizantes, campos electromagnéticos de alta frecuencia), factores sociodemográficos y/o antropométricos (ruralidad, estrés prolongado, ocupación) y factores medioambientales de naturaleza química (contaminantes, pesticidas, componentes de cosméticos, disolventes, plásticos, metales pesados).

Entre las exposiciones ocupacionales reportadas en la literatura que producen alteraciones en los parámetros del semen humano, se encuentran las temperaturas elevadas, radiaciones, el tráfico, agentes químicos utilizados en fumigaciones y otros compuestos químicos orgánicos (Popescu et al., 1975; Colborn et al., 1993; Toppari et al., 1996; Fenster et al., 1997; De Rosa et al., 2003). Dentro de los productos químicos considerados espermatotóxicos, se encuentran algunos plaguicidas (Toppari et al., 1996; Skakebaek et al., 2001) usados tanto con fines agrícolas como de salud pública, para eliminar organismos vivientes que afectan al ser humano. No se ha precisado bien el mecanismo de toxicidad de estos plaguicidas sobre la función reproductiva masculina. Puede ocurrir daño por disturbios en la regulación hormonal, daño directo sobre el espermatozoide, daño sobre el material genético contenido en las células germinales o anomalías en el líquido seminal que podría causar deterioro funcional de los espermatozoides.

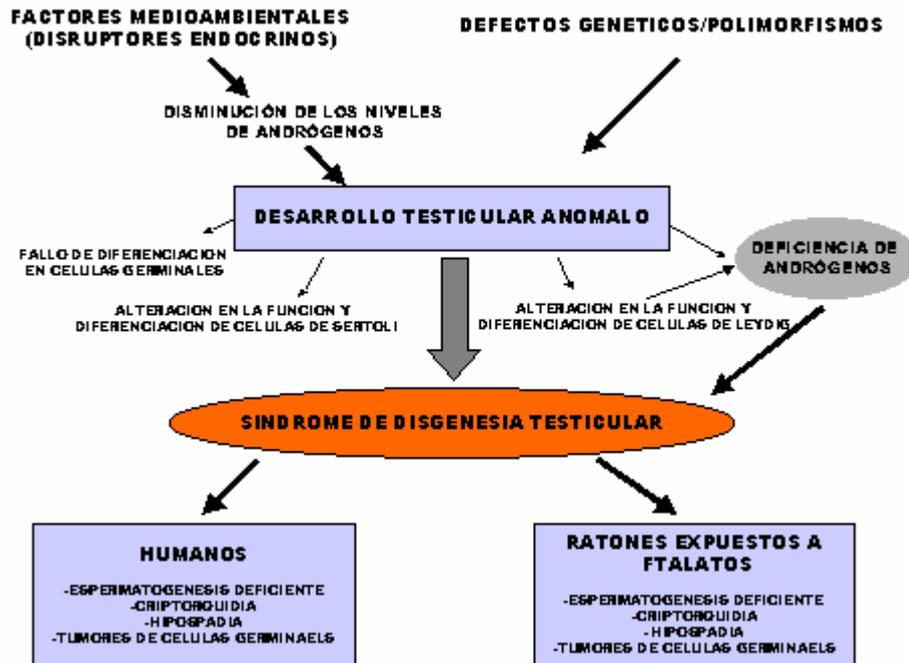
Son muchos los trabajos que relacionan la utilización de compuestos químicos con problemas reproductivos. El uso del nematocida 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP), utilizado en varios cultivos tropicales, ha dejado miles de trabajadores estériles en diferentes lugares del mundo (Slutsky et al., 1999). En los últimos años, se han ido identificando otras moléculas con toxicidad reproductiva, como por ejemplo algunos pesticidas (DDT, clordecone, estileno dibromido, carbamida), solventes químicos (éteres de glicol, 2 bromo propano, etc.) y metales pesados, relacionadas con problemas reproductivos en poblaciones profesionalmente expuestas (Ayotte et al., 2001; Mármol-Maneiro et al., 2003; Kojima et al., 2003; Dalvie et al., 2004; Kamijima et al., 2004; Swan, 2006). Existen, además, otras sustancias como agentes oxidantes y alquilantes, con capacidad de provocar daños en el material genético, principalmente roturas de

cadena simple o doble, que dan lugar a fragmentaciones en los ácidos nucleicos con la consecuente repercusión sobre la viabilidad de las células espermáticas. Este tipo de daños en el ADN parecer ser causado también por la exposición a bajas concentraciones de algunos pesticidas considerados “no persistentes” tales como carbaryl o clorpyrifos (Swan et al., 2003; Meeker et al., 2004).

Por otra parte, varios grupos de investigadores han mostrado un descenso importante de la calidad espermática en adultos de poblaciones específicas, expuestas a sustancias con actividad estrogénica y/o antiestrogénica así como, un incremento en las anomalías de las características del semen (Nelson et al., 1974; Leto et al., 1981; Bostofte et al., 1983; Carlsen et al., 1992; Skakkebaek et al., 1994; Auger et al., 1995). Swan y colaboradores han analizado en orina los niveles de algunos pesticidas usados actualmente en la agricultura. En la población rural estudiada aparecen mas residuos de pesticidas que en la urbana, encontrando una correlación positiva entre una deficiente calidad seminal y altos niveles de algunos de esos compuestos, lo que sugiere que los pesticidas serían un factor a tener en cuenta a la hora de explicar las diferencias en calidad seminal observadas entre áreas rurales y urbanas en EEUU (Swan, 2006).

Recientemente se ha demostrado que algunos compuestos químicos conocidos como ftalatos (ampliamente utilizados en la industria cosmética, perfumes, pintura de uñas, lacas para el pelo, etc) alteran la organogénesis del tracto reproductor masculino cuando son administrados a ratas durante la gestación. Estos compuestos han demostrado tener efectos antiandrogénicos *in vitro*. Uno de los mecanismos de actuación de estas sustancias es reduciendo la síntesis de testosterona fetal con la consecuente disminución de los niveles de andrógenos (Murature et al., 1987; Mylchreest et al., 2000; Fisher et al., 2003 y 2004; Duty et al., 2003; Lottrup et al., 2006). También se ha comprobado de forma indirecta, y tras la administración de ftalatos in útero, diversas anomalías en el testículo como son maduración anormal de las células de Sertoli, pérdida de adhesión entre las células de Sertoli y las células germinales, anomalías en el número y la distribución de la células de Leydig (hiperplasias), alteraciones estructurales de los túbulos seminíferos, causadas por formaciones anormales de la células mioides peritubulares, fallos en la mitosis y en la meiosis, o aparición de células germinales multinucleadas . Este tipo de alteraciones son comunes en biopsias de pacientes con cáncer testicular. Otros antagonistas del receptor de andrógenos como vinclozolina y linuron, son utilizados como fungidas, herbicidas y pesticidas, mostrando una gran persistencia en el entorno (Kelce et al., 1997).

La representación esquemática de las conexiones entre el desarrollo testicular y la manifestación clínica del síndrome de disgenesia testicular y su comparación con las patologías inducidas *in utero* tras la administración de DBP (dibutil ftalato) se indican a continuación (adaptado de Fisher et al., 2004):



La experimentación animal ha servido para demostrar que los animales de laboratorio expuestos en útero o perinatalmente a estrógenos exógenos como DES (dietilestilbestrol), etinilestradiol, bisfenol A o ftalatos y anti-andrógenos como flutamida, vinclozolina, linuron y metabolitos derivados del DDT (*p,p'*-DDE) desarrollan hipospadias, no descenso testicular y baja cuenta espermática y en casos más extremos, condiciones intersexuales, tumores de Leydig y teratomas (Newbold et al., 1985; Walker et al., 1999; Mylchreest et al., 2000; Mahood et al., 2005). Afortunadamente, con la excepción de los tumores germinales para los cuales no hay modelos de experimentación animal adecuados, el resto de las situaciones clínicas pueden ser producidas en el modelo animal adecuado tras la exposición a los compuestos químicos apropiados. A este respecto, dos hechos son de especial consideración: i) la observación de que en los animales de experimentación el impacto de los tratamientos se presenta como un síndrome complejo, presentando mayor o menor severidad en cada una de sus manifestaciones clínicas; ii) aunque los síntomas

clínicos se manifiestan post-natalmente, la causa de base tiene carácter irreversible y está relacionada con la disgenesia testicular durante el desarrollo fetal.

2. Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis y Objetivos

La hipótesis patogénica de Skakkebaek y colaboradores propone que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo, variaciones sutiles de los niveles hormonales pueden dar lugar a lesiones que conducen a disfunción orgánica y, en última instancia, a enfermedad clínica. La hipótesis incluye como principal causa etiológica a los factores ambientales y al estilo de vida, que determinan la exposición a sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal.

La relación existente entre exposición a sustancias químicas con actividad hormonal (disruptores endocrinos-DE) durante el desarrollo uterino y/o a lo largo de la vida, con la aparición de patologías en la vida adulta constituye un problema complejo y de difícil enjuiciamiento. El análisis de dicha relación define el ámbito del conocimiento científico en el que se enmarca la investigación propuesta.

La hipótesis de causalidad de los disruptores endocrinos es relevante y plausible y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con

el fármaco dietilestilbestrol (DES), o las alteraciones observadas en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenobióticos. Desafortunadamente dentro de esta hipótesis general, la asociación entre exposición a compuestos químicos y riesgo de enfermedades hormono-dependientes tales como aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino ha sido escasamente explorada.

El presente estudio se enmarca dentro de los objetivos planteados en proyecto de investigación **“Increasing incidence of human male reproductive health disorders in relation to environmental effects on growth-and sex steroid-induced alterations in programmed development”** dirigido y llevado a cabo por un grupo multidisciplinar de clínicos, investigadores básicos y epidemiólogos de distintas instituciones, financiados por la Unión Europea (QLK4-1999-01422).

La presente Tesis Doctoral trata de contribuir al esclarecimiento del papel de los disruptores endocrinos en la salud reproductiva de una población joven del Sureste español.

El **objetivo general** de este estudio es: Analizar la asociación entre los parámetros seminales y las características antropométricas y sociodemográficas, las condiciones de salud, el estilo de vida, el trabajo, el examen físico andrológico, los niveles hormonales en sangre y la exposición ambiental a disruptores endocrinos, de la población de estudio.

Los **objetivos específicos** son:

1. Determinar la calidad seminal en un grupo de jóvenes voluntarios de la provincia de Almería y obtener una base de datos de referencia sobre parámetros seminales en población joven que sirva de utilidad para estudios futuros en otras áreas de España.
2. Analizar el grado de exposición medioambiental a un grupo seleccionado de disruptores endocrinos en jóvenes, mediante la aplicación de la metodología químico-analítica desarrollada por nuestro grupo de trabajo para la extracción de moléculas organocloradas/disruptores endocrinos en muestras de sangre periférica.
4. Identificar la incidencia de malformaciones y enfermedades del aparato reproductor y describir las características bioquímicas y hormonales en esa misma población.

3. Material y Métodos

3. Material y Métodos

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

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 pesticidas 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.

En octubre de 2002 se inició el reclutamiento de una población de hombres jóvenes de la provincia de Almería, con edades comprendidas entre 18 y 24 años y con una edad media de 20,75 años. El reclutamiento fue llevado a cabo durante un periodo de algo más de un año (octubre 2002 a noviembre 2003) con objeto de incluir todas las

estaciones y evitar el posible sesgo que supone una variación de tipo estacional en los parámetros del semen. 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.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.2.1 Población de referencia

De forma genérica, la población de referencia estaría constituida por varones residentes en la provincia de Almería con edades comprendidas entre los 18 y los 24 años. No obstante, al tratarse de un estudio con voluntarios, y en función de algunas imposiciones del diseño del estudio, deben tomarse con alguna precaución el grado de representación de la población elegida. De hecho, algunos autores han sugerido que los estudios de calidad seminal realizados con voluntarios llevan consigo sesgos de selección que determinan los resultados finales del estudio ([Handelsan et al., 1997](#); [Larsen et al., 1998](#); [Cohn et al., 2002](#)). Entre estos sesgos cabe destacar la sobrerrepresentación de varones preocupados por su fertilidad o bien de varones que por problemas genitourinarios previos tienen sospechas sobre la misma. En otras ocasiones los sesgos de selección vienen determinados por la compensación monetaria que reciben los voluntarios en concepto de gastos de desplazamiento y/o pérdida de horas de trabajo. La clase social, el nivel de estudios, la solicitud de permisos de trabajo para acudir al centro de reclutamiento o la historia médica del individuo serían los otros factores de podrían determinar la selección del voluntariado. Todos estos factores fueron considerados en el momento de definición de los criterios de inclusión y exclusión

A) 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 21 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 y 7 días. Todos los participantes debían desconocer su capacidad reproductiva.

B) Criterios de exclusión

Rehusar participar en el estudio y/o no cumplir alguno de los criterios de inclusión.

3.2.2 Participación y tamaño muestral

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.

3.3 CAPTACIÓN DE VOLUNTARIOS

Para conseguir una muestra representativa de jóvenes de la provincia Almeriense dispuestos a participar de forma voluntaria y sin ánimo de lucro en este estudio, se siguió un protocolo de captación basado en:

1. Campañas divulgativas en prensa y medios de comunicación local.
2. Elaboración y difusión de trípticos informativos (anexo), indicando los objetivos científicos y no comerciales del proyecto y sensibilizando a la población de la importancia del estudio y, haciendo hincapié en la garantía de anonimato de los voluntarios dispuestos a participar.
3. Instalación de un stand informativo en las “Jornadas de puertas abiertas” que organiza el Vicerrectorado de estudiantes de la Universidad de Almería al inicio del año académico. Estas jornadas están destinadas a toda la población juvenil tanto universitaria como no universitaria y tienen una duración de tres días. En este tipo de evento, la afluencia de jóvenes es masiva y supone un mecanismo muy eficaz para ofrecer información y solicitar la colaboración de los jóvenes. En este stand se entregó a los jóvenes el tríptico informativo del estudio. En el stand, los jóvenes podían inscribirse directamente en el estudio, firmar el consentimiento informado de participación en el estudio, recoger el cuestionario, y obtener una cita para la realización de las pruebas. Las citas se organizaron en grupos reducidos (5-15 sujetos). Los participantes podían recibir un informe confidencial del seminograma y del estudio andrológico, si así lo deseaban, con la posibilidad de que un médico especialista les contestara y aclarase todas las posibles dudas que tuvieran.
4. Compensación económica. A cada participante se le asignó una dieta de 20 € en concepto de gastos de transporte al lugar donde serían realizadas todas las pruebas, con la aclaración previa de que la participación en el estudio no supondría gasto alguno para los voluntarios.

En todas las fases del proceso de captación de voluntarios se facilitó una dirección de correo electrónico y un número de teléfono donde los interesados podían consultar acerca del estudio y obtener las pertinentes aclaraciones a sus dudas. También podían inscribirse para participar y en caso de imprevistos atrasar, adelantar o anular la cita para la realización de las pruebas. Este teléfono fue atendido de lunes a viernes en horario de mañanas durante todo el periodo de reclutamiento.

Unos días antes de la cita previamente concertada para la realización de las pruebas, se confirmaba la asistencia de los voluntarios por teléfono, recordando el protocolo a seguir para la obtención de la muestra de semen.

3.4 CENTRO DE RECLUTAMIENTO

Con el fin de facilitar a los voluntarios el proceso de toma de datos y muestras, se habilitó un centro de reclutamiento en la Universidad de Almería dentro del recinto del Vicerrectorado de Estudiantes. En este lugar se disponía de cuatro zonas separadas: una para la realización del examen físico-andrológico, otra para la complementación y repaso de los cuestionarios, otra para la recogida de las muestras de semen y otra en la que se instaló un laboratorio para la extracción de sangre y para el estudio *in situ* de las muestras de semen.

3.5 VARIABLES DEL ESTUDIO

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 pesticidas 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.

3.5.1 Encuesta epidemiológica

La recogida de datos generales y posibles factores confusores, modificadores de efecto y otras variables de exposición de cada participante se realizó mediante un cuestionario diseñado *ad hoc* (anexo) 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 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 en su presencia.

La entrevista personal realizada mediante la encuesta estaba estructurada en varias secciones:

Hoja de no respuesta

Recoge las variables de identificación y municipio de residencia del individuo, aún en el caso de que el sujeto decidiera no participar.

Sección: Preguntas generales

Recoge variables habituales del sujeto referentes a su salud general, a su infancia y al periodo en que su madre estaba embarazada de él, fecha y lugar de nacimiento. También se trató de recopilar información sobre posibles exposiciones ocurridas durante la gestación del individuo, con especial énfasis a contaminantes ambientales. Esta sección debía rellenarse con la colaboración de los padres 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.

Sección: Condiciones de salud

Se recopilaron también datos sobre estado de salud en relación al aparato reproductor. Así se realizaron algunas preguntas para conocer posibles tratamientos medico-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.

Sección: Estilo de vida y Condiciones de trabajo

En esta sección se recoge 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.

Sección: Historial reproductivo

Aporta datos sobre si el participante ha tenido hijos o es responsable de algún embarazo, así como si tuvo o no dificultades para lograrlo.

3.5.2 Exploración andrológica

Todos los sujetos reclutados fueron sometidos a una exploración física realizada por un especialista. La exploración se centró en la zona genitourinaria, recogiendo información sobre vello púbico estimado de acuerdo al índice de Tanner, desarrollo peneano y testicular (disposición, tamaño y consistencia de los testículos). El volumen testicular fue calculado con la ayuda de un orquidómetro de Prader de madera (Pharmacia & Upjohn, Denmark). En esta exploración también se investigó la anatomía del área genital y la presencia de alteraciones tales como varicocele en sus distintos grados, criptorquidia, hipospadia, ausencia de conductos deferentes, presencia de quistes a nivel de epidídimo, hidrocele, tumoración etc. También se consultó sobre el historial médico-quirúrgico.

Al mismo tiempo, se recogió información sobre la longitud de los dedos de la mano derecha para el cálculo del cociente 2:4 (índice: anular), mediante el dibujo del contorno de la mano sobre papel milimetrado.

Todos los datos observados fueron anotados en un formulario común a todos los grupos de investigación participantes (anexo). Los datos recogidos en esta exploración fueron:

- 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): en caso de encontrar alguna anomalía se anota en observaciones.
- Disposición de los testículos derecho e izquierdo: alto en el escroto, bajo en el escroto, en el canal inguinal, y no palpable.
- Tamaño de los testículos derecho e izquierdo. (Medido 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): en caso de encontrar alguna anomalía se anota en observaciones.
- 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, y visible.
- Presencia o ausencia de hidrocele en testículo derecho e izquierdo.

La medida de altura, peso, disposición de los testículos, presencia y ausencia de varicocele e hidrocele se realizaron con el individuo en pie, en un lugar adecuado a tal efecto y a una temperatura ambiente de 20-25°C.

El material empleado en el proceso de exploración fue: i) guantes de látex, ii) calibrador tipo “pie de rey”, iii) orquidómetro de Prader de madera (Pharmacia & Upjohn, Denmark®), iv) papel milimetrado, y v) regla milimetrada.

3.5.3 Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante venopunción cubital por personal adiestrado para la extracción de muestras biológicas. El volumen de sangre extraída fue de 15-20 ml lo que aseguraba un volumen de suero suficiente para la realización de toda la analítica necesaria en este estudio.

Tras la recolección, las muestras de sangre fueron centrifugadas para la obtención del suero que posteriormente fue transvasado a viales de congelación codificados y mantenidos a -70°C hasta su análisis. El volumen aproximado de suero obtenido tras la centrifugación fue de 8 ml. Las muestras de suero se separaron en tres viales, uno de ellos fue destinado para el análisis de pesticidas realizado en el Laboratorio de Investigaciones Médicas de la Universidad de Granada; un segundo vial fue enviado al Hospital Universitario de Copenhague (Rigshospitalet), en Dinamarca, para el estudio hormonal, y un tercer vial se destinó al estudio de los lípidos totales en suero realizado en el Hospital de Poniente de Almería.

El material empleado en las extracciones sangre fue: i) jeringas estériles de 20 ml, ii) gasa y agujas estériles para extracción de sangre, iii) tubos para extracción y centrifugado de las muestras de sangre, iv) centrífuga (Nahita®), v) tubos para la congelación de las alícuotas de suero. Estos tubos fueron testados previamente para cuantificar su contenido en ftalatos y enviados desde Copenhague a todos los grupos participantes.

3.5.4 Análisis de las muestras de semen

3.5.4.1 Recogida, entrega y preparación de las muestras para su análisis

Cada individuo participante proporcionó una muestra de semen obtenida mediante masturbación, tras un periodo de abstinencia recomendado y comprendido entre 48 y 168 horas, y recogida en un frasco estéril de boca ancha previamente testado para asegurar la no toxicidad para los espermatozoides. La forma de recogida de la muestra fue explicada a todos los participantes con antelación, y se les entregó el frasco

de recogida. Todos los frascos fueron previamente identificados y pesados para el cálculo del volumen por pesada.

En el momento de entrega de la muestra se anotaron aquellos datos de interés para el análisis: dificultades a 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 que tenían su lugar de residencia cercano al laboratorio les fue posible obtener la muestra de semen en casa, siempre y cuando la entrega en el laboratorio tuviese lugar en un plazo no superior a media hora y durante este tiempo la muestra no sufriera cambios de temperatura ni estuviera expuesta a la luz. Para aquellos participantes que no pudieran cumplir los requisitos anteriores, se dispuso de un lugar reservado junto al laboratorio donde podían realizar la recogida de la muestra sin perturbaciones.

Todo el proceso de realización del seminograma se hizo siguiendo de forma estricta las indicaciones de la OMS en la última edición del manual para el examen de semen (OMS, 1999). Todas las muestras de semen fueron analizadas por un único observador especializado en el análisis de semen con el fin de evitar los posibles sesgos que se derivan de la variabilidad entre observadores. A su vez, este observador fue sometido a un control de calidad riguroso coordinado por el grupo del “Rigshospitalet” en Dinamarca.

Una vez entregadas las muestras, estas eran depositadas sobre una bandeja térmica y atemperada a 37 °C durante un periodo de 15-30 minutos hasta completar el proceso de licuación. Durante este tiempo, las muestras eran homogenizadas mediante 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.

3.5.4.2 Parámetros seminales analizados

Los parámetros seminales estudiados fueron los siguientes:

Licuación:

Las muestras se dejaron licuar durante un periodo comprendido entre los 15 y 30 minutos después de la eyaculación y antes de realizar el análisis. En aquellos casos en los que las muestras no completaban la licuación en ese periodo de tiempo, se aguardó hasta un máximo de 60 minutos para realizar el proceso analítico. Los resultados de la licuefacción se codificaron como “completa” o “incompleta”.

Aspecto:

El aspecto de la muestra fue recogido durante el periodo de licuefacción y antes de transcurridos 60 minutos de la eyaculación. En aquellos casos en los que las muestras presentaban un color fuera del rango del gris opalescente, se anotó dentro del apartado de observaciones de la hoja de datos.

Volumen:

El volumen del 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 y con un error de pesada de 0,01 g (lo que equivale a 10µl).

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, el valor de la viscosidad fue de cero. Si formaban un filamento entre 2 y 5 cm, se les atribuyó un valor de viscosidad de 1. Un valor de 2 en casos en los que el filamento medía entre cinco y diez cm, y un valor de 3 para aquellas muestras de alta viscosidad que formaban filamentos superiores a diez cm.

pH:

El 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 (MERK).

Concentración espermática:

Para la medida de concentración se realizó una estimación preliminar colocando una gota de 10µl sobre un porta, bajo un cubre de 22x22 mm, y se observó bajo contraste de fases a 400x. Según el número de espermatozoides encontrados por campo a ese aumento, se realizó una dilución con medio fijador siguiendo el protocolo aconsejado en el manual para el examen de semen de la OMS reflejado en la siguiente tabla:

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 utilizando como 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). Una vez fijadas y homogenizadas las dos diluciones, se procedió a su recuento, empleando un hemocitómetro mejorado de Neubauer (Neubauer improved). Los recuentos se realizaron por duplicado contando un mínimo de 200 espermatozoides en cada uno con el fin de disminuir al máximo el error cometido. Para verificar los recuentos se calculó el intervalo de confianza de aproximadamente 95% para las diferencias entre los dos recuentos empleando la gráfica que incluye el manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano (OMS, 1999) en el apéndice XXII. Diferencias mayores a las esperadas en un 95% de las muestras hubieran sido indicativas de errores sistemáticos en el proceso atribuibles a error en la dilución, error en el recuento o bien en la homogenización incorrecta de la muestra de semen.

Una vez realizados correctamente ambos recuentos, se calcula la media entre ambos y el resultado se expresa en millones de espermatozoides por mililitro de muestra.

Número total de espermatozoides:

El número total de espermatozoides en el eyaculado se calcula multiplicando el volumen de la muestra por la concentración obtenida y se expresa en millones de espermatozoides en eyaculado.

Elementos celulares diferentes de los espermatozoides:

El cálculo del número de células redondas por mililitro de eyaculado se realizó al mismo tiempo que el recuento espermático mediante el hemocitómetro mejorado de Neubauer.

Movilidad espermática:

Para valorar la movilidad espermática se colocó una gota de 10 μL de semen sobre un portaobjetos atemperado a 37 °C y sobre ella se depositó cuidadosamente un cubreobjetos de 22 x 22 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), diferenciando 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 $5\text{-}25\mu\text{m}/\text{seg.}$),
- espermatozoides tipo “**c**” (movimiento no progresivo $< 5\mu\text{m}/\text{seg.}$), y
- espermatozoides tipo “**d**” (inmóviles).

En el proceso de recuento de formas móviles se evitó contar los espermatozoides en los campos cercanos a los bordes del cubreobjetos así como aquellos 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 a las esperadas (>5%) se asume que hay un error de recuento o una distribución no uniforme de los espermatozoides en el portaobjetos, por lo que en estos casos se repite 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 ser poder usarlas posteriormente para otros estudios comparativos.

Morfología espermática:

Se realizaron cuatro frotis sobre portas identificados con el código de la muestra, las extensiones se realizaron a partir de 4µl de semen cada una y se dejaron secar durante una noche, al día siguiente fueron fijadas en etanol 96% durante 60 minutos, y posteriormente dos extensiones de cada muestra de semen fueron enviadas a Finlandia para ser estudiadas por un único observador común para todos los grupos de investigación y, de esta forma, evitar la variabilidad entre observadores, que en los estudios sobre morfología espermática suele ser bastante significativa; las otras dos extensiones fueron guardadas para posteriores estudios. No obstante, debido a cambios inesperados en la organización, las muestras enviadas a Finlandia no fueron estudiadas, por lo que se decidió hacer el estudio de las extensiones que previamente nos habíamos reservado (dos por muestra de semen), pese a todo, de estos duplicados sólo pudimos recuperar íntegras 230 extensiones correspondientes a 115 individuos.

Para el estudio de la morfología espermática se aplicó el protocolo de la OMS (OMS, 1999) siguiendo criterios estrictos de Kruger, estos criterios de clasificación requieren que todas aquellas formas con defectos mínimos o “borderline” sean consideradas como anormales.

Se estudiaron las siguientes regiones del espermatozoide y se observó la presencia de alguna o más anomalías en estas regiones (Franken y Kruger, 2004). En el caso de observar alguna anomalía se consideró al espermatozoide como anormal y se anotó la región en la que se halló la alteración, ya fuesen una o más:

- Cabeza: 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. Como anomalías de la cabeza entendemos cualquier factor que haga que esta no tenga una forma normal; podemos encontrar que puede ser grande, pequeña, redonda, elongada, 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: La pieza intermedia debe ser delgada ($<1 \mu\text{m}$ de grosor), de una longitud aproximada entre 1 y $1/2$ 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. Como anomalías se pueden encontrar: cuello doblado, (cuello y cabeza forman un ángulo $>90^\circ$ 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.

- Flagelo: El flagelo debe estar relativamente derecho, ser uniforme y más fino que la pieza intermedia, desenrollado y aproximadamente de 45 μm de longitud. Como defectos en el flagelo encontramos flagelos cortos, múltiples, en horquilla, rotos, doblados ($>90^\circ$), de espesor irregular, enrollados y toda combinación de estos.

- Restos citoplasmáticos: 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 anomalía.

La tinción de las muestras se realizó con el método del panóptico rápido (eosina/tiazina). En esta técnica usamos 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 tampón preservado durante 5 segundos y seguidamente tras

escurrir el exceso de colorante se sumerge la muestra en una segunda solución de tiazina en tampón 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 la variabilidad interobservador.

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 la 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 (n° 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%. En base a esto se establece un valor de referencia del 14% de formas normales por otro lado, un individuo con un porcentaje de formas normales inferior al 5% probablemente vea mermadas 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 cálculo la duración de la abstinencia en horas.

Intervalo de tiempo entre la eyaculación y comienzo del análisis:

En el momento de la entrega de la muestra de semen se anotaba 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.

3.5.4.3 Material empleado

El material empleado para la realización de los seminogramas fue: 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 micropipeta; 11) microscopio (Olympus® BX-50) con contraste de fases; 12) pletina (Tokay) y bandeja térmica (Labotec ®); 13) balanza de precisión (AND ® EK200G).

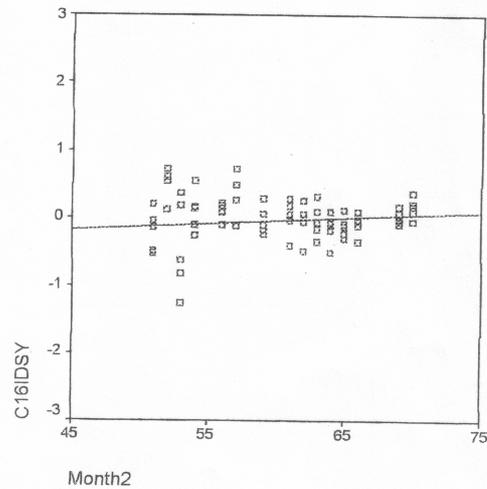
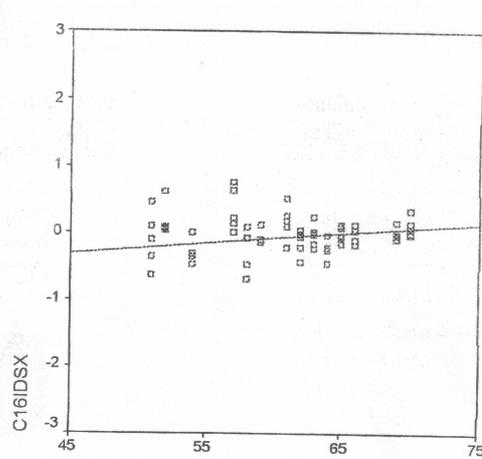
3.5.4.4 Control de calidad

Nuestro grupo de trabajo, al igual que los otros grupos participantes en el proyecto europeo “Environmental Reproductive Health”, se sometió a un control de calidad externo (concretamente 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 todo el tiempo que duró el periodo de reclutamiento y análisis de las muestras de semen, se recibieron por correo 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 mismo 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 (solo se deben de 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%, es decir un 4% menor que el laboratorio de referencia, con un intervalo de referencia de 95% de (87%-106%). En las graficas siguientes se puede apreciar un ligero aumento a lo largo del tiempo que estadísticamente no fue significativo ($p=0,2$). Este incremento parece ser consecuencia, probablemente, de las variaciones observadas en los primeros meses de realización del control de calidad o porque algunos de los análisis se realizaron mas tarde del periodo establecido.

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



3.5.4.5 Entrega de informes

Transcurrida una semana tras la realización del seminograma y la exploración física, se volvía a citar a aquellos voluntarios que desearon un informe de los resultados (52 % de los participantes). En ese informe se describían los parámetros indicadores de la calidad seminal así como las observaciones, de interés para el joven, hechas por el andrólogo. Los informes fueron entregados personal y confidencialmente a los interesados y explicados con detalle para evitar confusión. Aquellos jóvenes que presentaban parámetros seminales por debajo de los valores de referencia establecidos por la OMS, se les recomendó la realización de un segundo seminograma, aunque en estos casos la participación fue baja (60%). A los jóvenes que mostraron alguna patología (Azoospermia, oligospermia severa, presencia de quistes) se les proporcionó una cita para la consulta del especialista.

3.5.6 Análisis hormonal

Las muestras de sangre, obtenidas mediante venopunción cubital, se centrifugaron para la obtención del suero que posteriormente fue transvasado 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 ensayo de inmunofluorescencia (Delfia, Wallac, Turku, Finlandia). Los niveles de estradiol fueron obtenidos mediante radioinmunoensayo (RIA) (Pantex, Santa Mónica, CA) y los de 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 Testosterona y SHBG fueron del 8 y el 5%. Finalmente, para estradiol e inhibina B entre el 7.5-13% y entre 15-18%, respectivamente.

3.5.7 Análisis del residuo de plaguicidas en suero humano

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).

Como método de extracción se utilizó el siguiente:

1. Se tomaron 4 ml de la muestra de suero humano y se depositaron 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 le 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.

3.5.7.1 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 solo con hexano se representan a continuación.

Plaguicidas	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

Porcentajes de recuperación para isómeros del endosulfán

3.5.7.2 Análisis cuantitativo/cualitativo mediante cromatografía de Gases con detector de captura de electrones (GC/DCE)

El método utilizado para determinar el residuo de plaguicidas organoclorados fue la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (DCE). Ello se debe a que las moléculas de los mismos 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 de captura de electrones (^{63}Ni) a una T^a de 300°C ; sistema Millennium Chromatography Manager como software; inyector a una T^a de 250°C ; Nitrógeno como gas portador a un flujo de 40 ml/min ; volumen de inyección de $1\ \mu\text{l}$; programa de T^a : 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).

Con objeto de que el análisis cromatográfico fuese cuantitativo 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 al 99%. La reproducibilidad para el patrón interno *p,p'*-diclorobenzofenona (DCBF) fue excelente y la curva de calibrado ($y = 3 \cdot 10^6 x + 3 \cdot 10^6$) tuvo un ajuste $R^2 = 0,992$. La disolución patrón se preparó a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ 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 ($\mu\text{g/ml}$) se determinaron para cada uno de los compuestos a estudiar de acuerdo con los métodos propuestos por nuestro grupo de investigación. Por último, para la realización de 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 18 compuestos químicos 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 objeto 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 medioambientales, 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 el nivel de concentración menor de un elemento que se puede determinar analíticamente. El límite de cuantificación debe establecerse según un criterio estricto y sitúa la región de cuantificación claramente por encima del límite de detección.

Tiempos de retención (TR) y desviación estándar (DE) de los plaguicidas

Plaguicida	TR ± DE (min)	Límite detección (ng/ml)	Límite cuantificación (ng/ml)
HCB	7,7014 ± 0,0198	0,5	1,0
Lindano	8,2317 ± 0,0182	0,5	1,0
Vinclozolina	9,1433 ± 0,0218	0,5	1,0
Aldrín	9,9643 ± 0,0223	0,5	1,0
Dieldrín	11,6035 ± 0,0261	0,5	1,0
Endrín	12,0240 ± 0,0269	0,5	1,0
Metoxicloro	14,3061 ± 0,0315	1,5	3,0
Mirex	16,3728 ± 0,0355	0,5	1,0
<i>p,p'</i> -DDE	11,3821 ± 0,0257	0,5	1,0
<i>o,p'</i> -DDD	11,5089 ± 0,0263	0,5	1,0
<i>o,p'</i> -DDT	12,2374 ± 0,0276	0,5	1,0
<i>p,p'</i> -DDT	12,9648 ± 0,0288	0,5	1,0
Endosulfán éter	9,0105 ± 0,0202	0,05	0,1
Endosulfán lactona	10,4946 ± 0,0232	0,05	0,1
Endosulfán diol	10,8327 ± 0,0239	0,25	0,5
Endosulfán I	11,1336 ± 0,0252	0,25	0,5
Endosulfán II	12,2072 ± 0,0283	1,0	2,0
Endosulfán sulfato	12,9860 ± 0,0355	0,25	0,5

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

Todas las determinaciones cromatográficas basadas en la técnica de cromatografía de gases con detector de captura de electrones fueron confirmadas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Las condiciones de trabajo del CG 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: 1ml/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.

Tiempos de Retención:

A continuación se presentan los tiempos de retención de cada uno de los pesticidas confirmados por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
HCB	10,892
Lindano	11,741
Metoxicloro	31,482
Mirex	34,633
Aldrín	15,999
Endrín	23,102
Dieldrín	21,755
<i>p,p'</i> -DDE	21,504
<i>o,p'</i> -DDD	21,925
<i>o,p'</i> -DDT	24,433
<i>p,p'</i> -DDT	26,996
Endosulfán I	20,084
Endosulfán II	23,880

3.5.8 Determinación de lípidos totales en muestras de suero

Con el fin de expresar los niveles de residuo en función del contenido lipídico de las muestras, alícuotas de suero fueron analizadas en su contenido de colesterol y triglicéridos, 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 múltiparamétrico 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, $\text{VLDL} = \text{Triglicéridos}/5,$

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

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 permite 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 EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó en dos fases:

1.- Un análisis univariado detallado según la forma continua o discreta de cada variable. Para las variables continuas se analizó su distribución y las medidas de tendencia central. La mayoría de las variables no seguía una distribución normal, por lo que se buscaron las transformaciones matemáticas que la logaran. En el caso concreto de los residuos de plaguicidas organoclorados se utilizó la transformación a su logaritmo natural ya que, pese a que con ninguna transformación matemática conseguimos obtener una distribución normal, con esta transformación se conseguía reducir la dispersión de los datos. En cuanto a las variables discretas de dos o más categorías (dicotómicas o policotómicas) sólo se describió su frecuencia y porcentaje para cada una de ellas. Cabe hacer notar que todas las categorías se construyeron acorde a los criterios de referencia de la OMS o a referencias en la literatura asociadas con características de subfertilidad o subfecundidad referidas en la literatura.

2.- Un análisis bivalente entre las variables indicadoras de la calidad seminal: número total de espermatozoides y el número total de espermatozoides móviles y su asociación con las variables de exposición, con potenciales confusores, modificadores de efecto y otras covariables obtenidas a partir del cuestionario, el examen físico, el seminograma y el análisis bioquímico, hormonal y de residuos de organoclorados.

Ni el número total de espermatozoides ni el de espermatozoides móviles presentaron una distribución normal, por lo que para el análisis bivalente se utilizaron

en todos los casos test no paramétricos, de acuerdo a las características de las variables como por ejemplo la correlación de Spearman, la prueba de Kruskal–Wallis, o para la comparación de dos a dos con la correlación U-Mann Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron con los programas STATA 9.2 y SPSS 14.

A continuación se describen las variables que consideramos susceptibles de guardar relación con la calidad espermática obtenidas a partir de la encuesta epidemiológica y del examen físico; También se recogen las variables referentes al análisis químico y hormonal.

En el caso de las variables categóricas se obtuvo la frecuencia y la proporción de cada categoría con respecto al total de los sujetos participantes. Para las variables cuantitativas se consignó: la media, mediana, desviación estándar aritmética y valores mínimo y máximo.

3.6.1 Variables seleccionadas de la encuesta epidemiológica para el análisis estadístico:

- *Salud general*: variable cualitativa policotómica, categorizada como: muy buena, buena y mala.
- *Enfermedades crónicas o por un largo periodo de tiempo*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO
- *Consumo de medicamentos en los últimos tres meses*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO
- *Edad*: variable cuantitativa continua calculada como años cumplidos hasta la fecha de la toma de muestras.
- *Residencia materna mientras estaba embarazada del sujeto*: variable cualitativa dicotómica para la que se establecieron dos categorías: rural (poblaciones con un número inferior a 10.000 habitantes) y urbana (poblaciones con mas de 10.000 habitantes).
- *Residencia actual*: con idéntica categorización que la anterior
- *Lugar de nacimiento de los padres*: variable cualitativa dicotómica, para la que se establecieron dos categorías: rural (poblaciones con un número inferior a 100.000 habitantes) y urbana (poblaciones con más de 100.000 habitantes).
- *Madre fumadora durante el embarazo*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Trabajo de la madre durante el embarazo*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.

- *Ocupación de la madre durante el embarazo*: variable cualitativa, policotómica, caracterizada como: ninguno, intelectual, manual y agrícola.
- *Duración de su gestación*: variable cualitativa policotómica con las categorías: pretérmino (< 37 semanas), a término (37 semanas) y postérmino (>37 semanas).
- *Nivel de estudios*: variable categórica nominal policotómica, categorizada en estudios primarios, secundarios y universitarios.
- *Actividad laboral actual*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Horario de trabajo*: variable cualitativa dicotómica tipo Diurno/Nocturno
- *Hábito tabáquico*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Número de cigarrillos al día*: variable cuantitativa, calculada como el número de cigarrillos fumados al día por los participantes que tenían el hábito.
- *Años de fumador*: variable cuantitativa, calculada como el número de años que el participante ha tenido el hábito de fumar.
- *Consumo de alcohol*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Número de bebidas alcohólicas en la última semana*: variable cuantitativa, calculada como la suma del número de cervezas, vasos de vino y licores (cubatas) consumidos durante una semana, por los participantes que tenían el hábito.
- *Consumo de Cannabis*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.

3.6.2 Variables seleccionadas del análisis químico para el análisis estadístico

- *Concentración de cada uno de los 18 pesticidas analizados en suero*: variable cuantitativa continua expresada en ng/ml de suero (ng/ml) y en ng/gramo de lípido, para esta última se calculó la cantidad de lípidos totales para cada muestra de suero (mg/dl de suero), según lo descrito en los apartados anteriores. Los pesticidas analizados fueron: *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, metoxicloro, mirex, lindano, hexaclorobenceno (HCB), vinclozolina, aldrín, endrín, dieldrín, endosulfán-I, endosulfán-II, endosulfán-éter, endosulfán-lactona, endosulfán-diol y endosulfán-sulfato. En el caso de DDT se calculó la suma de las concentraciones del compuesto y sus metabolitos halladas en la muestra y referidas a *p,p'*-DDE, expresándose como ΣDDTs en los resultados. De igual manera se procedió con endosulfán y metabolitos, expresando la suma como Σ Endosulfán.

Cada una de las variables de concentración de pesticidas se expresó mediante el cálculo de la media, mediana, desviación estándar aritmética y los valores de mínimos y máximos. Los cálculos de los valores medios de los pesticidas se hicieron: i) considerando solo aquellos valores situados por encima del límite de cuantificación y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido y ii) considerando la totalidad de las muestras y asignando el valor de cero a las determinaciones inferiores al límite de cuantificación y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

3.6.3 Variables seleccionadas de la exploración física para el análisis estadístico

- *Talla*: variable cuantitativa continua calculada en cm. de estatura.
- *Peso*: variable cuantitativa continua calculada en Kg. de peso.
- *Índice de masa corporal (IMC)*: variable cuantitativa continua, se utilizó el índice de Quetelet (IQ)= (Peso en kg/altura en metros al cuadrado, kg/m²).
- *Presencia o ausencia de cicatrices en la zona inguinal y genital*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Desarrollo del vello púbico, “Estadios de Tanner”*: variable categórica numérica policotómica, categorizada en cinco posibles estadios (1, 2, 3, 4 y 5).
- *Tamaño del Pene*: variable cualitativa dicotómica tipo NORMAL/ANORMAL.
- *Disposición del testículo derecho*: variable categórica nominal policotómica, categorizada en normal, alto en el escroto, bajo en el escroto y localizado en el canal inguinal.
- *Disposición del testículo izquierdo*: variable categórica nominal policotómica, categorizada en normal, alto en el escroto, bajo en el escroto y localizado en el canal inguinal.
- *Consistencia de los testículos*: variable cualitativa dicotómica tipo Ambos normales/alguno blando o duro.
- *Tamaño del testículo derecho*: variable categórica numérica policotómica, categorizada en siete posibles categorías (sin testículo, tamaño 8, 10, 12, 15, 20 y 25).
- *Tamaño del testículo izquierdo*: variable categórica numérica policotómica, categorizada en siete posibles categorías (sin testículo, tamaño 8, 10, 12, 15, 20 y 25).
- *Presencia de tumores*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Epidídimo*: variable cualitativa dicotómica tipo normal/anormal en alguno o en ambos.

- *Vasos deferentes*: variable cualitativa dicotómica tipo presente/ausente en alguno o en ambos.
- *Varicocele*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.
- *Hidrocele*: variable cualitativa dicotómica tipo SI/NO.

3.6.4 Variables seleccionadas del análisis de semen para el análisis estadístico

- *Estación del año*: variable categórica nominal policotómica, categorizada en Primavera (Marzo-Mayo), Verano (junio-Agosto), Otoño (septiembre-Noviembre) e Invierno (Diciembre-Febrero).
- *Tiempo de abstinencia*: variable cuantitativa continua calculada en horas. Esta variable se reclasificó en dicotómica según el tiempo de abstinencia fuese menor a 48 horas o mayor o igual a ese periodo de tiempo.
- *pH*: variable cuantitativa continua. Esta variable se reclasificó en dicotómica según el pH fuese menor a 7,2 o mayor o igual a ese valor.
- *Licucción*: variable cualitativa dicotómica tipo completa/incompleta
- *Viscosidad*: variable categórica numérica policotómica, categorizada en 4 posibles categorías, normal, nivel 1, nivel 2 y nivel 3.
- *Volumen*: variable cuantitativa continua calculada en ml. Esta variable se reclasificó en dicotómica según el volumen fuese menor a 2 ml o mayor o igual a 2 ml.
- *Células redondas*: variable cuantitativa continua calculada en millones/ml.
- *Aglomeraciones*: variable categórica numérica policotómica, categorizada en 4 posibles categorías, 0, 1, 2 y 3.
- *Concentración espermática*: variable cuantitativa continua calculada en millones/ml. Esta variable se reclasificó en dicotómica según la concentración espermática fuese menor a 20 millones/ml o mayor o igual a ese valor.
- *Número total de espermatozoides*: variable cuantitativa continua calculada en millones. Esta variable se reclasificó en dicotómica según el número total de espermatozoides fuese menor a 40 millones o mayor o igual a dicho valor.
- *Movilidad tipo a*: variable cuantitativa continua expresada en %. Esta variable se reclasificó en dicotómica según fuese menor a 25 % o mayor o igual a ese valor.
- *Movilidad tipo b*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Movilidad progresiva (a+b)*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Movilidad tipo c*: variable cuantitativa continua expresada en %.

- *Movilidad total (a+b+c)*: variable cuantitativa continua expresada en %. Esta variable se reclasificó en dicotómica según la movilidad total fuese menor del 50% o mayor o igual a ese valor.
- *Movilidad tipo d*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Número total de espermatozoides móviles*: variable cuantitativa continua calculada en millones.
- *Formas normales*: variable cuantitativa continua expresada en %. Esta variable se reclasificó en dicotómica según fuese menor o igual del 4% ó mayor a ese valor.
- *Formas anormales*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Cabezas Anormales*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Piezas intermedias anormales*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Flagelos anormales*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Restos citoplasmáticos*: variable cuantitativa continua expresada en %.
- *Índice de teratozoospermia*: variable cuantitativa continua.

3.6.5 Variables de las determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre

Todas las variables de las determinaciones bioquímicas y hormonales se consideraron como variables cuantitativas continuas expresadas en mg/dl para colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos, en nmol/l para testosterona y globulina transportadora de hormonas sexuales (ShBG), y en UI/l para la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH).

3.7 IDENTIFICACIÓN Y CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

A cada participante en el estudio se le asignó un número codificado, para ello se estableció un sistema de codificación común para todos los grupos europeos participantes en el proyecto “Environmental Reproductive Health”, antes referido. Este código consistía en un código alfanumérico de once dígitos. Los dos primeros dígitos se corresponden con el grupo de estudio, en este caso se asignan las letras MI para el grupo de varones jóvenes de fertilidad no probada. Los dos segundos dígitos corresponden el grupo-País participante, en este caso el grupo de España era el 06 los cuatro siguientes dígitos son los correspondientes al año y mes de la toma de la muestra, los tres últimos dígitos son los asignados a cada individuo y son asignados de forma consecutiva

durante la fase de captación (por ejemplo, la muestra MI060210027 se corresponde a un individuo joven, de fertilidad no probada residente en el Sur de España, concretamente en la provincia de Almería, al que se le realizaron las pruebas en Octubre del 2002, este individuo fue el participante nº 27 en el estudio de población joven en España.). Todos los datos relacionados con este individuo se identifican únicamente con este código, de este modo garantizamos el anonimato de todos los participantes. Con el código de cada individuo encontramos por lo tanto una encuesta epidemiológica, un seminograma, una hoja de exploración física, una hoja con las medidas de los dedos de la mano, cuatro extensiones fijadas para el estudio de la morfología y tres viales de suero congelado. Las hojas con el consentimiento informado, donde figuran los datos personales de cada participante y el código asignado han sido custodiadas por los responsables de cada grupo participante.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población de estudio fue reclutada en la provincia de Almería entre los jóvenes que accedieron a participar durante la etapa de captación de voluntarios. El reclutamiento se efectuó en un período de un año natural, entre octubre del 2002 y noviembre del 2003, con objeto de incluir todas las estaciones del año. Entre los criterios de inclusión, se consideraron la edad, comprendida entre los 18 y 23 años, y la residencia en la provincia de Almería.

Todos los participantes fueron informados de las características del estudio, la forma de recolección de las muestras biológicas y dieron su consentimiento firmando la hoja de participación. La confidencialidad de los datos se ha mantenido en todo

momento, separando la información recogida de los datos de identificación de los participantes. Los jóvenes realizaron una encuesta donde se recogía información sobre aquellas variables que pudieran influir en los resultados del estudio (calidad seminal y exposición a compuestos químicos organoclorados). Además a los participantes se les realizó una exploración andrológica y se tomaron muestras de sangre y de semen. Las muestras de semen y sangre fueron obtenidas en las instalaciones de la universidad de Almería, en un recinto preparado especialmente para este fin.

Durante el periodo de reclutamiento se inscribieron un total de 350 jóvenes voluntarios susceptibles de entrar en el estudio. De estos 350, a los que se les dio cita previa, se presentaron 280, lo que supone un porcentaje de participación del 73,7%. Por diversas razones, no fue posible la inclusión de todos ellos en este estudio: i) 5 de los participantes (1,7%) se eliminaron porque no cumplían los criterios de inclusión establecidos para el estudio, ii) 261 jóvenes (74,6% de los participantes) realizaron de forma correcta la encuesta completa, iii) 273 (97,5%) proporcionaron una muestra adecuada de semen, iv) en 224 participantes (80%) se completaron el análisis de residuos de compuestos organoclorados en muestras de sangre, v) en 133 muestras de sangre no fue posible realizar el análisis de lípidos debido a que no se disponía de la cantidad de suero necesaria; por esta razón en los apartados donde se expresa la concentración de contaminantes químicos en muestras de sangre, en ng/g lípidos, sólo cuenta con 147 muestras en lugar de las 224 que se dispone cuando los resultados se expresan en ng/ml, y por último, vi) para la valoración de la morfología espermática se estudiaron en 115 muestras de semen por duplicado. De los 280 participantes, 146 mostraron interés en recoger el informe del seminograma (52%).

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.2.1 Características de los jóvenes

Los apartados siguientes, recogen las tablas y gráficos del análisis descriptivo de la población en estudio. Para las variables cualitativas, se presentan las frecuencias (n) y el porcentaje de estas para cada una de las categorías de las variables. En los casos de variables cuantitativas se consignan el número de individuos para cada variable, la media (M), la desviación estándar (DE), la mediana y los valores máximos y mínimos.

Edad

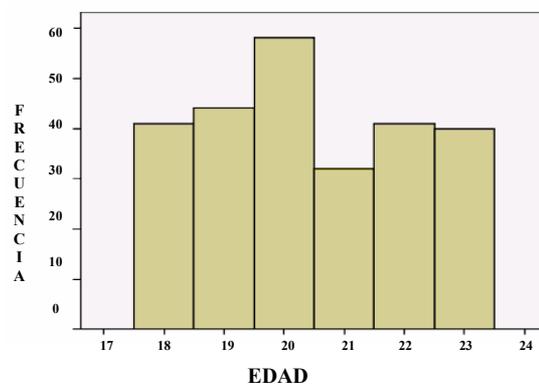
Esta variable se ha calculado como el número de años cumplidos en la fecha de la toma de las muestras. La edad no presentó una distribución normal. La edad media de los participantes en este estudio es de 20,75 años, con un rango de 18 a 23 años. Ninguna transformación logró la normalización de esta variable.

Edad (años)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
275	20,75	1,7	20,4	18,0	23,0

DE: Desviación estándar

Distribución de frecuencias de la edad



Peso

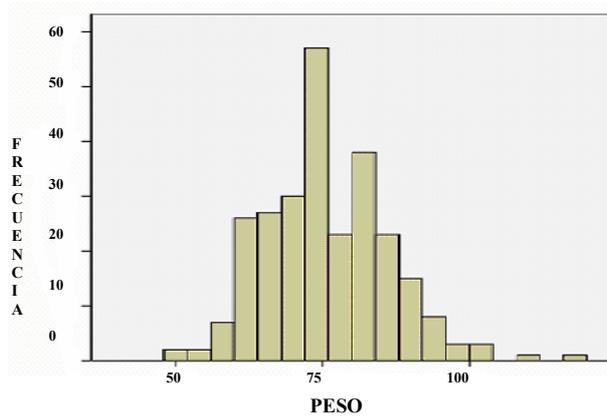
La media de peso de los participantes del estudio, en el momento del reclutamiento, fue de 75 kg ($75,3 \pm 10,5$) con un rango comprendido entre 48 y 120 kg. El peso tampoco mostró una distribución normal pero si lo hizo su transformación logarítmica.

Peso (kg)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
266	75,3	10,5	75,0	48,0	120,0

DE: Desviación estándar

Distribución de frecuencias del peso



Talla

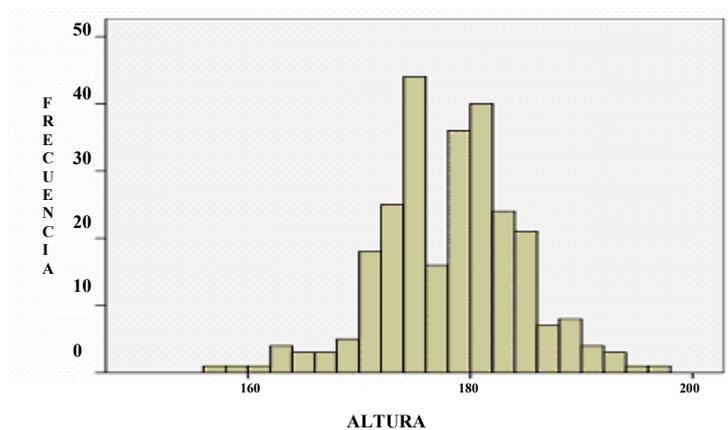
La altura recogida, en centímetros, presentó una distribución normal, y el valor medio de los participantes se situó en 177,7 cm, con un rango de 156 a 197 cm.

Talla (cm)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
266	177,7	6,4	178,0	156,0	197,0

DE: Desviación estándar

Distribución de frecuencias de la altura



Índice de masa corporal (IMC)

En la muestra siguiente se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de su índice de masa corporal (IMC), utilizando el índice de Quetelet: $IQ = \text{Peso en kg} / \text{altura en metros elevada al cuadrado (kg/m}^2\text{)}$.

La media del IMC fue 23,9 kg/m², valor que está dentro de la normalidad para individuos jóvenes según la OMS (18,5-24,99 kg/m²).

IMC (kg/m²)					
n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
264	23,9	3,0	23,7	16,6	39,6

DE: Desviación estándar

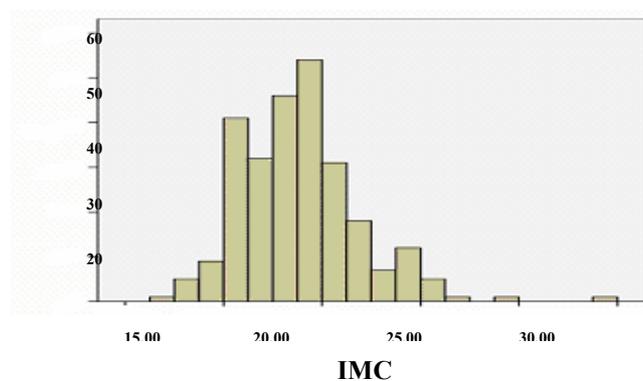
En la tabla siguiente se muestra la distribución de los participantes según la clasificación de la OMS en función del IMC.

IMC (kg/m²)		
	Criterio OMS	n (%)
Normal	18,5-24,99	188 (71,2)
Sobrepeso	25-29,99	68 (25,8)
Obesidad (I,II,III)	≥30	8 (3,0)

n=264

Como muestra la tabla, aproximadamente el 30% de la población de estudio tenía algún grado de sobrepeso según los criterios establecidos por la OMS. El IMC no presentó una distribución normal, pero esta sí se alcanzó con su transformación por su inversa.

Distribución de frecuencias del IMC



Salud general

Para la distribución de frecuencias de la población de estudio, en función de su estado de salud, se establecieron cuatro categorías: muy buena, buena, mala y muy mala. La mayoría de los individuos consideraron que gozaban de buena salud, ya que 90 (34,9%) sujetos contestaron en la encuesta tener “muy buena” salud, y 164 (63,5%) refirieron que gozaban de “buena” salud. Sólo 4 individuos (1,6%) informaron que tenían un estado de salud malo, y ninguno consideró tener una salud “muy mala”.

Salud general		
	n	%
Muy buena	90	(34,9)
Buena	164	(63,5)
Mala	4	(1,6)

n=258

Enfermedad crónica a lo largo de la vida

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población considerando la presencia de alguna enfermedad crónica en el transcurso de su vida.

Enfermedad Crónica		
	n	%
No	241	89,5
Si	17	6,6

n=258

La gran mayoría de los participantes de este estudio no había padecido ninguna enfermedad crónica en el transcurso de su vida (89,5%) y sólo 17 individuos contestaron afirmativamente.

La encuesta también recogía otras enfermedades padecidas por los participantes del estudio. Entre todas las diagnosticadas destacan las infecciones bacterianas que

fueron notificadas por 61 individuos, dolores o algias de algún tipo, referidas por 29 individuos y 3 jóvenes informaron de alguna enfermedad de carácter metabólico.

Consumo de medicamentos en los últimos tres meses

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del consumo de medicamentos en los tres meses previos a la toma de muestras.

Consumo de medicamentos		
	n	%
No	169	65,5
Si	89	34,5

n=258

De los 89 participantes que declararon haber consumido algún medicamento, se interrogó sobre el tipo de fármaco consumido. Así, el uso de antibióticos fue referido por 15 sujetos (5,8%), los analgésicos por 37 sujetos (14.3%), los antihistamínicos fueron citados por 10 jóvenes (3,9%), los suplementos vitamínicos y antidepresivos por 2 individuos en cada tipo (0,8%) y los antiinflamatorios, antivirales, hormonales, calmantes y antitumorales fueron referidos, para cada tipo, por un sólo individuo (0,4%). Por último el 7,0% no supo identificar la medicación que estaba tomando o había tomado.

Consumo de tabaco

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del consumo de tabaco. Se consideró que los sujetos tenían hábito de fumar si consumían tabaco diariamente o de manera habitual. A los fumadores esporádicos se les incluyó dentro del grupo de no fumadores.

Consumo de tabaco		
	n	%

No	172	66,7
Si	86	33,3

n=258

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central y la distribución de la variable atendiendo al número de cigarrillos consumidos por día.

Número de cigarrillos/día

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
86	7,8	5,5	5,5	1,0	20,0

DE: desviación estándar

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central y la distribución de la variable del número de años que los jóvenes refirieron haber estado fumado. Los individuos incluidos en esta tabla corresponden tanto a los fumadores como a los que tuvieron este hábito en el pasado.

Número de años como fumador

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
109	3,6	1,8	3	1,0	9,0

DE: desviación estándar

Consumo de *cannabis*

También se preguntó sobre el consumo de cannabis y sus derivados. En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función a su consumo.

Consumo de *cannabis*

	n	%
No	202	78,3
Si	56	21,7

n=258

El 78% de los participantes en este estudio no consumía *cannabis* o alguno de sus derivados, frente a un 22% que declararon consumirlo habitualmente.

Consumo de alcohol

En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del consumo de alcohol. Se consideró que los sujetos que tenían este hábito eran aquellos que consumían alcohol diariamente o de forma habitual. A los bebedores esporádicos se les incluyó dentro del grupo de no consumidores.

Consumo de alcohol

	n	%
No	81	31,4
Si	177	68,6

n=258

Se observa que cerca de un tercio de los participantes no consumía bebidas alcohólicas de forma habitual, mientras que dos tercios de la población de estudio lo hacían de manera frecuente.

Nivel de estudios

El nivel educativo se clasificó en tres categorías: estudios primarios, secundarios y universitarios. Nueve de cada diez individuos de la población de estudio se encontraban realizando estudios universitarios y 10 individuos, de los 258 que contestaron esta pregunta, tan solo tenían estudios primarios. La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias para la población de estudio.

Nivel de estudios	
n	%

Primarios	10	3,9
Secundarios	17	6,6
Universitarios	231	89,5

n=258

Actividad laboral

Sólo 42 jóvenes refirieron realizar alguna actividad laboral distinta de los estudios, lo que representó el 16,3 % del total de los jóvenes participantes; el resto de jóvenes, 216 (83,7%), no realizaban ningún tipo de trabajo.

Actividad laboral		
	n	%
No	216	83,7
Si	42	16,3

n=258

Cuando se les preguntó acerca de su horario de trabajo, 11 de los 42 jóvenes informaron tener un trabajo nocturno, y 31 refirieron un trabajo diurno, lo que representó el 4,3 y el 12,0 % del total de la muestra, respectivamente.

Horario de trabajo		
	n	%
Diurno	31	12,0
Nocturno	11	4,3
No trabajan	231	83,7

n=258

Residencia de los jóvenes en el momento del reclutamiento

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del lugar de residencia en el momento del reclutamiento. Este

parámetro se recalculó mediante la estimación del número de habitantes del lugar de residencia, reclasificando la variable como “residencia rural” aquella población con menos de 10.000 habitantes y “residencia urbana” para poblaciones con un número de habitantes igual o mayor a 10.000.

Residencia actual		
	n	%
Rural	38	14,7
Urbana	220	85,3

n=258

La mayoría de los participantes declararon vivir en áreas urbanas (85,3%), frente a un 14,7% de los jóvenes que residía en núcleos rurales.

4.2.2 Características de los padres

Se describe a continuación la información obtenida sobre las características de los padres de los participantes que pudieran ser de interés para la caracterización de la exposición a factores relacionados con la calidad seminal de la población de estudio y para el objetivo de este trabajo.

Lugar de nacimiento del padre

Los voluntarios contestaron a preguntas sobre el lugar de nacimiento de sus padres. Siguiendo el mismo criterio que se había empleado para el lugar de nacimiento de los voluntarios, la residencia de los progenitores de los participantes se clasificó en rural y urbana (“rural” <10.000 habitantes y “urbana” ≥10.000 habitantes). La mayoría de ellos nacieron en centros urbanos (73,3%) y sólo uno de cada cuatro (26,7%) habían nacido en núcleos rurales.

Lugar de nacimiento del padre	
	n %

Rural	69	26,7
Urbana	189	73,3

n=258

Lugar de nacimiento de la madre

De la misma manera, respecto a las madres de los participantes, la mayoría nació en centros urbanos (70,5%) y el 29,5% lo hicieron en núcleos rurales, mostrando un comportamiento similar al de los padres.

Lugar de nacimiento de la madre		
	n	%
Rural	76	29,5
Urbana	182	70,5

n=258

Residencia de la madre durante el embarazo

En cuanto a la residencia de la madre durante la gestación del participante, el 80,2% de las madres residía en centros urbanos frente al 19,8% de vivía en núcleos rurales, porcentaje algo superior al de la residencia actual del voluntario.

Residencia de la madre durante el embarazo		
	n	%
Rural	51	19,8
Urbana	207	80,2

n=258

Duración de la gestación

En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función de la duración de su gestación. Se establecieron dos categorías: pretérmino (<37 semanas) y a término (≥ 37 semanas), según los criterios establecidos por la OMS.

Semanas de gestación		
	n	%
A término	237	91,9
Pretérmino	21	8,1

n=258

La mayoría (92%) de los participantes de nuestro estudio nacieron después de transcurridas las 37 semanas de embarazo, y un 8% de los participantes declaró haber nacido tras un embarazo menor de 37 semanas.

Madre fumadora durante el embarazo

En la tabla siguiente se muestran los resultados de las respuestas a la pregunta sobre el hábito tabáquico de las madres durante el embarazo. Sólo en un 5,8% de los casos se refirió que las madres eran fumadoras durante la gestación de los participantes, aunque un 8,5% de ellos desconocían esta característica.

Hábito tabáquico durante el embarazo		
	n	%
No	221	85,7
Si	15	5,8
No sabe	22	8,5

n=258

Madre trabajadora durante el embarazo

Las características laborales de las madres de los participantes en el transcurso de su embarazo se muestran en la tabla siguiente. El 61,2% de los participantes no

refirieron trabajo de la madre fuera del hogar durante su embarazo y un 22,9% informaron que sus madres si trabajaron fuera de casa durante la gestación.

Madre trabajadora durante el embarazo

	n	%
No	158	61,2
Si	59	22,9
No sabe	41	15,9

n=258

Tipo de trabajo desempeñado durante el embarazo

Se obtuvieron múltiples respuestas respecto al tipo de trabajo en el que estaban involucradas las 59 madres que declararon algún tipo de actividad laboral en el transcurso de la gestación de los participantes. Las diferentes respuestas se reclasificaron en tres tipos: trabajo intelectual, manual o agrícola.

Tipo de trabajo de la madre durante el embarazo

	n	%
Intelectual	13	22,2
Manual	34	57,6
Agrícola	8	13,6
No lo especifica	4	6,8

n=59

La mayoría de las madres (61,2%) no desempeñaron un trabajo distinto al doméstico. De las 59 madres (22,9%) que trabajaban fuera del hogar, 34 (57,6%) desarrollaron trabajos manuales durante todo su embarazo, 13 (22,2%) desempeñaron trabajos de tipo intelectual y 8 de ellas (13,6%) declararon haber realizado actividades agrícolas.

4.3. EXPLORACIÓN ANDROLÓGICA DE LOS JÓVENES

Del total de 280 participantes en el estudio, se pudo realizar la exploración andrológica en 265 de los participantes. Los resultados de las variables más importantes recogidas en el protocolo de exploración física, se describen a continuación.

Presencia o ausencia de cicatriz en la zona inguinal o genital

En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de los jóvenes según presenten o no cicatriz quirúrgica en la zona genital ó inguinal. Un 6 % de los jóvenes presentó al gún tipo de cicatriz de origen quirúrgico, en su mayor parte por fimosis o hernia inguinal.

Presencia de cicatriz		
	n	%
Si	15	5,7
No	250	94,3

n=265

Desarrollo del vello púbico: Estadios de Tanner

Prácticamente el 99% de la población de estudio presenta un estadio propio de la madurez sexual (4-5 de Tanner). No obstante esta variable puede ser confusa debido a las tendencias estilistas actuales de la juventud (por ejemplo depilación del vello púbico).

Vello púbico-Estadios de Tanner		
	n	%
3	1	0,4
4	3	1,1
5	261	98,5

n=265

Alteraciones del pene

En nuestra población de estudio se encontraron dos casos de anomalías en el tamaño del pene (micropene) lo que representa menos del 1% de la población total. No se detectó ningún caso de hipospadias.

Alteraciones del pene

	n	%
Normal	263	99.3
Anormal	2	0.8

n=265

Disposición de los testículos

En las tablas siguientes se muestran los resultados de la exploración testicular. La mayoría de los participantes (249, 94%) presentaron ambos testículos en una localización adecuada (bajo en el escroto). En un individuo se detectó un testículo en el canal inguinal y en otro estuvo ausente el testículo derecho. Un 5,3 % de los testículos derechos se hallaron altos en el escroto (14 individuos) y en 23 individuos se detectó una localización anormal del testículo izquierdo, ya fuera alta en el escroto (22/265) o en el canal inguinal (1/265).

Disposición del testículo derecho

	n	%
Bajo en el escroto	249	94,0
Alto en el escroto	14	5,3
En canal inguinal	1	0,4
No palpable/ausente	1	0,4

n= 265

Disposición del testículo izquierdo

	n	%
Bajo en el escroto	242	91,3
Alto en el escroto	22	8,3
En canal inguinal	1	0,4
No palpable/ausente	0	0

n=265

Para el análisis estadístico posterior se consideró la disposición de ambos testículos teniendo en cuenta que uno o ambos se localizaran fuera de su posición normal.

Disposición de ambos testículos

	n	%
Uno fuera del escroto	33	12,5
Ambos fuera del escroto	8	3,0

n= 265

Consistencia de los testículos

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de los jóvenes según la consistencia al tacto de los testículos derecho e izquierdo. Aproximadamente el 99% de la población presentó una consistencia normal de los testículos.

Consistencia del testículo derecho

	n	%
Normal	260	99,2
Blando	1	0,4
Duro	1	0,4

n=263, uno de ellos estaba en el canal inguinal

Consistencia del testículo izquierdo

	n	%
Normal	260	98,5
Blando	2	0,7
Duro	2	0,7

n=265, uno de ellos estaba en el canal inguinal

Tamaño de los testículos

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central y la distribución de los sujetos de estudio en función del tamaño del testículo derecho e izquierdo, medidos con ayuda de un orquidómetro estandarizado. El volumen testicular medio se sitúa en torno a los 20 ml.

Volumen testículo derecho (ml)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
---	-------	----	---------	--------	--------

264	18,5	4,6	20	10	25
-----	------	-----	----	----	----

DE: desviación estándar

Volumen testículo izquierdo (ml)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
265	18,5	4,6	20	8	25

DE: desviación estándar

Para el análisis estadístico posterior se consideró el tamaño de ambos testículos teniendo en cuenta el volumen normal (≥ 12 ml).

Volumen testículo derecho

	n	%
≥ 12	255	97,3
< 12	7	2,7

n=262

Volumen testículo izquierdo

	n	%
≥ 12	250	97,0
< 12	8	3,0

n=264

Presencia de tumores

En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de los jóvenes según la presencia o no, de masa tumoral testicular palpable.

Presencia de tumor

	n	%
Si	1	0,4
No	264	99,6

En tan sólo un caso se encontró en la exploración una masa testicular sospechosa que, siguiendo el protocolo establecido, fue derivado al especialista.

Epidídimos

En la tabla siguiente se muestran los resultados de la exploración del epidídimo (derecho e izquierdo). La principal anomalía detectada fue la presencia de quistes, que aparecieron en el 3% de la población de estudio.

Epidídimos		
	n	%
Normal	256	97,0
Anormal (en uno o ambos)	8	3,0

Vasos deferentes

La tabla siguiente muestra la presencia o ausencia, al tacto, de los conductos deferentes derecho e izquierdo. En 241 jóvenes (90,9%) fueron palpables, mientras que en 24 (9,1%) no se apreciaron de una forma clara.

Vasos deferentes		
	n	%
Presencia	241	90,9
Ausencia	24	9,1

n=265

Varicocele

En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de los jóvenes según la presencia o ausencia de varicocele (derecho, izquierdo o ambos), en cualquiera de sus distintos estadios. En casi el 90% de los jóvenes la exploración fue negativa para varicocele, mientras que en 27 jóvenes (10,3%) si se observó varicocele en algunos de sus estadios.

Varicocele

	n	%
No	238	89,8
Si	27	10,2

n=265

Hidrocele

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias en la población de estudio, según la existencia de hidrocele, en el testículo derecho o izquierdo. Se detectaron dos casos de hidrocele (0,7%).

Hidrocele

	n	%
No	263	99.3
Si	2	0.7

n=265

4.4. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES

Un total de 273 muestras de semen procedentes de 273 jóvenes fueron analizadas en el presente estudio. A continuación se detallan los resultados obtenidos para las distintas variables indicadoras de calidad seminal.

Para las variables cualitativas, se estimaron la frecuencia (n) y el porcentaje (%) para cada una de las categorías. En los casos de variables cuantitativas se consignan, el número total de individuos con información para esa variable (n), la media aritmética, la desviación estándar (DE), la mediana, y los valores máximo y mínimo.

4.4.1 Características cronológicas, macroscópicas, químicas y citológicas

Estación del año

Aunque dentro de los objetivos iniciales del estudio se pretendía tener la máxima representatividad en las cuatro estaciones del año, finalmente del total de muestras recogidas (274) 74 de ellas se recogieron en primavera (21,2%), 21 en verano (7,7%), 132 se recogieron en otoño (54,4%) y 46 en invierno (16,8%).

Estación de recogida de muestras

	n	%
Primavera	74	27,0
Verano	21	7,7
Otoño	132	48,4
Invierno	46	16,8

n=273

Tiempo de Abstinencia

La tabla describe la distribución de los participantes en cuanto al tiempo de abstinencia. Entre los 273 jóvenes participantes se presentó una media de 75,3 horas, con una DE de 39,4, un mínimo de 24 y un máximo de 336 horas.

Tiempo de abstinencia (horas)

n	Media*	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
273	75,3	39,7	67,0	24,0	336,0

*horas; DE: desviación estándar

Cuando la población se reclasificó en un tiempo de abstinencia menor y mayor o igual a 48 horas, de acuerdo a la recomendaciones establecidas por la OMS, 19 individuos (7,0%) estuvieron por debajo de las 48 horas, mientras que el resto, 254 se situaron por encima de este valor (93,0%). Salvo dos casos el periodo de abstinencia en el grupo de menos de 48 horas oscilaba entre las 38 y 47 horas.

Tiempo de abstinencia

	n	%
< 48 horas	19	7,0

≥ 48 horas	254	93,0
<hr/>		
n=273		

Acidez-alcalinidad de las muestras (pH)

La media del valor de pH en las muestras de semen se muestra en la tabla siguiente.

Acidez-alcalinidad (pH)					
n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
273	7,4	0,3	7,5	6,7	8

DE: desviación estándar

Nuevamente siguiendo los criterios de la OMS, se reclasificó esta variable en menor y mayor o igual a un valor de pH 7,2. La gran mayoría, 231 sujetos (84,6%) tuvieron un pH superior a 7,2, mientras que 42 (15,4%) presentaron un pH ligeramente más ácido.

Acidez-alcalinidad (pH)		
	n	%
≥ 7.2	231	84,6
< 7.2	42	15,4

n=273

Licuación/viscosidad

Normalmente durante el proceso de análisis de las muestras sucede la licuación total del semen y cuando no se alcanza una licuación total, es conveniente hacerlo resaltar porque puede ocasionar problemas durante el desarrollo del análisis. Así en la población de estudio, 256 sujetos (93,8%) de la muestra presentaron una licuefacción completa, mientras que en 17 de ellos (6,2%) este proceso no se completó.

Licuación		
	n	%
Completa	256	93,8

Incompleta 17 6,2

n=273

La viscosidad fue clasificada en 4 niveles, asignado el valor 0 para el nivel normal, con una frecuencia de 220, que supone el 80,6% de las muestras, y los niveles 1, 2 y 3 con 17 (6,2%), 15 (5,5%) y 21 (7,7%) muestras, respectivamente.

Viscosidad

	n	%
Normal	220	80,6
Nivel 1	17	6,2
Nivel 2	15	5,5
Nivel 3	21	7,7

n=273

Volumen

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central del volumen de las muestras de semen. El volumen de semen eyaculado se expresa en mililitros y posteriormente se reclasifica en menor o mayor o igual a 2 ml, siguiendo los criterios de normalidad de la OMS.

Volumen de eyaculado (ml)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
273	3,1	1,5	3,0	0,4	9,8

DE: desviación estándar

La media del volumen de semen eyaculado es de 3,1 ml, con una DE de 1,5 y una mediana de 3,0 ml. El rango alcanza un mínimo de 0,4 y un máximo de 9,8 ml. El 78,0% de la población presentó un volumen normal de eyaculado, es decir igual o superior a 2 ml, mientras que en 60 de los 273 participantes (22,0%), estuvo por debajo de los 2 ml.

Volumen de eyaculado

	n	%
< 2 ml	60	22,0
≥ 2 ml	213	78,0

n=273

Aglomeraciones

La presencia de agregados de espermatozoides junto con otros componentes del semen se conoce como agregaciones o aglomeraciones. Esta variable fue clasificada en 4 niveles, asignado el valor 0 para el nivel normal (no existencia de aglomeración), con una frecuencia de 209, que supone el 76,8% de las muestras, y los niveles 1, 2 y 3 con 22 (8,1%), 31 (11,4%) y 10 (3,7%) muestras, respectivamente.

Aglomeraciones		
	n	%
0	209	76,8
1	22	8,1
2	31	11,4
3	10	3,7

n=272

Presencia de Células redondas

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central para la variable presencia de células redondas (elementos celulares no espermatozoides) en la muestra seminal (expresadas en millones/ml).

Células redondas					
n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
273	2,39	3,56	1	0	28

4.4.2 Concentración espermática

La tabla siguiente resume los datos de la concentración espermática (millones de espermatozoides/ml) de las muestras de semen analizadas. Esta variable no presentó una

distribución normal, ni los datos crudos ni tras ninguna transformación numérica, pero para el análisis estadístico posterior se utilizó su transformación logarítmica con el objeto de reducir su dispersión.

Concentración espermática (millones/ml)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
273	72	70,1	51	0	420

DE: desviación estándar

La media aritmética de la concentración espermática se situó en 72 millones de espermatozoides por mililitro de semen, y la población presentó una mediana de 51 millones por mililitro, con un rango de 0 a 420 millones de células.

Siguiendo los criterios de normalidad de la OMS, la variable concentración espermática se reclasificó de acuerdo a una concentración menor y mayor o igual a 20 millones/ml. En 51 sujetos (18,7%) se encontró una concentración por debajo de los 20 millones y 222 individuos (81,3%) mostraron una concentración superior a este nivel corte.

Concentración espermática

	n	%
<20 millones/ml	51	18,7
≥20 millones/ml	222	81,3

4.4.3 Número total de espermatozoides (NTE)

El número total de espermatozoides en el eyaculado, expresado en millones, fue estimado mediante el producto de la concentración de espermatozoides por el volumen total eyaculado. Esta variable tampoco presentó una distribución normal, ni en su forma cruda o ni con alguna de sus transformaciones numéricas, sin embargo, nuevamente con el fin de reducir la dispersión, para el análisis estadístico posterior se transformó la variable en su logaritmo neperiano.

Número total de espermatozoides (millones)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
273	215,4	239,5	149,3	0	1757,5

DE: desviación estándar

Para el análisis

mayor o igual a 40 millones de espermatozoides presentes en el eyaculado.

Número total de espermatozoides

	n	%
< 40 millones	48	17,6
≥ 40 millones	225	82,4

4.4.4 Movilidad espermática

La OMS recomienda un sistema simple para medir la movilidad espermática sin necesidad de equipos complejos, y clasifica esta variable en 4 categorías, a) movilidad progresiva rápida, b) movilidad progresiva lenta, c) movilidad no progresiva, e d) inmovilidad.

Movilidad “tipo a”, o movilidad progresiva rápida

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rápida ($>25\mu\text{m}/\text{seg}$), también llamados espermatozoides “tipo a” ó Q+++ . Esta variable no presentó una distribución normal ni en su forma cruda, ni con alguna de sus transformaciones numéricas, pero se incluyó su transformación logarítmica para el análisis estadístico bivariente posterior.

La media aritmética del porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida progresiva resultó ser del 29,9% con una mediana del 28% en un rango de 0 a 78%.

Movilidad “tipo a” (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	29,9	18,5	28	0	78

DE: desviación estándar

La variable se reclasificó, de acuerdo a los criterios de normalidad de la OMS, según presentaran un porcentaje menor o mayor al 25% de movilidad tipo a. De la muestra, 132 jóvenes (48,4%) presentaron una movilidad tipo a inferior al 25% y el resto estuvo por encima (141 sujetos, el 51,6%).

Movilidad “tipo a”

	n	%
< 25 %	131	48,0
≥ 25 %	141	52,0

n=272

Movilidad “tipo b”, o movilidad progresiva lenta

La tabla siguiente muestra los valores obtenidos al evaluar los espermatozoides con movilidad progresiva lenta, es decir de 10-25 $\mu\text{m}/\text{seg}$, también llamados espermatozoides “tipo b” ó Q++. Esta variable tampoco mostró una distribución normal, ni con los datos crudos ni tras alguna transformación, por lo que igual que con la variable anterior se utilizó su transformación logarítmica para el análisis estadístico bivalente posterior.

Movilidad tipo b (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	18,0	8,0	17,5	0	51

DE: desviación estándar

Movilidad progresiva (a+b)

Se muestran en la tabla siguiente las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo. Esta variable es el resultado de sumar las dos variables anteriores y refleja el porcentaje de espermatozoides que tienen capacidad de progresión. La movilidad a+b presentó un valor medio del 47,7% con una DE de 17,4, y una mediana del 49%, en un rango de 0 a 86%. En este caso particular si que se observó una distribución normal, por lo que para el análisis bivalente se utilizaron los datos crudos. Además se consideró oportuna su transformación logarítmica con objeto de poder establecer las correlaciones con las otras variables de movilidad.

Movilidad a+b (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	47,7	17.5	49	0	86

DE: desviación estándar

Siguiendo los criterios de normalidad establecidos por la OMS, también se clasificó esta variable estableciendo dos categorías de movilidad progresiva, baja <50% y normal \geq 50%, de forma que 134 sujetos presentaron movilidad progresiva baja (49,1%) y 139 movilidad progresiva normal (50,9%).

Movilidad (a+b) (%)

	n	%
<50%	134	49,1
\geq50%	139	50,9

Otra de las recategorizaciones recomendadas por la OMS, para la movilidad espermática, es la generada mediante la construcción de una variable binaria que combina la movilidad tipo a y la movilidad progresiva a+b. Esta nueva variable se codifica en dos categorías, la primera incluye baja movilidad a <25%; y baja movilidad tipo a+b <50%, y la segunda para alta movilidad progresiva rápida \geq 25% y alta

movilidad $a+b \geq a$ 50%. Siguiendo este criterio resultaron 123 (45%) jóvenes en la primera categoría y 150 (55%) en la segunda categoría.

Movilidad a y Movilidad (a + b)

	n	%
a <25% y a+b <50%	134	49,9
a ≥25% y/o a+b ≥50%	138	50,1

n=272

Movilidad “tipo c”, o movilidad no progresiva

La media del porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos (<10 $\mu\text{m}/\text{seg}$) o con movilidad tipo c, fue del 10,9%, con una DE de 4,8%, Los individuos presentaron una mediana del 10% con un rango del 0 a 45%, según se muestra en la tabla siguiente. La movilidad c, tampoco presentó una distribución normal ni siquiera aplicando alguna transformación numérica, por lo que se incluyó su transformación mediante logaritmo neperiano en el análisis bivalente posterior.

Movilidad c (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	10,9	4,8	10,0	0	45

DE: desviación estándar

Movilidad total (a+b+c)

Esta variable es el resultado de sumar las variables de movilidad a, b y c. Refleja el porcentaje de espermatozoides que presentan algún tipo de movilidad. En la siguiente tabla se muestran las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides móviles o con movilidad total.

Movilidad a+b+c (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	58.6	16.7	60	0	89

DE: desviación estándar

La movilidad total tampoco presentó una distribución normal, y aunque también se transformó a su logaritmo neperiano, se presentan a continuación los datos aritméticos para fines de comparación. Como en ocasiones anteriores la variable se reclasificó como variable dicotómica en base al valor de la mediana. En nuestro estudio, 70 sujetos (25,6%) mostraron un valor inferior al 50% y 202 participantes (74,3%) mostraron un valor superior.

Movilidad a+b+c (%)

	n	%
< 50 %	70	25,6
≥ 50 %	202	74,3

n=272

Movilidad tipo d, o Inmóviles

La movilidad tipo d refleja el porcentaje de espermatozoides que no presentan ningún tipo de movilidad. Esta variable tampoco presentó una distribución normal, pero su transformación en el valor de raíz cuadrada si que la tuvo, por lo cual esta transformación fue utilizada en el análisis estadístico posterior, aunque a continuación se presentan los datos aritméticos para fines de comparación. El valor medio de la movilidad tipo “d” se sitúa en el 42,6%, con una DE de 15,7, una mediana del 40% y un rango de 12 a 100%.

Movilidad d (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	42,6	15,7	40	12	100

4.4.5 Número total de espermatozoides móviles (NTEM)

El conocimiento de la movilidad a+b+c y del número total de espermatozoides (NTE) permite calcular, para cada individuo, el parámetro número total de espermatozoides móviles (NTEM) que representa el número total de espermatozoides móviles en cada muestra. En la tabla siguiente se describen los datos descriptivos de esta variable, la cual presentó un valor medio de 66,8 millones con una DE de 4,4 millones y con un rango de 0,2 a 1387,7 millones.

Número total de espermatozoides móviles (NTEM)					
n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
272	66,8	4.4	86,3	0,2	1387,7

Millones de

4.4.6 Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática tan sólo se pudo realizar en una submuestra de 115 individuos del total de espermiogramas efectuados por las razones de orden técnico explicadas con anterioridad.

Formas normales

La media del porcentaje de formas normales (PEN) observadas fue del 13,8%, una mediana del 13%, y un rango de 0 a 34%, según se muestra en la tabla siguiente. Cuando se clasifico atendiendo al porcentaje de formas normales inferior al 5%, 15 jóvenes se situaron por debajo del mismo.

Formas normales (%)					
n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo

115	13,8	8,0	13	0	34
-----	------	-----	----	---	----

DE: desviaci

Formas normales (%)

	n	%
≤ 4%	15	13.0
> 4%	100	87.0

n=115

Formas anormales

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides anormales (con una o más anomalías) (PEA) en la población de estudio. La variable no alcanzó la distribución normal, pero la transformación a su raíz cuadrada si lo hizo, por lo que ésta se utilizó para el análisis estadístico posterior.

Formas anormales (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
115	86,3	8,1	87	64	100

DE: desv

Cabezas anormales

Se muestran en la tabla siguiente las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides con cabezas anormales (PCA), en la población de estudio. Esta variable presentó una distribución normal, mostró un valor medio de 92,3%, una mediana de 94,4% y un rango de 62,9 a 100.

Cabezas anormales (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
115	92,3	6,9	94,4	62,9	100

Piezas intermedias anormales

Se muestran en la tabla siguiente las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides con piezas intermedias anormales (PIA), en la población de estudio. Esta variable no presentó una distribución normal, pero como tampoco presentó una dispersión grande se utilizó en los análisis estadísticos posteriores en su forma cruda sin ninguna transformación.

Piezas intermedias anormales (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
115	26,0	8,6	26,0	3,4	50

DE: desvi

Flagelos anormales

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides con flagelos anormales (PFA), en la población de estudio. Esta variable no presentó una distribución normal, y tampoco se logró con ninguna transformación logarítmica, por lo que en los análisis posteriores se usaron los datos crudos. La media aritmética fue de 7,2%, la mediana de 5,4% y el rango de 0 a 39,6%.

Flagelos anormales (%)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
115	7,2	6,6	5,4	0,0	39,6

DE: desviación estándar

Restos citoplasmáticos

En la siguiente tabla se muestran las medidas de tendencia central del porcentaje de espermatozoides con restos citoplasmáticos (PRC), en la población de estudio. Esta variable tampoco presentó una distribución normal, la cual se logró con su transformación en la raíz cuadrada. Los datos aritméticos mostraron un valor medio de 3,4% y una mediana de 2,9%.

Restos citoplasmáticos (%)					
n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
115	3,4	2,9	2,9	0,0	18,9

DE: desv

Índice de teratozoospermia

Por último, se muestran en la tabla siguiente las medidas de tendencia central del índice de teratozoospermias (IT) en la población de estudio. La variable no presentó una distribución normal, pero la transformación a su raíz cuadrada si lo hizo, por lo que también fue incluida en el análisis bivalente. Los datos aritméticos mostraron una media de 1,3 y una mediana idéntica.

Índice de Teratozospermia					
n	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
115	1,3	1,3	0,1	0,9	1,7

DE: desviación estándar

4.5. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HORMONALES EN SANGRE DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Siguiendo el protocolo de estudio diseñado, la muestra de sangre obtenida en el momento de la exploración física de los voluntarios fue procesada con objeto de

investigar el perfil hormonal y determinar el perfil lipídico. Se muestran a continuación los resultados de las variables bioquímicas necesarias para determinar el contenido de lípidos (colesterol, triglicéridos, LDL y HDL) y los niveles hormonales (FSH, LH, testosterona e inhibina) de los participantes en los que se contó con muestra de sangre suficiente para este análisis.

4.5.1 Colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos en suero

En la tabla siguiente se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de sus valores de colesterol total y triglicéridos, en sangre, indispensables para expresar las concentraciones de plasmáticas en ng/g lípido. El valor medio para colesterol total en los jóvenes participantes es de 165,9 mg/dl y una mediana de 162 mg/dl.

Colesterol total (mg/dl)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
148	165,9	34.4	162	100	279

DE: desviación estándar

Los triglicéridos presentaron una media de 111,7 mg/dl y una mediana de 97 mg/dl. Según la clasificación de la OMS el valor medio obtenido por la población de estudio para colesterol total y para triglicéridos se encuentran dentro de la normalidad (colesterol total < 200 mg/dl y triglicéridos < 200 mg/dl).

Triglicéridos (mg/dl)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
148	111,7	53,6	97	45	389

DE: desviación estándar

También se presentan los datos para lípidos de alta y de baja densidad. En el primer caso, el valor de la media aritmética para LDL fue de 94,2 mg/dl, con una mediana de 88,5 mg/dl. El valor medio para HDL fue de 51,9 mg/dl, con una mediana de 50,0 mg/dl. En ambos casos los valores obtenidos para la población de estudio se encuentran dentro de la normalidad aunque el valor medio de HDL aparece ligeramente

por encima de lo establecido (colesterol HDL > 45 mg/dl y colesterol LDL < 130 mg/dl).

Colesterol LDL (mg/dl)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
148	94,2	43,5	88,5	21,6	508,0

DE: desviación estándar

Colesterol HDL (mg/dl)

n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
148	51,9	11,0	50	12	85

DE: desviación estándar

Tanto colesterol como triglicéridos y lípidos de alta y de baja densidad (HDL y LDL), no presentaron una distribución normal; por lo que los datos numéricos se transformaron a su logaritmo neperiano para reducir al máximo la dispersión.

4.5.2 Perfil hormonal sérico

En el estudio del perfil hormonal sérico masculino se incluyeron las siguientes hormonas:

Testosterona

La tabla siguiente muestra los valores obtenidos en la medida de testosterona sérica. 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.

Testosterona (nmol/l)

n	Media	DE	mediana	Mínimo	Máximo
253	24,9	8,4	23,8	9,2	59,0

DE: desviación estándar

Globulina transportadora de las hormonas sexuales (SHBG)

La tabla siguiente muestra los resultados de la medida de SHBG, que presentó una media aritmética de 30,3 nmol/l y una mediana de 29,5 nmol/l. La raíz cuadrada de los valores obtenidos para esta hormona presentó una distribución normal, por lo que esta transformación fue incluida en el análisis estadístico posterior.

SHBG (nmol/l)

n	Media	DE	mediana	Mínimo	Máximo
253	30,3	10,5	29,5	6	74,0

DE: desviación estándar

Inhibina B

La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos en la medida de inhibina B. Los datos descriptivos obtenidos para inhibina B fueron los siguientes: valor medio de 173,6 pg/ml y una mediana de 163 pg/ml. Esta variable no presentó una distribución normal en ningún caso, aunque en el análisis estadístico se utilizó la transformación logarítmica para reducir el sesgo.

Inhibina B (pg/ml)

n	Media	DE	mediana	Mínimo	Máximo
253	173,6	66,8	163	1	425

DE: desviación estándar

Hormona luteinizante (LH)

La tabla siguiente muestra los resultados de la medida de LH. La hormona luteinizante presentó una media aritmética de 4,1 UI/l, con una DE de 10,5 UI/l, una mediana de 3,8 UI/l y un rango de 6 a 74,0 UI/l. Esta variable presentó una distribución normal cuando se transformó a su logaritmo neperiano, por lo que esta transformación fue utilizada para los análisis estadísticos posteriores.

LH (UI/l)

n	Media	DE	mediana	Mínimo	Máximo
----------	--------------	-----------	----------------	---------------	---------------

253	4,1	1,8	3,8	1,2	11,0
-----	-----	-----	-----	-----	------

DE: desviación estándar

Hormona foliculoestimulante (FSH)

La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos en la medida de FSH. La hormona folículo estimulante presentó un valor medio de 3,1 UI/l y una mediana de 2,8 UI/l. Esta variable tampoco presentó una distribución normal tanto en los datos crudos como para ninguna de las transformaciones realizadas.

FSH (UI/l)

n	Media	DE	mediana	Mínimo	Máximo
253	3,1	1,8	2,8	0,4	10,6

DE: desviación estándar

4.6. ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN MUESTRAS DE SANGRE

Utilizando la metodología cromatográfica descrita en el apartado correspondiente de la sección de Material y Métodos se procedió a la determinación de la concentración de residuo de los plaguicidas organoclorados seleccionados en 224 muestras de suero disponibles para el estudio. En el caso de disponer de los valores de lípidos (n=147) en sangre, se hizo el ajuste de las concentraciones de residuo de plaguicidas en función del contenido lipídico, utilizando el algoritmo mostrado en la sección de Material y Métodos.

4.6.1 Número de residuos cuantificados por muestra

En la tabla siguiente se presenta la estadística descriptiva para la variable: número de plaguicidas detectados en las muestras séricas.

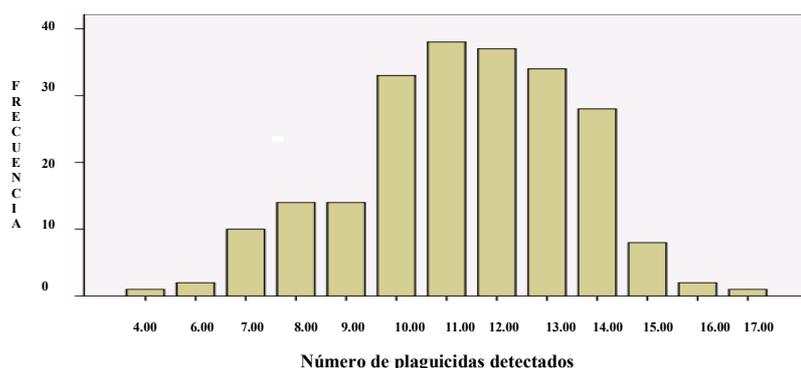
Número de plaguicidas

Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
11,29	2,33	11	1	17

n=224; DE: desviación estándar

La totalidad de las muestras contenía al menos un plaguicida en concentración cuantificable. La mediana del número de plaguicidas encontrados en los sueros sanguíneos de los participantes en este estudio fue de 11 con un rango comprendido entre 1 y 17. La distribución de frecuencias de la población de estudio en función a la cantidad de plaguicidas organoclorados cuantificados en las muestras de suero sanguíneo se muestra en la gráfica siguiente.

Número de plaguicidas detectados



4.6.2 Concentración de plaguicidas organoclorados por muestra

A continuación se presentan los datos estadísticos de frecuencia y los niveles de plaguicidas organoclorados en la sangre de los participantes. Se recogen la frecuencia de detección de los diferentes grupos de plaguicidas, así como el valor medio de dichos niveles con sus desviaciones estándar, medianas, y los valores mínimos y máximos de las concentraciones de los compuestos estudiados. Los cálculos de los valores medios de los plaguicidas se han realizado considerando: i) sólo los valores superiores al límite de cuantificación (>LC) y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido, y ii) asignando el valor de cero a las concentraciones <LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

Exposición a aldrín, endrín y dieldrín

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función de la concentración del grupo de los ciclodienos, aldrín, dieldrín y endrín en suero sanguíneo.

Residuo >LC		
	n	%
Aldrín	177	79,00
Endrín	136	60,71
Diieldrín	107	47,76

n =224; LC: límite de cuantificación

A continuación se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio, en función de las concentraciones de aldrín, dieldrín y endrín en las muestras de suero, considerando sólo aquellos valores >LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípidos.

Concentración (ng/ml) ((excluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Aldrín	3,75	4,32	2,62	0,50	33,76
Endrín	5,04	9,23	1,50	0,32	64,04
Dieldrín	1,85	2,74	0,50	0,46	29,42

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (excluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Aldrín	611,26	436,39	494,00	145,41	2997,72
Endrín	1237,80	2256,27	359,68	71,79	13733,94
Dieldrín	526,48	489,96	390,24	82,31	3651,85

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Aldrín es el compuesto más frecuentemente detectado en las muestras de suero (79%). Sin embargo, el compuesto más abundante dentro de este grupo es endrín, pues se obtuvo una concentración media en suero de 5,04 ng/ml y 1.237,80 ng/g lípido, al corregir por contenido lipídico, en el 60,71% de las muestras analizadas.

La tabla siguiente muestra las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de aldrín, dieldrín y endrín en sangre, considerando la totalidad de las muestras y asignando el valor cero a las concentraciones <LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y en ng/g de lípido.

Concentración (ng/ml) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
Aldrín	3,63	4,40	2,62	33,76
Endrín	4,46	9,47	1,22	64,04

Dieldrín	1,59	2,87	0	29,42
-----------------	------	------	---	-------

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
Aldrín	482,12	461,11	395,62	2997,72
Endrín	671,20	1768,32	137,35	13733,94
Dieldrín	263,24	434,70	41,15	3651,85

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Exposición a endosulfán, isómeros y metabolitos

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función de la concentración de endosulfán I, endosulfán II y sus metabolitos en muestras de suero sanguíneo.

Residuo >LC

Compuesto	n	%
Endosulfán-I	180	80,40
Endosulfán-II	77	34,40
Endosulfán-éter	89	39,70
Endosulfán-lactona	183	81,70
Endosulfán-diol	206	92,00
Endosulfán-sulfato	101	45,10
Σ Endosulfán	224	100,00

n=(224); LC: límite de cuantificación

Las tablas siguientes muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de endosulfán I, endosulfán II y sus metabolitos en las muestras de suero, considerando sólo aquellos valores >LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

Concentración (ng/ml) (excluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Median	Mínimo	Máximo
Endosulfán-I	2,10	2,81	1,47	0,25	19,39
Endosulfán-II	1,31	0,88	1,00	0,78	6,85
Endosulfán-éter	0,52	1,02	0,05	0,05	7,93
Endosulfán-lactona	2,01	2,17	1,68	0,05	16,16
Endosulfán-diol	15,39	14,87	9,56	0,25	76,86
Endosulfán-sulfato	2,17	5,92	0,50	0,20	53,32
Σ Endosulfán	25,76	21,79	18,66	2,50	145,55

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (excluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Endosulfán-I	474,95	612,15	301,02	83,65	3793,98
Endosulfán-II	267,95	205,43	200,87	83,28	1210,90
Endosulfán-éter	205,98	252,80	129,11	58,14	1587,24
Endosulfán-lactona	441,21	352,11	365,41	75,45	2238,19
Endosulfán-diol	2511,73	2298,70	1658,76	307,86	12673,79
Endosulfán-sulfato	460,61	1130,38	144,75	33,05	7258,41
Σ Endosulfán	4029,55	3443,11	3017,13	411,06	21621,57

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Seguidamente se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de endosulfán-I, endosulfán-II y sus metabolitos en sangre, una vez que se ha asignado el valor cero a las concentraciones <LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

Concentración (ng/ml) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
Endosulfán-I	2,05	2,84	1,47	19,39
Endosulfán-II	0,65	1,18	0	6,85
Endosulfán-éter	0,49	1,03	0	7,93
Endosulfán-lactona	2,00	2,18	1,68	16,16
Endosulfán-diol	15,37	14,89	9,56	76,86
Endosulfán-sulfato	2,08	5,94	0,50	53,32
Σ Endosulfán	22,66	20,17	16,33	136,56

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
Endosulfán-I	354,54	567,49	263,02	3793,98
Endosulfán-II	90,57	173,91	0	1210,90
Endosulfán-éter	87,03	192,78	0	1587,24
Endosulfán-lactona	366,64	361,13	327,14	2238,19
Endosulfán-diol	2281,78	2307,65	1574,12	12673,79
Endosulfán-sulfato	347,08	1000,13	100,45	7258,41
Σ Endosulfán	4029,55	3443,11	3017,13	21621,57

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

El compuesto detectado con mayor frecuencia es endosulfán-diol, con una presencia del 92%; este compuesto es a su vez el tercero en frecuencia entre los 18 plaguicidas analizados, además de ser el compuesto con mayor valor medio (15,39 ng/ml suero y 2.511,73 ng/g lípidos) de todos los compuestos analizados. Habría que destacar que la suma de los diferentes compuestos de endosulfán muestra un 100% de frecuencia en suero, con un valor medio de 25,76 ng/ml suero o su equivalente 4029,55 ng/g lípido.

Exposición a DDT, isómeros y metabolitos

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función de la concentración de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT y sus metabolitos en suero sanguíneo.

Residuo >LC

Compuesto	n	%
<i>o,p'</i> -DDT	43	19,2
<i>p,p'</i> -DDT	129	57,6
<i>o,p'</i> -DDD	147	65,60
<i>p,p'</i> -DDE	215	96,00
Σ DDT	222	99,10

n=224; LC: límite de cuantificación

En las tablas siguientes se muestran las medidas de tendencia central de la concentración de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT y sus metabolitos en las muestras de suero, considerando sólo aquellos valores por encima del LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g lípido.

Concentración (ng/ml) (excluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>o,p'</i> -DDT	0,71	0,70	0,50	0,38	6,26
<i>p,p'</i> -DDT	3,64	4,91	1,85	0,37	40,96
<i>o,p'</i> -DDD	3,24	4,14	2,06	0,43	36,58
<i>p,p'</i> -DDE	5,18	4,07	4,15	0,25	25,88
Σ DDT	12,77	8,55	10,77	1,36	52,34

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (excluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>o,p'</i> -DDT	192,33	81,94	186,07	66,64	381,31
<i>p,p'</i> -DDT	925,87	818,05	769,70	69,40	6524,27
<i>o,p'</i> -DDD	660,09	512,59	511,35	92,06	3236,74
<i>p,p'</i> -DDE	817,05	668,54	612,99	49,93	5237,08
Σ DDT	1925,07	1184,79	1647,53	231,09	7642,44

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

En las tablas siguientes se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT y sus metabolitos en suero, considerando la totalidad de las muestras y asignando el valor de cero a las concentraciones con valores inferiores al LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

Concentración (ng/ml) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
<i>o,p'</i> -DDT	0,31	0,83	0	6,26
<i>p,p'</i> -DDT	3,41	5,04	1,85	40,96
<i>o,p'</i> -DDD	3,07	4,25	2,06	36,58
<i>p,p'</i> -DDE	5,17	4,08	4,15	25,88
Σ DDT	11,98	8,65	10,04	51,34

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
<i>o,p'</i> -DDT	36,57	83,51	0	381,31
<i>p,p'</i> -DDT	599,86	793,00	459,00	6524,27
<i>o,p'</i> -DDD	404,42	514,19	262,07	3236,74
<i>p,p'</i> -DDE	794,04	672,81	604,53	5237,08
Σ DDT	1889,09	1179,54	1619,54	7642,44

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

El plaguicida encontrado con mayor frecuencia entre todos los compuestos analizados es el *p,p'*-DDE, en un 96% de las muestras y con un valor medio de 5,18 ng/ml suero o 815,05 ng/g lípido, situándolo como el tercer plaguicida con mayor concentración en las muestras de suero de nuestro estudio. La sumatoria de los DDT muestra un porcentaje de presencia del 99,1%, con un valor medio de 12,77 ng/ml suero o su equivalente 1925,07 ng/g lípido.

Exposición a lindano, metoxicloro, mírex, hexaclorobenceno y vinclozolina

En la tabla siguiente se muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función a la cuantificación de lindano, metoxicloro, mírex, hexaclorobenceno y vinclozolina en suero sanguíneo.

Residuo >LC		
Compuesto	n	%
Lindano	145	64,70
Metoxicloro	136	60,70
Mírex	78	34,80
Hexaclorobenceno	179	79,9
Vinclozolina	214	95,5

n=224; LC: límite de cuantificación

Seguidamente se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de lindano, metoxicloro, mírex, hexaclorobenceno y vinclozolina en las muestras de suero, considerando sólo aquellos valores situados por encima del LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

Concentración (ng/ml) (excluidos <LC)					
Compuesto	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Lindano	1,84	2,27	1,19	0,37	17,72
Metoxicloro	2,84	5,09	1,47	0,50	53,80
Mírex	1,19	2,35	0,50	0,35	26,64
Hexaclorobenceno	3,88	4,50	2,31	0,37	30,29
Vinclozolina	9,79	7,38	8,80	0,50	43,74

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (excluidos <LC)

Compuesto	Media*	DE	Mediana*	Mínimo*	Máximo*
Lindano	348,90	376,17	238,90	66,09	2822,51
Metoxicloro	645,56	1189,52	352,90	84,10	10562,69
Mírex	369,77	669,21	236,24	98,48	5230,30
Hexaclorobenceno	639,90	594,72	416,68	74,40	4070,35
Vinclozolina	1630,74	979,02	1443,94	160,10	6423,01

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

En las tablas siguientes se muestran las medidas de tendencia central de la distribución de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de lindano, metoxicloro, mírex, hexaclorobenceno y vinclozolina en sangre, considerando la totalidad de las muestras y asignando el valor cero a las concentraciones por debajo del LC y expresando los resultados en ng/ml de suero y ng/g de lípido.

Concentración (ng/ml) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
Lindano	1,66	2,38	1,19	17,72
Metoxicloro	2,64	5,18	1,47	53,8
Mírex	0,86	2,45	0	26,64
Hexaclorobenceno	3,78	4,57	2,31	30,29
Vinclozolina	9,76	7,40	8,80	43,74

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

Concentración (ng/g lípido) (incluidos <LC)

Compuesto	Media	DE	Mediana	Máximo
Lindano	203,83	334,71	157,88	2822,51
Metoxicloro	386,43	971,50	201,37	10562,69
Mírex	148,43	459,30	0	5230,30
Hexaclorobenceno	504,71	589,20	322,52	4070,35
Vinclozolina	1550,35	1018,04	1407,07	6423,01

LC: límite de cuantificación; DE: desviación estándar

La vinclozolina es el compuesto más frecuentemente encontrado de este grupo de compuestos con un 95,50% de presencia en las muestras analizadas, ocupando el segundo lugar en presencia después de *p,p'*-DDE, además su valor medio de 9,79 ng/ml suero o en su equivalente 1.630,74 ng/g lípido lo sitúa en el segundo lugar en cuanto a valores de concentraciones medidos dentro del total de los 18 plaguicidas investigados.

4.6.3 Relación entre los diferentes residuos de plaguicidas detectados en suero

Se analizan a continuación, las correlaciones entre las diferentes concentraciones de los plaguicidas, expresadas en ng/ml de suero y ng/g de lípido, utilizando el test estadístico de correlación de Spearman. En las tablas se incluyen los valores de los diferentes coeficientes de correlación. En primer lugar se muestra la correlación existente entre los plaguicidas organoclorados aldrín, endrín y dieldrín, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlaciones de Spearman entre residuos

	Aldrín	Endrín	Dieldrín
Aldrín		0,061	0,098
Endrín			0,343**

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo y asociados al endosulfán I, endosulfán II, sus metabolitos y Σ Endosulfán, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	E-éter	E-lactona	E-diol	E-I	E-II	E-sulfato	Σ Endosulfán
Aldrín	-0,064	0,184**	0,376**	0,366**	0,217**	0,228**	0,430**
Endrín	0,065	-0,049	0,068	0,194**	0,198**	0,034	0,135**
Dieldrín	0,149*	0,059	0,111	0,185**	0,152*	0,072	0,173*

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo y asociados al *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Σ DDT
Aldrín	0,325	0,305**	0,080	-0,066	0,290**
Endrín	0,362**	0,239**	-0,069	-0,052	0,003**
Dieldrín	0,303**	-0,187**	0,050	0,128	0,151*

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo y asociados al lindano, vinclozolina, metoxicloro, mírex y hexaclorobenceno, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
Aldrín	0,030	0,404**	0,232**	0,103	0,022
Endrín	0,390**	0,098	-0,110	0,277**	0,029
Dieldrín	0,176**	0,062	-0,074	0,218**	0,019

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/g lípidos (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	Aldrín	Endrín	Dieldrín
Aldrín		0,546**	0,446**
Endrín			0,695**

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo y asociados a endosulfán I, endosulfán II, sus metabolitos y Σ endosulfán, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	E-éter	E-lactona	E-diol	E-I	E-II	E-sulfato	Σ Endosulfán
Aldrín	0,383**	0,416**	0,532**	0,551**	0,518**	0,423**	0,567**
Endrín	0,562**	0,381**	0,082	0,603**	0,600**	0,459**	0,231*
Dieldrín	0,445**	0,372**	0,316**	0,373**	0,490**	0,454**	0,261**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo y asociados al *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT expresando los resultados en ng/g lípidos (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Σ DDT
Aldrín	0,578**	0,571**	0,291	0,127	0,420**
Endrín	0,565**	0,524**	0,341	0,280	0,518**
Dieldrín	0,547**	0,445**	0,088	0,272	0,399**

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de aldrín, dieldrín y endrín detectados en el suero sanguíneo y asociados al lindano, vinclozolina, metoxicloro, mírex y hexaclorobenceno, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
Aldrín	0,474**	0,397**	0,063	0,263*	0,594**

Endrín	0,548**	0,368**	-0,012	0,619**	0,319
Dieldrín	0,374**	0,123	0,141	0,407**	0,464*

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y Σ endosulfán detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	E-éter	E-lactona	E-diol	E- I	E- II	E-sulfato	Σ Endosulfato
E-éter		0,105	0,011	0,086	0,090	0,145	0,095
E-lactona			0,133	0,223**	-0,045	0,111	0,280**
E-diol				0,378**	0,071	0,302**	0,936**
E- I					0,116	0,122	0,478**
E- II						0,017	0,109
E-sulfato							0,366**

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y Σ endosulfán detectados en el suero sanguíneo y asociados al *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Σ DDT
E-éter	0,053	-0,032	0,011	0,029	0,014
E-lactona	0,078	0,049	0,062	0,078	0,107
E-diol	0,304**	0,273**	-0,070	-0,187**	0,247**
E- I	0,361**	0,151*	0,203**	0,072	0,322**
E- II	0,274**	0,041	-0,109	0,095	0,199**

E- sulfato	0,147*	0,171*	0,050	-0,477**	-0,046
Σ Endos	0,337**	0,296**	-0,077	-0,204**	0,276**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y Σ endosulfán detectados en el suero sanguíneo y asociados al lindano, vinclozolina, metoxicloro, mírex y hexaclorobenceno, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
E-éter	0,099	0,041	0,032	0,024	0,098
E-lactona	-0,119	0,056	0,084	0,036	0,185**
E-diol	0,107	0,380**	0,176**	-0,052	0,090
E- I	0,063	0,194**	0,204**	0,216**	0,191**
E- II	0,122	0,238**	0,041	0,186**	0,066
E- sulfato	-0,168**	0,151*	0,054	0,105	0,164*
Σ Endosulfán	0,145*	0,402**	0,179**	0,018	0,145*

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y Σ endosulfán detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	E-éter	E-lactona	E-diol	E- I	E- II	E- sulfato	Σ Endosulfán
E-éter	0,073	0,182	0,393**	0,548**	0,545**	0,278*	
E-lactona		0,192*	0,400**	0,213	0,160	0,361**	
E-diol			0,509**	0,180	0,399**	0,959**	
E-I				0,436**	0,515**	0,618**	

E-II	0,546**	0,322*
E- sulfato		0,497**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y Σ endosulfán detectados en el suero sanguíneo y asociados al *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Σ DDT
E-éter	0,304*	0,263	-0,046	0,016	0,245
E-lactona	0,536**	0,389**	0,435*	0,231*	0,363**
E-diol	0,413**	0,407**	-0,283	0,324**	0,335**
E- I	0,619**	0,463**	0,466**	0,411**	0,452**
E- II	0,563**	0,396*	0,073	0,496**	0,420**
E- sulfato	0,558**	0,352*	-0,014	0,264	0,439**
Σ Endos	0,501**	0,472**	-0,229	0,209*	0,335**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y Σ endosulfán detectados en el suero sanguíneo y asociados al lindano, vinclozolina, metoxicloro, mírex y hexaclorobenceno, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
E-éter	0,447**	0,556**	0,380**	0,372*	0,217
E-lactona	0,336**	0,292*	0,225*	0,289*	0,355**
E-diol	0,295**	0,395**	-0,015	-0,038	0,374**

E-I	0,299**	0,417**	0,064	0,352**	0,543**
E-II	0,363*	0,484**	0,193	0,699**	0,519*
E- sulfato	0,439**	0,482**	0,265*	0,454**	0,608**
Σ Endos	0,280**	0,405**	0,070	0,114	0,353**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Σ DDT
<i>p,p'</i> -DDE		0,186**	0,095	0,111	0,729**
<i>o,p'</i> -DDD			0,109	-0,164*	0,506**
<i>o,p'</i> -DDT				0,128	0,227**
<i>p,p'</i> -DDT					-0,204**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT detectados en el suero sanguíneo y asociados al lindano, vinclozolina, metoxicloro, mírex y hexaclorobenceno, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
<i>p,p'</i> -DDE	0,303**	0,366**	0,143*	0,356**	0,091
<i>o,p'</i> -DDD	0,197**	0,251**	0,195**	0,084	0,084
<i>o,p'</i> -DDT	0,040	0,116	0,108	0,146*	0,088
<i>p,p'</i> -DDT	0,098	0,027	0,054	0,008	0,070
Σ DDT	0,377**	0,334**	0,208**	0,302**	0,149*

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Σ DDT
<i>p,p'</i> -DDE		0,535**	0,234	0,484**	0,671**
<i>o,p'</i> -DDD			0,416	0,138	0,637**
<i>o,p'</i> -DDT				0,551**	0,605**
<i>p,p'</i> -DDT					0,800**

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, sus metabolitos y Σ DDT detectados en el suero sanguíneo y asociados a lindano, vinclozolina, metoxicloro, mírex y hexaclorobenceno, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
<i>p,p'</i> -DDE	0,349**	0,472**	0,190*	0,454**	0,451**
<i>o,p'</i> -DDD	0,504**	0,380**	0,172	0,298*	0,442**
<i>o,p'</i> -DDT	0,410*	0,527*	0,227	0,606**	0,522
<i>p,p'</i> -DDT	0,361**	0,406**	0,142	0,299*	0,328*
Σ DDT	0,379**	0,469**	0,157	0,381**	0,394**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de hexaclorobenceno, lindano, vinclozolina, metoxicloro y mírex detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/ml suero (n=224).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
HCB		0,304**	-0,013	0,264**	-0,002
Lindano			0,257**	0,093	0,022
Vinclozolina				-0,100	0,112
Metoxicloro					0,180**

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la tabla siguiente se muestra la relación existente entre los niveles de hexaclorobenceno, lindano, vinclozolina, metoxicloro y mirex detectados en el suero sanguíneo, expresando los resultados en ng/g lípido (n=147).

Correlación de Spearman entre residuos

	HCB	Lindano	Vinclozolina	Metoxicloro	Mírex
HCB		0,568**	0,058	0,357**	0,328*
Lindano			0,203*	0,288*	0,431**
Vinclozolina				0,181	0,022
Metoxicloro					0,637**

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En resumen, el análisis de los resultados demuestra que existe una asociación significativa entre los plaguicidas y sus metabolitos, y entre algunos plaguicidas entre sí. Estas asociaciones son más frecuentes cuando se comparan las concentraciones medias expresadas en ng de plaguicida por gramo de lípido del suero. De esta manera es posible observar como existe una relación significativa entre el aldrín, el endrín y dieldrín ($p < 0,01$).

En lo que respecta a la familia de los endosulfanes encontramos que en el caso del endosulfán α , denominado en este trabajo como endosulfán I, hay de nuevo una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el endosulfán II, los restantes metabolitos y la sumatorias de los endosulfanes; en el caso del endosulfán β , denominado en esta trabajo como endosulfán II, hay relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con: endosulfán I, endosulfán éter y endosulfán sulfato, y una relación significativa ($p < 0,05$) con la sumatoria de los endosulfanes, de tal manera que los jóvenes expuestos al endosulfán I, también lo están a sus metabolitos.

En el caso de el DDT y sus metabolitos, encontramos una relación significativa ($p < 0,01$) entre el *p,p'*-DDE y *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDT y la sumatoria de los metabolitos de esta familia. El *o,p'*-DDD, a su vez, se muestra una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el *p,p'*-DDE y la suma de los metabolitos; el *p,p'*-DDT tiene una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT y la sumatoria de los metabolitos; por último el *o,p'*-

DDT muestra una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el p,p' -DDT y la sumatoria de DDTs.

El hexaclorobenceno, denominado en esta trabajo como HCB, tiene una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el lindano, metoxicloro y una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con el mírex.

Por último, el lindano a su vez muestra una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el HCB y mírex, metoxicloro y vinclozolina.

4.7. ANÁLISIS BIVARIANTE DE LAS VARIABLES INDICADORAS DE CALIDAD SEMINAL, CON DETERMINANTES CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS

Se presentan en este apartado los resultados del análisis bivalente efectuado entre las variables indicadoras de calidad seminal. Como indicadores de calidad seminal se han seleccionado:

- i) Número total de espermatozoides (NTE),
- ii) Número total de espermatozoides móviles (NTEM),
- iii) Porcentaje de espermatozoides normales (PEN),
- iv) Porcentaje de espermatozoides anormales (PEA),
- v) Porcentaje de cabezas anormales (PCA),
- vi) Porcentaje de restos citoplasmáticos (PRC),
- vii) Porcentaje de flagelos anormales (PFA),
- viii) Índice de teratozoospermia (IT),
- ix) Perfil hormonal sérico (testosterona, SHBG, LH, FSH e inhibina B).
Perfil hormonal sérico (testosterona, SHBG, LH, FSH e inhibina B).

Aunque se ha efectuado un análisis bivalente exhaustivo entre las variables de calidad seminal y las variables sociodemográficas, de estilo de vida y de examen clínico, que incluyen la mayoría de los determinantes de interés, sólo se presentan a continuación los resultados que por su plausibilidad biológica o por la información disponible en la literatura suponen un mayor interés para la consecución de los objetivos de este trabajo.

4.7.1 Análisis bivariante para el número total de espermatozoides (NTE) y sus determinantes

El NTE no presentó una distribución normal ni en su forma cruda, ni en alguna de sus posibles transformaciones, no obstante se ha optado por su transformación logarítmica, por lo que se presentan los datos geométricos en el análisis de asociación bivariante, con los principales determinantes socioeconómicos, de estilo de vida y clínicos. Debido a que la variable no presentó una distribución normal, para analizar estas asociaciones, se utilizaron pruebas no paramétricas y de acuerdo a la distribución de sus determinantes se realizaron pruebas robustas como la correlación de Spearman en variables continuas y la prueba de rangos de Kruskal-Wallis, y la U Mann-Whitney de acuerdo a cada tipo y distribución de la variable.

4.7.1.1 Número total de espermatozoides (NTE) y características de los jóvenes

Edad

Aunque el rango de edad de la población de estudio no es muy amplio (18-23 años), se observó un incremento marginalmente significativo entre el NTE y la edad, con un incremento 1,07 millones por cada año de incremento de la edad ($p=0,093$).

Número total de espermatozoides y edad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Edad	273	1,07	1,04	0,093	-1,01 1,16

EE: error estándar

Índice de masa corporal (IMC)

En el caso del índice de masa corporal (media = 23,9 kg/m²), se encontró una reducción cercana a la significación marginal de 1,04 millones por cada unidad de incremento en el IMC ($p=0,140$).

Número total de espermatozoides e IMC

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
----------	---	---------	----	---	--------

IMC	263	-1,04	1,03	0,140	-1,10	1,01
-----	-----	-------	------	-------	-------	------

EE: error estándar

Cuando el IMC se subdividió en categorías <25 , ≥ 25 a <30 y ≥ 30 kg/m^2 , no se observaron asociaciones estadísticamente significativas ni en el análisis por categorías, ni cuando se introdujeron todas ellas tomando como referencia la primera categoría, como puede verse en las tablas siguientes.

Número total de espermatozoides e IMC (kg/m^2)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<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

EE: error estándar

Número total de espermatozoides e IMC

Variable	β	EE	p	IC 95%	
≥ 25 a <30	-1,18	1,21	0,399	-1,71	1,24
≥ 30	-1,14	1,62	0,793	-2,94	2,28
Cte.	124,20	1,10	0,000	3,0	1,0

EE: error estándar

Salud general

Al analizar las respuestas de los jóvenes sobre su salud, se observó una reducción en el NTE cercana a la significancia marginal.

Número total espermatozoides y estado de salud

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Salud general	252	-1,29	1,17	0,109	-1,76	1,06

EE: error estándar

Cuando la variable se reclasificó atendiendo al estado de salud referido por los jóvenes, de forma dicotómica, se observó para los que describieron gozar de una salud muy buena un incremento de 1,30 millones de espermatozoides, cercano a la significación estadística marginal $p=(0,116)$. Aquellos que refirieron tener una salud

buena presentaron una reducción de 1,29 millones de espermatozoides, pero con una significación estadística ligeramente menor ($p=0,109$). Aquellos que refirieron tener una mala salud presentaron una reducción de 1,30 millones, aunque esta claramente no fue estadísticamente significativa. Hay que destacar que esta categoría sólo estuvo formada por 4 individuos.

Número total de espermatozoides y estado de salud

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
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

EE: error estándar

Al introducir las tres categorías juntas utilizando como referencia la categoría estado de salud muy bueno, aquéllos que refirieron tener una buena salud presentaron una reducción de 1,29 millones de espermatozoides, cercana a la significación estadística marginal. Los que refirieron un estado de salud malo, presentaron la misma reducción que la anterior, tampoco fue estadísticamente significativa.

Número total de espermatozoides y estado de salud

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Buena	164	-1,29	1,17	0,109	-1,76 1,06
Mala	4	-1,30	1,18	0,116	-1,81 1,07
Cte.	90	147,25	1,14	0,000	112,86 192,14

EE: error estándar

Cuando los jóvenes refirieron estar enfermos o haber tenido alguna enfermedad crónica a lo largo de la vida, la tendencia fue hacia la reducción de 1,25 millones en el número total de espermatozoides ($p=0,488$).

Número total de espermatozoides y enfermedad

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%
Crónica	17	-1,25	1,38	0,488	-2,37 1,51

EE: error estándar

Consumo de medicamentos en los últimos tres meses

De los 89 individuos que declararon haber consumido algún tipo de medicamento, sólo un individuo declaró haber sido tratado con antivirales, con hormonas o con antitumorales durante los tres últimos meses.

Número total de espermatozoides y uso de medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Medicamentos	89	-1,15	1,18	0,409	-1,60	1,21

EE: error estándar, n=253

Exceptuando a los antivirales, todos se asociaron a reducciones no significativas, Los antivirales, presentaron una reducción significativamente de 31,4 millones de espermatozoides ($p = 0,006$), con un IC de 95% de -372,2 a -2,65.

Número total de espermatozoides y uso de medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Antivirales	1	-31,43	3,51	0,006	-372,18	-2,65

EE: error estándar, n=253

Para el uso de antibióticos la reducción se acercó a la significación marginal de 1,50 millones de espermatozoides, ($p=0,170$).

Número total de espermatozoides y uso de medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Antibióticos	15	-1,50	1,34	0,170	-2,68	1,19

EE: error estándar, n=253

El uso de hormonas, presentó un incremento, tampoco estadísticamente significativo de 3,07 millones de espermatozoides, ($p=0,378$).

Número total de espermatozoides y uso de medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Hormonas	1	3,07	3,57	0,378	-3,98 37,60

EE: error estándar, n=253

En cuanto al uso de tratamiento antitumoral, este supuso una reducción no significativa de 1,27 millones de espermatozoides, (p=0,853).

Número total de espermatozoides y uso de medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Antitumorales	1	-1,27	3,57	0,853	-15,56 9,70

EE: error estándar, n=253

Por último, en cuanto al tratamiento con calmantes, hubo un incremento no estadísticamente significativo de 1,24 millones (p=0,868) en el recuento espermático total.

Número total de espermatozoides y uso de medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Calmantes	1	1,24	3,57	0,868	-9,94 15,18

EE: error estándar, n=253

Consumo de tabaco

Como se ha descrito anteriormente, 86 de los 253 jóvenes (33%) que contestaron la encuesta, declararon ser fumadores. Este grupo particular de individuos presenta un NTE menor (en 1,30 millones) que el grupo de los no fumadores y esta relación fue cercana a la significación estadística marginal (p=0,122).

Número total de espermatozoides y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Fumador	86	-1,30	1,19	0,122	-1,82 1,07

EE: error estándar, n=253

Si el hábito tabáquico se considera de forma cuantitativa teniendo en cuenta el número de cigarrillos por día (media=7,8), el número total de espermatozoides se reduce

en 1,03 millones por cada cigarrillo declarado, esta presentó una significación estadística marginal ($p=0,057$).

Número total de espermatozoides y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Cigarros/día	86	-1,03	1,02	0,057	-1,07 1,00

EE: error estándar, n=253

También se consideró el número de años que los jóvenes llevaban fumando. Hay que hacer notar que no todos los jóvenes participantes que fumaban indicaron el número de años con este hábito, además algunos que ya lo habían dejado también se incluyeron en este grupo.

Número total de espermatozoides y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Años fumando	109	-1,07	1,04	0,092	-1,15 1,01

EE: error estándar, n=253

Si el hábito tabáquico se considera de forma cuantitativa, teniendo en cuenta el número de años fumando, el número total de espermatozoides se reduce en 1,07 millones por cada año con este hábito, con una significatividad estadística marginal ($p=0,092$).

Consumo de *Cannabis*

En cuanto al consumo de *Cannabis* referido por 56 individuos (21,7%), también se asoció a una reducción de 1,37 millones de espermatozoides, con una significación de $p=0,037$.

Número total de espermatozoides y *Cannabis*

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Hachis	56	-1,37	1,06	0,037	-2,00 -1,06

EE: error estándar, n=253

Consumo de alcohol

Cuando los jóvenes informaron positivamente sobre su consumo de alcohol (68,66%), se observó un decremento de 1,08 millones de espermatozoides con respecto a los no bebedores, pero este no fue significativo ($p=0,669$).

Número total de espermatozoides y alcohol

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Alcohol	177	-1,08	1,19	0,669	-1,51	1,31

EE: error estándar, n=253

Nivel de estudios

El grado de escolaridad clasificado según tuvieran estudios primarios, secundarios o universitarios (3,9; 6,6; 89,5% respectivamente), presentó una asociación positiva de 1,59 millones estadísticamente significativa por cada unidad de aumento en esta secuencia ($p=0,009$).

Número total de espermatozoides y nivel de estudios

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Estudios	258	1,59	1,19	0,009	1,12	2,24

EE: error estándar

Cuando se analiza el NTE por categorías, se observó una fuerte asociación estadísticamente significativa con una reducción de más de 3,2 millones ($p=0,004$), en el caso de los jóvenes con estudios primarios y un incremento de 1,68 millones ($p=0,044$) en el caso de los universitarios.

Número total de espermatozoides y nivel de estudios

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

EE: error estándar, n=258

Al introducir todas las variables juntas tomando como referencia a los universitarios, la reducción fue ligeramente mayor para los jóvenes con sólo estudios primarios, y una reducción de 1,14 millones para los jóvenes con estudios secundarios, aunque en este caso no se alcanza la significación estadística. Se debe notar que sólo hubo 10 sujetos en el nivel de estudios primarios y 17 de secundaria frente a 231 universitarios.

Número total de espermatozoides y nivel de estudios

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Primarios	-3,257862	1,4989	0,004	-7,229753	-1,468054
Secundarios	-1,137877	1,370265	0,682	-2,116103	1,634355
Cte.	131,1087	1,087074	0,000	111,229	154,5417

EE: error estándar

Actividad laboral

El trabajo de los jóvenes mostró una asociación negativa con el número total de espermatozoides, con un decremento cercano a la significatividad marginal de 1,20 millones de espermatozoides con una $p=0,135$. Si además se incluye el horario de trabajo (diurno, nocturno) los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Número total de espermatozoides y trabajo

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Diurno	31	-1,42	1,28	0,160	-2,33	1,15
Nocturno	11	-1,17	1,48	0,686	-2,54	1,85
No trabaja	216	1,37	1,24	0,146	-1,12	2,11

EE: error estándar, n=258

Al analizar las categorías mostradas en la tabla anterior se observa que las personas con trabajo diurno tuvieron una reducción de 1,42 millones de espermatozoides ($p=0,16$), con respecto a los jóvenes que no trabajan o desempeñan un trabajo nocturno. Al introducir todas las variables juntas tomando como referencia a los que no trabajan, de nuevo el trabajo diurno presentó una reducción de 1,44 millones con un valor de p próximo a la significancia marginal, $p=0,151$, y de 1,22 millones en el caso de los jóvenes que tenían un trabajo nocturno.

Número total de espermatozoides y trabajo

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Diurno	-1,44	1,29	0,151	-2,36	1,14
Nocturno	-1,22	1,48	0,607	-2,65	1,77
Cte	130,44	1,09	0,000	109,88	154,85

EE: error estándar, n=258

Lugar de residencia

En referencia al tipo de residencia que tenían los participantes, considerando rural y urbano, se observa una reducción significativa del NTE en 1,25 millones ($p=0,321$) cuando los sujetos viven en áreas más pobladas cuando se comparan con los que residen en áreas rurales en el momento de la entrevista, circunstancia que se dio en el 80% de los casos.

Número total de espermatozoides y lugar de residencia

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Área urbana	220	-1,25	1,25	0,321	-1,94 1,24

EE: error estándar, n=253

Características de los padres

En referencia al lugar de residencia que tenían los padres durante el embarazo, considerándolo rural o urbano, se observó una reducción significativa del NTE en 1,48 millones de espermatozoides ($p=0,050$) cuando la madre vivió en áreas más pobladas, circunstancia que se dio en el 80% de los casos.

Número total de espermatozoides y residencia materna

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Residencia urbana	207	-1,48	1,22	0,050	-2,18 -1,00

EE: error estándar, n=252

Si se considera el lugar de nacimiento de la madre también clasificado de la misma forma que la variable anterior -rural/urbano-, esta variable presenta una reducción no significativa de 1,00 millones ($p=0,216$) en el número total de espermatozoides de igual manera que veíamos anteriormente.

Número total de espermatozoides y nacimiento materno

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Área Urbana	182	-1,00	1,19	0,995	-1,42 1,41

EE: error estándar, n=252

El lugar de nacimiento del padre también presentó una reducción no significativa de 1,00 millones ($p=0,148$) en el número de espermatozoides, de la misma forma que el trabajo materno.

Número total de espermatozoides y nacimiento paterno

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Área Urbana	189	-1,00	1,00	0,148	-1,00	1,00

EE: error estándar, n=252

En cuanto al trabajo de la madre durante la gestación del joven, declarado por 59 participantes, no se asoció con el NTE.

Número total de espermatozoides y trabajo

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Trabajo madre	59	-1,07	1,11	0,523	-1,32	1,15

EE: error estándar, n=253

Dada la conveniencia de ajustar de acuerdo al tipo de trabajo, por la plausibilidad en su asociación con calidad seminal, tampoco se encontró ninguna asociación, ni en el trabajo agrícola ni en el trabajo intelectual.

Número total de espermatozoides y trabajo

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Ninguno	198	1,05	1,22	0,800	-1,40	1,55
Intelectual	13	-1,02	1,46	0,953	-2,14	2,05
Manual	34	-1,12	1,27	0,638	-1,78	1,43
Agrícola	8	1,19	1,58	0,698	-2,06	2,94

EE: error estándar, n=253

Al introducir todos los tipos de trabajo de manera conjunta, y tomando como referencia el trabajar en el hogar (“Ninguno”), tampoco se observó tendencia alguna, aunque al igual que en el apartado anterior, el trabajo manual fue el más significativo.

Número total de espermatozoides y trabajo materno

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Intelectual	-1,031907	1,460988	0,934	-2,177332	2,044764
Manual	-1,113578	1,270894	0,654	-1,785548	1,439894
Agrícola	1,175064	1,583907	0,726	-2,105334	2,906995
Cte.	125,3247	1,094623	0,000	104,8822	149,7516

EE: error estándar, n=253

Por otra parte, quince jóvenes declararon que sus madres eran fumadoras durante el embarazo, pero no se observaron diferencias significativas entre hijos de madres fumadoras y no fumadoras durante la gestación del joven.

Número total de espermatozoides y hábito tabáquico

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Fuma la madre	15	-1,16	1,15	0,296	-1,51	1,14

EE: error estándar, n=253

4.7.1.2 Número total de espermatozoides (NTE) y exploración andrológica

Presencia o ausencia de cicatriz quirúrgica

La presencia de cicatriz en el área inguinal o genital observada en 15 individuos se asoció con una reducción no significativa de 1,37 millones ($p=0,376$) en el número de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y presencia de cicatriz

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Cicatriz	15	-1,37	1,43	0,376	-2,76	1,47

EE: error estándar, n=262

Tamaño y Disposición de los testículos

Respecto al tamaño y posición de los testículos, ambas variables mostraron asociaciones y mediciones muy semejantes con un 94% y un 91% de ubicaciones normales para testículo derecho e izquierdo, respectivamente, con un tamaño medio de

18,5 ml. El tamaño de ambos testículos estuvo asociado con un incremento de 1,05 millones por cada ml de aumento, en forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Número total de espermatozoides y tamaño de testículos (ml)

Variable	n	β	EE	p	IC95%	
Testículo izquierdo	261	1,05	1,02	0,005	1,02	1,09
Testículo derecho	259	1,05	1,02	0,009	1,01	1,09

EE: error estándar

Cuando el tamaño testicular se reclasificó según el valor de la mediana de nuestra población de estudio, es decir en menor y mayor o igual a 12 ml, el incremento fue de más de 1,5 millones, con una significación semejante a la anterior ($p < 0,015$).

Número total de espermatozoides y tamaño de testículos (ml)

Variable	n	β	EE	p	IC95%	
Testículo izquierdo <12	8	-4,74	1,60	0,001	-11,99	-1,87
Testículo derecho <12	7	-1,58	1,74	0,407	-4,71	1,88

EE: error estándar

Cuando uno de los dos testículos se encontró fuera del escroto hubo una tendencia a la reducción en el número total de espermatozoides mayor si ambos se disponían fuera de su posición normal, pero en ningún caso se alcanzó la significación estadística.

Número total de espermatozoides y disposición de los testículos

Variable	n	β	EE	p	IC95%	
Uno fuera del escroto	33	-1,16	1,28	0,544	-1,90	1,40
Ambos fuera del escroto	8	-1,47	1,46	0,304	-3,08	1,42

EE: error estándar

Consistencia de los testículos

En referencia a la consistencia de los testículos, observada normal en el 98% de los individuos del estudio durante la exploración física, no se encontró asociación significativa con número total de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y consistencia de los testículos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Consistencia	6	1,03	2,18	0,974	-4,54	4,78

EE: error estándar, n=247

Epidídimo

La presencia de quistes en el epidídimo se asoció con una reducción estadísticamente significativa en casi 3 millones ($p=0,022$) del número de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y quistes en epidídimo

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Quistes	8	-2,98	1,6	0,022	-7,60	-1,17

EE: error estándar; n=261

Vasos deferentes, Varicocele e Hidrocele

La no apreciación clara a la palpación, de los vasos deferentes (9,1%), ni la presencia de varicocele (10,2%), ni la presencia de hidrocele (0,7%) se asociaron de manera significativa con el número total de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y características de la exploración

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Vasos deferentes	24	1,24	1,30	0,460	-1,35	2,07
Varicocele	27	-1,01	1,31	0,941	-1,67	1,73
Hidrocele	2	3,41	2,56	0,192	-1,86	21,64

EE: error estándar; n=261

4.7.1.3 Número total de espermatozoides (NTE) y otras características seminales

A continuación se muestran los resultados del análisis bivariante para NTE y los parámetros del análisis seminal de mayor interés. Se han excluido en este estudio aquellas variables que forman parte de la propia estimación de NTE, es decir la concentración de espermatozoides y el volumen del eyaculado.

Estación del año

El análisis seminal se llevó a cabo en un total de 273 muestras correspondientes a otros tantos individuos que fueron citados para exploración y donación de semen de forma reglada durante los doce meses de un año natural. La estación de recogida de la muestra, significó un incremento significativo de 1,20 millones por unidad de cambio de estación de primavera a invierno ($p=0,015$).

Número total de espermatozoides y estación de año

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Estación	273	1,20	1,08	0,015	1,04	1,40

EE: error estándar

Sin embargo, cuando se analiza la estación del año como variable dicotómica, en algunos casos hubo incrementos de 1,12, y 1,47, millones de espermatozoides para las estaciones de otoño e invierno, respectivamente. Sin embargo para la primavera y para el verano hubo reducciones de 1,72 y 1,18 millones, respectivamente, en el número de espermatozoides que fue estadísticamente significativo sólo para el caso de la primavera ($p<0,048$), como puede verse en la tabla siguiente.

Número total de espermatozoides y estación del año

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

EE: error estándar

Cuando incluimos las cuatro estaciones juntas tomando como referencia al invierno, nuevamente, la estación de primavera presenta una reducción de 1,97 millones, con una significación estadística superior a la anterior, mientras que las estaciones de verano y otoño presentaron una reducción de 1,61 y 1,30 millones, respectivamente.

Número total de espermatozoides y estación del año

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Primavera	-1,97	1,22	0,020	-2,92	-1,10
Verano	-1,61	1,42	0,174	-3,19	-1,24
Otoño	-1,30	1,25	0,248	-2,03	1,20
Cte.	161,74	1,22	0,000	110,24	237,31

EE: error estándar

Tiempo de abstinencia

La abstinencia medida en horas y clasificada en forma dicotómica [<48 horas o ≥ 48 horas], presentó incrementos estadísticamente significativos de 1,01 y 2,11 millones, respectivamente, en ambos casos ($p < 0,001$), de tal manera que un mayor tiempo de abstinencia declarado se corresponde un mayor número total de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y abstinencia

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Abstinencia	273	1,01	1,00	0,000	1,71	1,01

EE: error estándar

Número total de espermatozoides y abstinencia

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
≥ 48 horas	254	2,11	1,19	0,000	1,51	2,95

EE: error estándar; Abstinencia: <48 horas/ ≥ 48 horas, n=272

Acidez-alcalinidad de la muestra seminal (pH)

En 42 muestras seminales se advirtió un pH inferior a 7,2, en las que se observó una relación inversa de -3,02 millones de espermatozoides, estadísticamente significativa, por cada unidad de diferencia de pH. Esta tendencia se mantiene al reclasificar la variable pH, por encima y por debajo de 7,2, siendo de más de 1,40 millones para un pH menor a 7,2. Es decir la acidez en la muestra seminal parece ser inadecuada para la viabilidad de los espermatozoides.

Número total de espermatozoides y pH

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
pH	273	-3,02	1,32	0,000	-5,18	-1,76

EE: error estándar

Número total de espermatozoides y pH

Variable	n	β	DE	p	IC 95%	
pH $\geq 7,2$	231	-1,40	1,25	0,131	-1,11	2,17

EE: error estándar; pH: n=41<7,2/n=231 \geq 7,2, n=272

Licuación, viscosidad, células redondas y aglomeración

La licuación incompleta de la muestra (6,2% de los casos) supuso una reducción no significativa de más de 1,4 millones espermatozoides.

Número total de espermatozoides y licuefacción

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Incompleta	17	-1,42	1,39	0,290	-2,74	1,35

EE: error estándar, n=272

La elevada viscosidad de la muestra (19,4% de las muestras) mostró una reducción de 1,14 millones de espermatozoides, que aunque tampoco fue significativa, fue más próxima de la significación marginal que para el caso anterior.

Número total de espermatozoides y viscosidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Viscosidad	53	-1,14	1,09	0,140	-1,36	1,04

EE: error estándar, n=272

El número de células redondas se asoció significativamente con el recuento seminal.

Número total de espermatozoides y células redondas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Células redondas	162	1,08	1,02	0,001	1,03	1,13

EE: error estándar, n=272

Por último, las aglomeraciones mostraron una asociación semejante a la descrita anteriormente asociada con un aumento mayor del número de espermatozoides (1,33 millones, $p=0,004$).

Número total de espermatozoides y aglomeración

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Aglomeraciones	63	1,33	1,10	0,004	1,10	1,60

EE: error estándar, n=264

Movilidad espermática

En el análisis bivariante entre el NTE y las diversas características de movilidad de las células espermáticas se encontraron importantes asociaciones, que detallamos a continuación.

Las variables de la movilidad seminal tipo a, b y c, así como la movilidad progresiva a+b y la movilidad total (a+b+c) fueron transformadas a su logaritmo neperiano, aunque en general no se alcanzó una distribución normal. Las transformaciones se hicieron para reducir al máximo la dispersión, por un lado, y para fines comparativos entre esas variables, por otro. El cuadrado de la movilidad tipo d, o inmovilidad, presentó una distribución normal, por lo que se incluyó en esta forma en el análisis bivariante.

El NTE y su relación con la movilidad tipo a muestra un incremento estadísticamente significativo de 2 millones de espermatozoides ($p<0,001$).

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad a	272	1.95	1.10	0.000	1.63	2.33

EE: error estándar

Cuando la movilidad “tipo a” fue reclasificada por encima y por debajo del 25%, de acuerdo a los criterios de OMS (con 131 y 141 individuos, respectivamente), se observó una asociación estadísticamente significativa con el número total de espermatozoides con un incremento de 2,4 millones ($p<0,001$).

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad a	272	-2.43	1.16	0.000	-3.28	-1.80

EE: error estándar; movilidad a: en <25% y \geq 25%

Para el caso de la movilidad tipo b y c, en ambos casos no se observaron asociaciones significativas con el número total de espermatozoides, pero si una leve tendencia al incremento para el primer caso (movilidad b) y a la reducción en el segundo caso (movilidad c) en 1,24 y 1,2 millones ($p=0,213$ y $p=0,323$), respectivamente. Casi todos los tipos de movilidad estuvieron estadísticamente asociados con el número total de espermatozoides, aunque las tendencias sólo se acercaron a la significación marginal.

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad b	272	1.24	1.19	0.213	-1.13	1.74

EE: error estándar

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad c	272	-1.20	1.20	0.323	-1.71	1.19

EE: error estándar

La movilidad tipo d, o inmovilidad (42,6% de valor medio), mostró una reducción estadísticamente significativa de casi 3,3 millones en el número de espermatozoides, con un IC del 95% de -4,8 a -2,3.

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad d	272	-3.28	1.21	0.000	-4.76	-2.26

EE: error estándar

Para el caso de la progresión a+b (cuyo valor medio fue del 47,7%), el incremento fue de más de 3,5 millones de espermatozoides por cada unidad de aumento ($p < 0,001$).

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad a+b	272	3.51	1.17	0.000	2.56	4.81

EE: error estándar

La movilidad progresiva (a+b) reclasificada siguiendo igualmente los criterios OMS, en más y menos el 50% (con 134 y 139 individuos, respectivamente), se asoció de manera muy semejante a lo descrito para movilidad a reclasificada, con un aumento estadísticamente significativo de 2,36 millones de espermatozoides ($p < 0,001$).

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad a+b	272	-2.36	1.16	0.000	-3.19	-1.75

EE: error estándar; movilidad a+b: en $< 50\%$ y $\geq 50\%$

La movilidad también puede clasificarse, según se describe en el análisis descriptivo mediante la construcción de una variable binaria atendiendo al criterio de normalidad establecido por la OMS para los parámetros movilidad a y movilidad a+b.

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
a<25% y a+b<50%	134	-2,41	1,16	0,000	-3,29	-1,79

EE: error estándar; movilidad a+b: en $< 50\%$ y movilidad a: en $< 25\%$

Si consideramos la movilidad total (a+b+c), cuyo valor medio fue del 58,6%, y su relación con el NTE encontramos un aumento significativo de 5 millones por cada unidad de aumento, con un IC de 95% de 3,3 a 7,5 millones.

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad total	272	5.01	1.23	0.000	3.34	7.54

EE: error estándar

Cuando la movilidad total (a+b+c) fue reclasificada de acuerdo a los criterios OMS (50%), el número total de espermatozoides presentó una relación estadísticamente significativa semejante a las anteriormente descritas con una disminución para los de menos del 50%, de 3,24 millones de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y movilidad

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Movilidad total	272	-3,24	1,19	0,000	-3,16	-2,31

EE: error estándar; movilidad total: <50% y \geq 50%, n=272

Morfología espermática

El NTE también se relacionó con las variables de la morfología espermática. Así, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el número de espermatozoides y el porcentaje de formas normales (p=0,002) tanto de manera continua como reclasificando la variable por encima y por debajo del 5%.

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PEN	115	1,42	1,11	0,002	1,14	1,76

EE: error estándar; PEN: porcentaje de espermatozoides normales

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PEN\leq 4%	15	-3,52	1,45	0,001	-7,37	-1,68

EE: error estándar; PEN: porcentaje de espermatozoides normales \leq 4%

Por otra parte el porcentaje de espermatozoides anormales (PEA) también se asoció, pero de forma inversa, con el número total de espermatozoides (p=0,008).

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PEA	115	-2,18	1,34	0,008	-3,88	-1,23

EE: error estándar; PEA: porcentaje de espermatozoides anormales

En cuanto a la relación entre NTE y el porcentaje de cabezas anormales (PCA 92,3%) se observó una reducción mucho mayor, en el número de espermatozoides con una significación estadística de $p=0,04$.

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PCA	115	-29,59	5,10	0,040	-745,17	-1,18

EE: error estándar; PCA: porcentaje de cabezas anormales

No se observó ninguna asociación entre el NTE y el porcentaje de flagelos anormales (PFA, 7,2%), aunque si se aprecia cierta tendencia a la reducción.

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PFA	115	-1,14	1,20	0,474	-1,63	1,26

EE: error estándar; PCA: porcentaje de flagelos anormales

Por el contrario, el porcentaje de restos citoplasmáticos (PRC, 3,4%) si se asoció directamente con NTE, con un incremento significativo de 1,48 millones ($p=0,014$) en el número de espermatozoides.

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PRC	115	1,48	1,17	0,014	1,08	2,01

EE: error estándar; PRC: porcentaje de restos citoplasmáticos

El porcentaje de piezas intermedias anormales (PIA) presentó una distribución normal, y no mostró asociación estadísticamente significativa con el NTE.

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
PIA	115	1,01	1,02	0,54	-1,02	1,04

EE: error estándar; PIA: porcentaje de piezas intermedias anormales

Por último, tampoco se observó relación alguna entre NTE y el índice de teratozospermia (IT) (1,3%), aunque hubo cierta tendencia, no significativa, a la reducción de 3,17 millones ($p=0,572$).

Número total de espermatozoides y morfología

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
IT	115	-3,17	7,66	0,572	-178,79	17,81

EE: error estándar; IT: índice de teratozospermia

4.7.1.4 Número total de espermatozoides (NTE) y determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre

Las variables referentes a los parámetros lipídicos fueron transformadas a su logaritmo neperiano para reducir la dispersión, aunque ninguna transformación lograba una distribución normal. Se muestran, por tanto, los datos geométricos. Todas las variables, excepto los lípidos de alta densidad (HDL), se asociaron con reducciones en el número de espermatozoides, y sólo colesterol y triglicéridos presentaron asociaciones con una significación marginal, que fue de cerca de 2,5 millones para colesterol y de 1,5 millones para triglicéridos, con $p=0,08$ y $p=0,109$, respectivamente.

Número total de espermatozoides y parámetros bioquímicos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Colesterol	147	-2,46	1,67	0,08	-6,78	1,12
Triglicéridos	147	-1,49	1,28	0,109	-2,45	1,09

EE: error estándar

En el caso de los lípidos de alta y baja densidad la asociación fue positiva para el primero de 1,07 millones y negativa para el segundo de más 1,5 millones, con $p=0,786$

y 0,233, por lo que no se alcanzó ninguna significación estadística para ninguna de estas dos variables.

Número total de espermatozoides y parámetros bioquímicos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

Respecto a las hormonas del eje reproductivo, la inhibina B y la FSH no demostraron una distribución normal con ninguna transformación, lo que si ocurrió para la LH y la testosterona. La SHBG presentó una distribución normal con la transformación a su raíz cuadrada. No obstante, para reducir la dispersión y tener datos comparables, utilizamos ambas transformaciones en el análisis bivalente.

Se observó un incremento significativo de 1,57 millones con la inhibina B, cuyo valor medio fue de 173,6 pg/ml ($p=0,038$).

Número total de espermatozoides y perfil hormonal

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Inhibina b	250	1,57	1,24	0,038	1,02	2,40

EE: error estándar

La SHBG (con un valor medio de 30,3 nmol/l) mostró un incremento no significativo de 1,12 millones ($p=0,338$), la transformación a su raíz cuadrada demostró una tendencia similar.

Número total de espermatozoides y perfil hormonal

Variable	n	β	EE	p	CI 95%	
SHBG	250	1,12	1,12	0,338	-1,12	1,41

EE: error estándar

La hormona folículo estimulante (FSH), con un valor medio de 3,1 UI/l, evidenció un decremento no significativo, pero cercano a la significación marginal de 1,23 millones de espermatozoides ($p=0,164$).

Número total de espermatozoides y perfil hormonal

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
FSH	250	-1,23	1,16	0,164	-1,65 1,09

EE: error estándar

La hormona luteinizante (LH) con un valor medio de 4,1 UI/l, presentó un decremento, aunque no significativo, de 1,14 millones, ($p=0,455$).

Número total de espermatozoides y perfil hormonal

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
LH	250	-1,14	1,18	0,455	-1,58 1,23

EE: error estándar

Por último, la testosterona que presentó un valor medio de 24,9 nmol/l, también mostró una tendencia hacia la reducción, de 1,13 millones, pero esta no fue estadísticamente significativa, $p=0,476$.

Número total de espermatozoides y perfil hormonal

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
Testosterona	250	-1,13	1,19	0,476	-1,58 1,24

EE: error estándar

4.7.1.5 Número total de espermatozoides (NTE) y exposición a plaguicidas

Los datos de exposición de los jóvenes a plaguicidas organoclorados ya sean ajustados por el contenido de grasa del suero, ya sean expresados por volumen, se han utilizado para investigar una posible asociación entre el nivel de residuo circulante y la calidad seminal, expresada como número total de espermatozoides en el eyaculado (NTE).

Número de plaguicidas por muestra

En primer lugar, en cuanto a la relación entre el número de residuos de plaguicidas detectados por muestra de suero, cuyo valor medio fue de 11,3 residuos, se encontró una disminución de 1,05 millones de espermatozoides por cada incremento en el número de residuos en la muestra, aunque no se alcanzó la significación estadística. Cuando esta variable se clasificó en <12 ó ≥ 12 plaguicidas detectados por muestra, el último grupo presentó casi 1,12 millones de espermatozoides menos en el recuento.

Número total de espermatozoides y plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Nº residuos	221	-1,05	1,04	0,212	-1,15	1,03
≥ 12 plaguicidas detectados	221	-1,12	1,20	0,557	-1,61	1,29

EE: error estándar

Exposición a plaguicidas

También se consideró la relación entre número total de espermatozoides y la exposición a plaguicidas, considerando la presencia o ausencia de cada uno de los plaguicidas organoclorados seleccionados. Se presentan a continuación los resultados para cada residuo, ordenados de acuerdo al grupo al que pertenecen.

Número total de espermatozoides y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	221	1,11	1,25	0,654	-1,41	1,73
Endrín	221	-1,56	1,21	0,018	-2,26	-1,08
Dieldrín	221	1,20	1,20	0,323	-1,20	1,73

EE: error estándar

En el grupo de aldrín/endrín/dieldrín, el residuo de endrín (presente en el 60,7% de los voluntarios) se asoció a una reducción significativa de cerca de 1,6 millones ($p=0,018$) mientras que el aldrín y el dieldrín, presentaron una tendencia inversa, pero no estadísticamente significativa de 1,11 y 1,20 millones de espermatozoides ($p=0,654$ y $p=0,323$), respectivamente.

Número total de espermatozoides y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	221	1,26	1,26	0,320	-1,25	1,99
Endosulfán II	221	-1,20	1,21	0,346	-1,76	1,22
Endosulfán diol	221	1,04	1,40	0,916	-1,88	2,01
Endosulfán éter	221	1,09	1,21	0,654	-1,33	1,58
Endosulfán lactona	221	-1,03	1,27	0,912	-1,65	1,56
Endosulfán sulfato	221	-1,74	1,20	0,003	-2,49	-1,22

EE: error estándar

En el caso particular de la presencia o ausencia de los endosulfanes, sólo en el caso del endosulfán sulfato (presente en el 45,1% de los voluntarios), se presentó una fuerte tendencia a la reducción de más 1,7 millones en el número de espermatozoides cuando el sujeto mostraba el residuo circulante en sangre, alcanzándose la significación estadística ($p=0,003$, IC de -2,5 a -1,2). Respecto al endosulfán diol y el endosulfán lactona no se observó asociación alguna y con el endosulfán éter tampoco. Los endosulfanes I y II, presentaron tendencias opuestas de 1,26 y -1,20 en el mismo orden, pero tampoco fueron estadísticamente significativas, $p=0,320$ y $0,346$, respectivamente.

Número total de espermatozoides y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	221	-1,49	1,26	0,088	2,35	1,06
<i>p,p'</i> -DDT	221	1,15	1,21	0,450	-1,25	1,66
<i>p,p'</i> -DDE	221	-1,07	1,59	0,892	-2,67	2,35
<i>o,p'</i> -DDD	221	-1,14	1,21	0,508	-1,67	1,29

EE: error estándar

En el caso particular de los DDTs, también presentaron tendencias negativas, salvo para el caso del *p,p'*-DDT, el cual evidenció un incremento de 1,15 millones, pero este incremento no fue significativo. En el caso del *o,p'*-DDT (presente en el 19,2% de los individuos) el decremento fue casi de 1,5 millones, con una significación marginal ($p=0,088$). En cuanto al DDE y el DDD, se observaron decrementos de 1,07 y 1,14, ninguno de los cuales fue estadísticamente significativo.

La presencia de lindano (presente en el 64,7% de los individuos) se asoció a un decremento de 1,4 millones que fue marginalmente significativo, el mírex y el metoxicloro también mostraron tendencias a la reducción de alrededor de 1,05 millones pero en ninguno de estos casos fue significativa ($p=0,851$ y $p=0,757$, respectivamente). Para el caso de la vinclozolina y el hexaclorobenceno, en ambos, se observó un incremento en el NTE de 1,69 y 1,34 millones, y aunque la tendencia fue más significativa que en el caso anterior, esta no se acercó a la significación marginal ($p=0,236$ y $0,204$ respectivamente).

Número total de espermatozoides y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	221	-1,38	1,21	0,095	-2,01	1,06
Vinclozolina	221	1,69	1,56	0,236	-1,41	4,04
Hexaclorobenceno	221	1,34	1,26	0,204	-1,18	2,12
Mírex	221	-1,04	1,21	0,851	-1,52	1,41
Metoxicloro	221	-1,06	1,21	0,757	-1,54	1,37

EE: error estándar

También se consideró la relación entre el número de espermatozoides y la exposición a plaguicidas, considerando la concentración de cada uno de los plaguicidas organoclorados seleccionados. Se presentan a continuación los resultados para cada residuo, ordenados de acuerdo al grupo al que pertenecen.

Los datos de concentración de plaguicidas se transformaron en su logaritmo neperiano para reducir al máximo la dispersión de los resultados, excepto para aquellos donde se obtuvo una distribución normal (en el caso del mírex, la sumatoria de los DDT y los endosulfanes). A pesar de ello también se hizo esta transformación para el resto de residuos con objeto de reducir el sesgo.

Para el caso de presencia o ausencia de los plaguicidas, analizado en el apartado anterior, la máxima n fue de 221 sujetos, pero en la cuantificación de cada uno de los plaguicidas sólo se logró en un máximo de 213 individuos debido a que no para todos los individuos se contó con muestra suficiente. Para aquellos casos en los que no se detectó el residuo específico se asignó el valor de cero. Se presentan a continuación cada uno de los análisis numéricos clasificando los residuos por grupos de plaguicidas.

NTE y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	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
Diendrín	213	1,12	1,11	0,252	-1,09	1,37

EE: error estándar

En el caso particular de aldrín/endrín/diendrín, ninguno de los residuos se asoció de forma significativa con NTE. El aldrín presentó una reducción del recuento total por unidad menor en cantidad y significación con una $\beta = -1,04$ ($p=0,702$), mientras que los otros residuos presentaron incrementos muy semejantes a 1,12 millones, pero tampoco fueron estadísticamente significativas ($p=0,255$ y $0,252$, respectivamente).

NTE y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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
Σ Endosulfán	213	-1,06	1,13	0,645	-1,34	1,20

EE: error estándar

Endosulfán sulfato (con un valor medio de 2,08 ng/ml) fue el único residuo que mostró una asociación estadísticamente significativa con el NTE, con una reducción de 1,23 millones ($p=0,009$). Los otros compuestos de este grupo presentaron ligeras tendencias no significativas, por ejemplo, el endosulfán diol y lactona hacia la reducción de 1,03 y 1,01 ($p=0,709$ y $p=0,855$ respectivamente) y el endosulfán I, II y éter, al incremento de 1,08, 1,21 y 1,04, que tampoco fueron significativas ($p=0,420$, $p=0,447$ y $p=0,504$, respectivamente). La sumatoria de endosulfán mostró un decremento de 1,06 millones, que no fue estadísticamente significativo.

NTE y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	212	-1,14	1,22	0,523	-1,69	1,31
<i>p,p'</i> -DDT	212	1,11	1,08	0,166	-1,05	1,29
<i>p,p'</i> -DDE	212	-1,11	1,13	0,387	-1,42	1,15
<i>o,p'</i> -DDD	213	-1,03	1,09	0,772	-1,22	1,16
Σ DDTs	209	1,03	1,17	0,869	-1,33	1,40

EE: error estándar

En el caso particular de los DDT ninguno de ellos mostró una relación estadísticamente significativa con el NTE, pero la concentración del residuo de *p,p'*-DDT, fue cercana a la significancia, con un incremento de 1,11 millones ($p=0,166$). En el caso de los otros residuos de este grupo todos se asociaron a una reducción en el NTE, pero con menor significación estadística. Finalmente, la sumatoria de los DDT, presentó un ligero incremento aunque este no fue tampoco estadísticamente significativo.

NTE y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

Lindano, metoxicloro y mírex, no se asociaron significativamente con el NTE, sin embargo mírex presentó el mayor decremento en el NTE con una reducción de 1,19 millones y la mayor significación estadística ($p=0,185$) frente a una reducción asociada al lindano y al metoxicloro de 1,03 y 1,07 millones ($p=0,824$ y $p=0,477$, respectivamente). Hexaclorobenceno y vinclozolina mostraron incrementos de 1,10 y 1,07 millones, pero éstos tampoco fueron estadísticamente significativos ($p=0,278$ y $p=0,536$, respectivamente).

En el grupo de individuos en que se dispuso de la determinación de lípidos en suero se hizo la estimación de la concentración de residuo por gramo de lípido (ng/g lípido), aplicando el algoritmo numérico descrito previamente para la estimación del contenido graso del suero en función de los niveles de colesterol y triglicéridos. La variable del NTE y los residuos de organoclorados ajustados por gramo de lípido fueron transformadas en su logaritmo neperiano por lo que se presentan los datos geométricos.

NTE y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	117	-1,14	1,24	0,551	-1,73	1,34
Endrín	78	1,10	1,15	0,475	-1,19	1,46
Dieldrín	72	1,01	1,23	0,976	-1,51	1,53

EE: error estándar

Endrín y dieldrín mostraron un incremento en el NTE de 1,10 y 1,01 millones, mientras que el aldrín presentó una reducción de 1,14 millones, en ningún caso estadísticamente significativos ($p=0,475$, $0,976$ y $0,551$, respectivamente).

NTE y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	110	1,19	1,23	0,405	-1,27	1,79
Endosulfán II	48	1,68	1,51	0,219	-1,37	3,86
Endosulfán diol	134	-1,10	1,18	0,576	-1,51	1,26
Endosulfán éter	62	1,19	1,25	0,433	-1,30	1,85
Endos lactona	123	1,05	1,25	0,820	-1,49	1,65
Endos sulfato	63	-1,20	1,22	0,366	-1,77	1,24

EE: error estándar

Sólo endosulfán diol y endosulfán sulfato presentaron una reducción, no significativa, en el NTE de -1,10 y 1,20 millones ($p=0,576$ y $p=0,366$), respectivamente. Aunque los otros compuestos del grupo tampoco presentaron asociaciones significativas, endosulfán II muestra una tendencia al incremento en el NTE, 1,68 millones ($p=0,219$) seguido del endosulfán I y de endosulfán éter con un incremento de

1,19 millones ($p=0,405$ y $p=0,433$), respectivamente. Por último, el residuo de endosulfán lactona presentó el menor incremento (1,05 millones).

NTE y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	28	1,98	1,97	0,326	-2,05	7,98
<i>p,p'</i> -DDT	94	1,40	1,21	0,084	-1,05	2,04
<i>p,p'</i> -DDE	142	-1,06	1,20	0,755	-1,53	1,36
<i>o,p'</i> -DDD	89	-1,00	1,21	0,987	-1,47	1,46

EE: error estándar

El residuo de *p,p'*-DDT mostró un aumento marginalmente significativo de 1,40 millones ($p=0,084$) seguido del *o,p'*-DDT que mostró un incremento de 1,98, pero no significativo ($p=0,326$). De nuevo los residuos de DDE y el DDD mostraron reducciones no estadísticamente significativas de 1,06 y 1,00 millones de espermatozoides ($p=0,755$ y $p=0,987$), respectivamente.

NTE y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	85	1,45	1,29	0,148	-1,14	2,42
Mírex	59	-1,27	1,37	0,451	-2,40	1,48
Metoxicloro	87	-1,06	1,22	0,754	-1,57	1,39
HCB	116	1,03	1,19	0,877	-1,37	1,44
Vinclozolina	140	1,17	1,20	0,400	-1,23	1,67

EE: error estándar

El residuo de lindano presentó un incremento marginalmente significativo de 1,45 millones de espermatozoides ($p=0,148$). Mírex y metoxicloro presentaron reducciones no significativas de 1,27 y 1,06 ($p=0,451$ y $0,754$), respectivamente. Los residuos de vinclozolina y de hexaclorobenceno evidenciaron incrementos no significativos de 1,17 y 1,03 millones ($p=0,400$ y $p=0,877$, respectivamente).

4.7.2 Análisis bivariante para la movilidad espermática y sus determinantes

Se presentan a continuación los principales determinantes asociados a la calidad seminal que hacen referencia al número total de espermatozoides móviles (NTEM). Si bien se ha realizado un análisis exhaustivo de las variables sociodemográficas, del estilo de vida y del examen físico clínico, que incluyeron la mayoría de los principales determinantes que se han encontrado, ya sea por su plausibilidad biológica o por información de la literatura científica disponible, sólo se presentan aquellos que mostraron alguna asociación o tendencia estadística, o que fueron relevantes, en base a los criterios anteriormente citados, para tomarlos en consideración en los ajustes para el análisis de su participación como confusores o modificadores potenciales de la calidad seminal.

El NTEM no presentó una distribución normal, ni en su forma cruda ni con alguna transformación, pero se transformó a su logaritmo neperiano, por lo que en este análisis bivariante, se presentan siempre los datos geométricos.

4.7.2.1 Número total de espermatozoides móviles (NTEM) y características de los jóvenes

Edad

Con respecto a la edad, expresada en años, se encontró una asociación cercana a la significación estadística, por cada incremento de edad, con un aumento de 1,08 millones de espermatozoides móviles, al igual que ocurría cuando estudiamos la relación entre edad y número total de espermatozoides.

Número total de espermatozoides móviles y edad

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Edad	272	1,08	1,05	0,100	-1,01	1,17

EE: error estándar

Índice de masa corporal (IMC)

En el caso particular del índice de masa corporal (IMC), expresado en forma continua, se observó una reducción, cercana a la significación marginal, de 1,05

(p=0,100) millones de espermatozoides móviles por cada unidad de incremento del IMC.

Número total de espermatozoides móviles e IMC

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
IMC	262	-1,05	1,03	0,100	-1,12 1,01

EE: error estándar

Pero cuando reclasificamos la variable en tres categorías de IMC, de acuerdo a los criterios de la OMS, incluyendo todas de forma dicotómica primero, se observó un incremento no significativo de 1,27 millones de espermatozoides móviles para la primera categoría (p=0,241). La segunda presentó una reducción de 1,30 millones con una significación ligeramente mayor a la de la primera (p=0,224), y por último, la tercera categoría, presentó un incremento de 1 millón, pero claramente no significativo (p=0,994) aunque esta última categoría sólo estuvo constituida por 8 sujetos.

Número total de espermatozoides móviles e IMC (kg/m²)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%
<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

EE: error estándar, n=262

Cuando se introdujeron todas las categorías juntas y se tomaron como referencia la primera categoría, los jóvenes con sobrepeso mostraron una reducción de 1,30 millones de espermatozoides móviles, pero esta reducción no fue estadísticamente significativa (p=0,222). Para la categoría de obesos, la reducción observada se redujo a 1,07 millones de espermatozoides móviles, pero nuevamente aquí se observó una falta clara de significación estadística (p=0,904), nuevamente cabe notar que esta última categoría sólo estuvo constituida por 8 sujetos.

Número total de espermatozoides e IMC

Variable	β	EE	p	IC 95%	
≥ 25 a < 30	-1,30	1,24	0,222	-1,98	1,71
≥ 30	-1,07	1,72	0,904	-3,11	2,73
Cte.	72,10	1,12	0,000	58,04	89,58

EE: error estándar

En todos los casos se presentaron reducciones con asociaciones de mayor significación estadística que en el caso del NTE.

Salud general

En cuanto a la relación entre el estado de salud de los jóvenes sobre el NTEM, se observó un incremento en el número total de espermatozoides móviles de 1,32 millones por cada unidad de cambio, cercano a la significación estadística ($p=0,120$).

Número total espermatozoides móviles y estado de salud

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Salud general	252	1,32	1,20	0,120	-1,89	1,08

EE: error estándar

Cuando analizamos la reclasificación de los estados de salud referidos por los jóvenes de forma dicotómica, se observó que para los que describieron gozar de una muy buena salud se observó un incremento de 1,36 millones de espermatozoides móviles, cercano a la significación estadística marginal ($p= 0,110$). Aquellos que refirieron tener una buena salud presentaron una reducción de 1,34 millones de espermatozoides móviles, pero con una significación estadística ligeramente menor ($p= 0,123$). Aquellos que refirieron tener una mala salud presentaron una reducción de 1,12, aunque esta claramente no fue estadísticamente significativa, hay que destacar que esta categoría sólo estuvo formada por 4 individuos.

Número total de espermatozoides móviles y estado de salud

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

EE: error estándar, n=262

Al introducir las tres categorías juntas utilizando como referencia la categoría estado de salud muy bueno, aquéllos que refirieron tener una buena salud presentaron una reducción de 1,36 millones de espermatozoides móviles, cercana a la significación estadística marginal. Los que refirieron un estado de salud malo, presentaron la misma reducción que la anterior, pero de forma no estadísticamente significativa, aunque nuevamente, esta categoría sólo estuvo constituida por 4 individuos.

Número total de espermatozoides móviles y estado de salud

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Buena	-1,36	1,2	0,112	-1,98	1,08
Mala	-1,36	2,1	0,667	-5,84	3,15
Cte.	86,21	1,2	0,000	63,63	116,81

EE: error estándar, n=262

Cuando los jóvenes refirieron estar enfermos o haber tenido alguna enfermedad (crónica) la tendencia fue hacia la reducción de 1,37 millones en el número de formas móviles (p=0,390).

Número total de espermatozoides móviles y enfermedad

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Crónica	17	-1,35	1,44	0,417	-2,76	1,53

EE: error estándar, n=251

Consumo de medicamentos en los últimos tres meses

En referencia al uso de medicamentos, declarada por 89 individuos, el consumo de algún tipo de fármacos supuso una reducción en el número de espermatozoides móviles de 1,15 millones, cuando se compara a este grupo con los que no habían

tomado ningún tipo de medicamento en lo últimos tres meses, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa ($p=0,477$).

NTEM y medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Medicamentos	89	-1,15	1,2	0,477	-1,68	1,28

EE: error estándar

El uso de antivirales, declarada por un sólo individuo, presentó una reducción de 71,88 que fue estadísticamente significativa ($p<0,001$) con un IC de 95% de -1198,34 a -4,31, al igual que ocurrió en el NTE. En este caso como en los siguientes hay que tener en consideración el reducido tamaño muestral.

NTEM y medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Antivirales	1	-71,88	4,17	0,000	-1198,34	-4,31

EE: error estándar, n=251

El tratamiento con antibióticos mostró una reducción de 1,78 millones, con significación marginal, ($p=0,090$).

NTEM y medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Antibióticos	15	-1,78	1,40	0,090	-3,45	1,09

EE: error estándar, n=251

Los tratamientos de tipo hormonal presentaron un incremento no significativo de 3,34 millones de espermatozoides móviles ($p=0,410$).

NTEM y medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Hormonas	1	3,34	4,27	0,410	-5,22	58,38

EE: error estándar, n=251

El tratamiento con anti-tumorales presentó una reducción que no fue estadísticamente significativa de 1,57 millones ($p=0,760$).

NTEM y medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Antitumorales	1	-1,57	4,28	0,760	-27,51	11,16

EE: error estándar, n=251

El tratamiento con calmantes presentó una reducción no significativa de 1,25 millones de formas móviles ($p=0,880$).

NTEM y medicamentos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Calmantes	1	-1,25	4,28	0,880	-21,88	14,04

EE: error estándar, n=252

Consumo de tabaco

Como se ha descrito anteriormente, 86 de los 258 jóvenes (33%) que contestaron la encuesta, se declararon fumadores. Este grupo particular de individuos presentó una reducción de 1,26 millones en el número total de espermatozoides móviles con respecto a los no fumadores, que aunque no se acercó a la significación estadística marginal ($p=0,240$), parece haber una tendencia clara a la reducción, al igual que ocurría para el NTE en donde el valor de p fue 0,122.

Número total de espermatozoides móviles y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Fumador	86	-1,26	1,22	0,240	-1,85	1,17

EE: error estándar, n=252

Si el hábito tabáquico se considera de forma cuantitativa teniendo en cuenta el número de cigarrillos por día, el número total de espermatozoides móviles presentó una reducción marginalmente significativa de 1,03 millones ($p=0,080$), por cada unidad de

cambio, es decir cada cigarrillo adicional, valores muy parecidos a los obtenidos en el análisis de asociación entre consumo de cigarrillos al día y número total de espermatozoides, en donde se alcanzaba la significación estadística ($p=0,240$).

Número total de espermatozoides móviles y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Cigarros/día	86	-1,03	1,02	0,080	-1,07	1,00

EE: error estándar, n=252

El número de años fumando se asoció también a NTEM con una reducción de 1,05 millones por cada año fumando, aunque tampoco la relación fue estadísticamente significativa ($p=0,280$). Hay que hacer notar que aquí también se incluyeron aquellos jóvenes que aunque no fumaban en el momento de la entrevista lo habían hecho con anterioridad.

Número total de espermatozoides móviles y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Años fumando	109	-1,05	1,04	0,280	-1,14	1,04

EE: error estándar, n=252

Consumo de *cannabis*

En cuanto al consumo de cannabis, referido por 56 individuos (21,7%) como consumo de hachis, también presentó una reducción de 1,38 millones, cercana a la significación estadística marginal ($p=0,150$), al igual que sucedía para NTE.

Número total de espermatozoides móviles y *Cannabis*

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Consumo de hachis	56	-1,38	1,24	0,150	-2,12	1,12

EE: error estándar, n=252

Consumo de alcohol

El consumo de alcohol de los jóvenes no presentó asociación alguna con el NTEM, aunque como ya se ha descrito el porcentaje de bebedores es alto (68,7%).

Número total de espermatozoides móviles y alcohol

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Alcohol	177	1,01	1,22	0,980	-1,47	1,49

EE: error estándar, n=252

Nivel de estudios

En cuanto al grado de escolaridad clasificado según tuvieran estudios primarios, secundarios o universitarios, se observó una asociación positiva con un incremento cercano a la significación marginal de 1,40 millones de móviles por unidad de cambio ($p=0,110$).

Número total de espermatozoides móviles y nivel de estudios

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Estudios	257	1,40	1,23	0,110	-1,08	2,10

EE: error estándar

Cuando el nivel académico, se clasificó en estudios primarios, secundarios y universitarios, se observó que aquellos que sólo habían cursado estudios primarios presentaron una reducción marginalmente significativa de 2,42 millones en el número de espermatozoides móviles. Los que tenían estudios secundarios, presentaron una reducción de 1,05 millones, aunque esta no fue estadísticamente significativa ($p=0,898$). Los estudiantes universitarios presentaron un incremento de 1,44, y aunque tampoco fue estadísticamente significativo parece haber una clara tendencia al incremento en el NTEM, indicando que a mayor nivel de estudios mayor recuento de espermatozoides móviles, al igual que ocurría para NTE.

Número total de espermatozoides móviles y nivel de estudios

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

EE: error estándar

Cuando incluimos en el análisis todos los grados de escolaridad, tomando como referencia a los estudiantes universitarios, nuevamente la tendencia fue a la reducción en 1,07 y 1,30 para estudiantes con niveles primarios y secundarios, aunque estas asociaciones tampoco fueron estadísticamente significativas ($p=0,904$ y $p=0,222$), respectivamente. Se debe notar que sólo hubo 10 jóvenes en el nivel de estudios primarios y 17 en secundarios, frente a 231 universitarios.

Número total de espermatozoides móviles y nivel de estudios

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Primarios	-1,07	1,72	0,904	-3,11	2,73
Secundarios	-1,30	1,24	0,222	-1,98	1,17
Cte.	72,10	1,12	0,000	58,04	89,58

EE: error estándar

Actividad laboral

El horario de trabajo no mostró asociaciones estadísticamente significativas. Cuando se probaron las variables de forma dicotómica para diurno, nocturno o sin horario, se observó una reducción en el NTEM de 1,33 y 1,38 para los dos primeros y un incremento de 1,38 para el último caso ($p=0,315$, $0,469$ y $0,199$ respectivamente), con un incremento cercano a la significación marginal.

Número total espermatozoides móviles y trabajo

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Diurno	31	-1,33	1,33	0,315	-2,34	1,32
Nocturno	11	-1,38	1,56	0,469	-3,34	1,74
No trabaja	216	1,38	1,28	0,199	-1,19	2,25

EE: error estándar, n=258

Cuando se analizaron todos los horarios juntos, utilizando la categoría “No trabaja” como la de referencia, las asociaciones se redujeron y la significación fue aún menor.

Número total espermatozoides móviles y trabajo

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Diurno	1,02	1,28	0,934	-1,60	1,67
Nocturno	-1,07	1,61	0,890	-2,74	2,40
Cte.	69,74	1,26	0,000	44,59	109,07

EE: error estándar

Lugar de residencia

En referencia al tipo de residencia que tenían los participantes, considerando rural y urbano, la residencia urbana de los jóvenes se asoció a una reducción de 1,30 millones de espermatozoides móviles, pero sin alcanzar la significación estadística ($p=0,310$).

Número total espermatozoides móviles y residencia del joven

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Área urbana	220	-1,30	1,29	0,310	-2,14	1,27

EE: error estándar, n=251

Características de los padres

En 8 de cada 10 cuestionarios, el voluntario entrevistado contestó que la madre residía en el medio urbano ($>10,000$ habitantes) durante la gestación del joven. Se observó una reducción significativa de NTEM, cuando el voluntario declaró que su madre había vivido en un área urbana durante su gestación ($p=0,040$), lo que concuerda con la asociación observada en NTE.

Número total espermatozoides móviles y residencia materna

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Residencia urbana	206	-1,60	1,25	0,040	-2,49	-1,02

EE: error estándar

En referencia al lugar de nacimiento de la madre, clasificada de igual forma que la anterior, no observamos asociación alguna con el número de espermatozoides móviles.

Número total espermatozoides móviles y nacimiento materno

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Área urbana	182	1,03	1,22	0,900	-1,45	1,52

EE: error estándar, n=251

El lugar de nacimiento del padre se asoció a una reducción de 1,40 millones, cercana a la significación estadística marginal ($p=0,100$).

Número total espermatozoides móviles y nacimiento paterno

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Área urbana	189	-1,40	1,23	0,100	-2,09	1,07

EE: error estándar, n=251

Quince jóvenes declararon que sus madres fueron fumadoras durante el embarazo, lo que se asoció con una reducción de 1,19 millones de móviles, aunque no fue estadísticamente significativa ($p=0,280$), aunque se advierte una tendencia hacia la reducción del NTEM.

Numero total de espermatozoides móviles y tabaco

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Fuma la madre	15	-1,19	1,18	0,280	-1,64	1,15

EE: error estándar, n=251

En cuanto al trabajo materno durante la gestación del joven, declarado por 59 participantes, no se asoció con el NTEM, aunque se observó una reducción de 1,12 millones de móviles con un valor de $p=0,360$.

Número total de espermatozoides móviles y trabajo

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Trabajo madre	59	-1,12	1,13	0,360	-1,42	1,14

EE: error estándar, n=251

A pesar de que, en referencia al trabajo materno, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa con el NTEM, cuando esta variable fue

clasificada de acuerdo al tipo de trabajo, la actividad de tipo agrícola se asoció con un incremento de 1,28 millones en el número total de espermatozoides móviles, aunque estuvo acompañado de una gran dispersión.

NTEM y trabajo materno

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Ninguno	196	1,04	1,25	0,874	-0,41	-1,50
Intelectual	13	-1,09	1,54	0,846	-0,93	-2,53
Manual	34	-1,09	1,31	0,750	-0,62	-1,86
Agrícola	8	1,29	1,68	0,631	-0,78	-2,17

EE: error estándar, n=251

Cuando se analizaban todos los tipos de trabajo juntos, tomando como referencia el trabajar en el hogar (“Ninguno”), tampoco se observó asociación alguna, pero al igual que en el análisis dicotómico para cada categoría, el trabajo agrícola presentó el mayor incremento, 1,27 millones de espermatozoides móviles.

NTEM y trabajo materno

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Intelectual	-1,09	1,54	0,841	-0,94	-2,56
Manual	-1,09	1,32	0,763	-0,62	-1,86
Agrícola	1,27	1,69	0,655	-0,80	-2,22
Cte.	71,20	1,11	0,000	4,06	58,07

EE: error estándar

4.7.2.2. Número total de espermatozoides móviles (NTEM) y exploración andrológica

Presencia o ausencia de cicatriz quirúrgica

La presencia de cicatriz en el arco inguinal o genital se asoció a una reducción no significativa de 1,39 millones de espermatozoides móviles, (p=0,410).

Número total de espermatozoides móviles y cicatriz

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Cicatriz	15	-1,39	1,49	0,410	-3,04	1,58

EE: error estándar, n=261

Tamaño y Disposición de los testículos

El tamaño de los testículos (en mililitros) se asoció a incrementos significativos, casi idénticos, de 1,06 y 1,05 millones, ($p=0,010$, ambos) para el izquierdo y el derecho respectivamente, tal como ocurría para NTE.

NTEM y tamaño de testículos (ml)

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
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

EE: error estándar

Cuando el tamaño testicular se reclasificó en menor y mayor o igual a 12 ml, ambos presentaron asociaciones muy similares y mediciones muy semejantes de manera que mostraron un incremento significativo de 1,70 con $p=0,005$ y no significativo de 1,86 y $p=0,399$, para el testículo izquierdo y el derecho, respectivamente.

Número total de espermatozoides móviles y tamaño de testículos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
T. izquierdo (< 12 ml)	8	1,70	1,21	0,005	-13,06	-1,60
T. derecho (< 12 ml)	7	1,86	1,21	0,399	-5,75	2,01

EE: error estándar

Cuando al menos uno de los testículos se encontró fuera del escroto, hubo una reducción no significativa de 1,27 millones de espermatozoides móviles ($p=0,382$).

Número total de espermatozoides móviles y disposición testículos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Fuera del escroto	33	-1,18	1,32	0,555	-2,05	1,47

EE: error estándar, n=251

La disposición de los testículos se asoció a reducciones casi idénticas en cuanto a magnitud y significación estadística de 1,16 y 1,14 ($p=0,630$ y $0,660$) para el testículo izquierdo y el derecho respectivamente.

NTEM y disposición testículos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
T. izquierdo	23	-1,16	1,36	0,630	-2,13	1,58
T. derecho	15	-1,14	1,35	0,660	-2,04	1,58

EE: error estándar, $n=261$ (izquierdo) y $n=259$ (derecho)

Consistencia de los testículos

En referencia a la consistencia de los testículos observada normal en el 98% de los individuos, no se encontró asociación significativa con NTEM.

NTEM y consistencia

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Ambos testículos	6	1,35	2,40	0,730	-4,17	7,59

EE: error estándar

En cuanto a la consistencia de los testículos, teniendo en cuenta de forma independiente al testículo derecho y al izquierdo por separado, no hubo tampoco ninguna relación significativa; así, la consistencia del testículo izquierdo muestra un incremento de 1,64 millones, mientras que para el derecho el incremento es superior, 2,62 millones de móviles, ($p=0,330$ y $p=0,200$, respectivamente).

Número total de espermatozoides móviles y consistencia

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Testículo izquierdo	4	1,64	1,65	0,330	-1,64	4,42

EE: error estándar, $n=261$

Número total de espermatozoides móviles y consistencia

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Testículo derecho	2	2,62	2,12	0,200	-1,67	11,50

EE: error estándar, $n=259$

Epidídimos

La presencia de quistes en el epidídimo (única alteración encontrada a este nivel) se asoció con una reducción estadísticamente significativa de 3,21 millones de móviles ($p=0,30$), al igual que se describe para el número total de espermatozoides.

NTEM y epidídimo

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Quistes	8	-3,21	1,70	0,030	-9,10	-1,13

EE: error estándar, n=267

Vasos deferentes, Varicocele e Hidrocele

La detección no clara, a la palpación, de los vasos deferentes, así como la presencia de varicocele e hidrocele no se asoció de manera significativa con el número total de espermatozoides móviles, aunque en todos los casos se apreciaron incrementos.

NTEM y características examen físico

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Vasos deferentes	24	1,26	1,34	0,430	-1,41	2,24
Varicocele	27	1,08	1,35	0,810	-1,68	1,95
Hidrocele	2	4,10	2,87	0,180	-1,94	32,61

EE: error estándar, n= 268

4.7.2.3 Número total de espermatozoides móviles (NTEM) y características seminales

Se muestran a continuación los resultados del análisis bivalente para NTEM y las variables del análisis seminal de mayor interés. Se han incluido en el estudio aquella información que forma parte de la propia estimación de NTEM, es decir la concentración de espermatozoides, el volumen del eyaculado y el porcentaje de espermatozoides móviles.

Estación del año

La estación de recogida de la muestra, significó un incremento significativo de 1,23 millones de espermatozoides móviles por cada unidad de cambio de estación ($p=0,017$).

Número total de espermatozoides móviles y estación del año

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Estación	271	1,23	1,09	0,017	1,04	1,45

EE: error estándar

Cuando analizamos la estación del año, para la estación de recogida de la muestra en forma dicotómica. Para el otoño se observó un incremento no significativo de 1,09 millones de espermatozoides móviles ($p=0,631$), en verano también se observó un incremento de 1,17 millones de espermatozoides móviles, pero este tampoco fue estadísticamente significativo ($p=0,647$). Para el invierno hubo un incremento muy cercano a la significación estadística marginal de 1,51 ($p=0,087$). Por otra parte, para el caso de la primavera se observó una reducción de 1,59 millones, la cual también se acercó a la significación estadística marginal ($p=0,114$).

Número total de espermatozoides móviles y estación del año

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

EE: error estándar

Cuando se incluyeron en el análisis a todas las estaciones, tomando como referencia al invierno, Tanto verano, como otoño e invierno mostraron un decremento en el número de espermatozoides móviles. En el caso de la primavera, esta reducción de casi dos millones fue estadísticamente significativa ($p=0,015$). Para el verano y el otoño las reducciones fueron menores (1,22 y 1,35 millones de espermatozoides móviles respectivamente) pero no llegaron a alcanzar los niveles de significación ($p=0,623$ y $p=0,241$, respectivamente).

NTEM y estación del año

Variable	β	EE	p	IC 95%	
Primavera	-1,97	1,32	0,015	-3,41	-1,14
Verano	-1,22	1,49	0,623	-2,65	1,80
Otoño	-1,35	1,29	0,241	-2,22	1,22
Cte.	94,05	1,24	0,000	61,21	144,49

EE: error estándar

Tiempo de abstinencia

El tiempo de abstinencia considerado de manera continua en horas y como variable dicotómica por encima y por debajo de 48 horas, presentó un incremento de 1,01 y de 2,34 millones, respectivamente, en ambos casos con $p < 0,001$, al igual que ocurrió para la asociación con NTE, aunque el IC 95% estaba más lejos de la unidad en este último caso.

NTEM y tiempo de abstinencia (horas)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Abstinencia	272	1,01	1,00	0,000	1,01	1,01
Abstinencia ≥ 48 horas	254	2,34	1,21	0,000	1,61	3,41

EE: error estándar, n=272

Acidez-alcalinidad de la muestra seminal (pH)

El aumento de pH de las muestras supuso una reducción significativa de 3,51 millones de móviles por cada unidad de incremento de pH, al igual que ocurría para el NTE.

Número total de espermatozoides móviles y pH

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
pH	272	-3,51	1,36	0,000	-6,45	-1,91
pH $\geq 7,2$	231	-1,55	1,29	0,085	-1,06	2,54

EE: error estándar, n=272

Esta tendencia se mantuvo al reclasificar el pH en menor y, mayor o igual a 7,2, siendo de más de 1,55 millones para un $pH \geq 7,2$, aunque esta reducción fue sólo marginalmente significativa ($p=0,085$).

Licuación, viscosidad, células redondas y aglomeración

La licuación presentó una reducción estadísticamente significativa de 2,11 millones de espermatozoides móviles ($p=0,050$).

NTEM y licuación

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Licuefacción	17	-2,11	1,45	0,050	-4,37	-1,01

EE: error estándar, n=272

La viscosidad también presentó una reducción estadísticamente significativa en 1,22 millones de espermatozoides móviles ($p=0,049$).

NTEM y viscosidad

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Viscosidad	63	-1,22	1,11	0,049	-1,49	1,00

EE: error estándar, n=272

El número de células redondas presentes en la muestra tuvo un incremento significativo de 1,08 millones de espermatozoides móviles ($p \leq 0,001$), al igual que ocurrió para NTE.

NTEM y células redondas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Cél. redondas	16	1,08	1,03	0,000	1,02	1,13

EE: error estándar, n=272

Por último, la presencia de aglomeraciones supuso un incremento significativo (1,34 millones; $p=0,010$) en el número de espermatozoides móviles.

NTEM y aglomeración

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Aglomeración	63	1,34	1,11	0,010	1,09	1,66

EE: error estándar, n= 263

Morfología espermática

El porcentaje de espermatozoides normales (PCN) se asoció con un incremento significativo de 1,62 millones ($p < 0,001$) en el recuento de espermatozoides móviles.

NTEM y PEN

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
PEN	114	1,62	1,13	0,000	1,28	2,05

EE: error estándar; PEN: porcentaje de espermatozoides normales

En aquellos individuos con un porcentaje de espermatozoides normales menor o igual al 4% se observó un decremento también altamente significativo en el número de espermatozoides móviles de 4,93 millones ($p < 0,001$).

NTEM y $PEN \leq 4\%$

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
$PEN \leq 4\%$	15	-4,93	1,51	0,000	-11,08	-2,19

EE: error estándar; $PEN \leq 4\%$: porcentaje de espermatozoides normales $\leq 4\%$

El porcentaje de espermatozoides de anormales (PEA) se asoció con una reducción significativa de 2,98 millones $p < 0,001$ en el NTEM, al igual que ocurrió para NTE.

NTEM y PEA

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
PEA	114	-2,98	1,38	0,000	-5,60	-1,59

EE: error estándar; PEA: porcentaje de espermatozoides anormales

En cuanto al porcentaje de cabezas anormales (PCA) la reducción alcanzó los 97,46 millones, con una ($p=0,010$), aunque para este caso se presentó una distribución muy amplia.

NTEM y PCA

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
PCA	114	-97,46	6,03	0,010	-3430,36	-2,77

EE: error estándar; PCA: porcentaje de cabezas anormales

Por otra parte, el porcentaje de crestas intermedias (PCI) se asoció con un incremento significativo de 1,52 ($p=0,020$) en el número total de espermatozoides móviles.

NTEM y PCI

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
PCI	114	1,52	1,19	0,020	1,08	2,15

EE: error estándar; PCI: porcentaje de crestas intermedias

El porcentaje de flagelos anormales (PFA) se asoció una disminución no significativa de 1,21 millones de espermatozoides móviles ($p=0,340$).

NTEM y PFA

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
PFA	107	-1,21	1,22	0,340	-1,81	1,23

EE: error estándar; PFA: porcentaje de flagelos anormales

Por último, el índice de teratozoospermia (IT) se asoció con una reducción de 6,53 millones de espermatozoides móviles aunque no significativa ($p=0,410$), aunque el intervalo de confianza de 95% desde -578,12 a 13,56, indica una tendencia clara.

NTEM e IT

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
PTA	114	-6,53	9,61	0,410	-578,12	13,56

EE: error estándar; ITA: índice de teratozoospermia

4.7.2.4 Número total de espermatozoides móviles (NTEM) y determinaciones bioquímicas y hormonales en sangre

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, las variables referentes a los parámetros lipídicos fueron transformadas en su logaritmo neperiano para reducir el sesgo, ya que ninguna transformación lograba una distribución normal. Se muestran, por tanto, los datos geométricos.

El colesterol presentó una reducción marginalmente significativa de 2,62 millones ($p=0,090$).

NTEM y colesterol

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Colesterol	146	-2,62	1,77	0,090	-8,08	1,17

EE: error estándar

Los triglicéridos, por su parte se asociaron con una reducción menor, pero significativa, de 1,90 millones ($p=0,020$), situación que no se alcanzó para NTE.

NTEM y triglicéridos

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Triglicéridos	146	-1,90	1,31	0,020	-3,26	-1,11

EE: error estándar

Los lípidos de alta y de baja densidad (HDL y LDL) fueron asociados el primero a un incremento de 1,15 millones y el segundo a un decremento de 1,37 millones, pero ninguno de ellos significativo ($p=0,630$ y $p=0,440$, respectivamente).

NTEM y características bioquímicas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
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

Con respecto a las hormonas del eje reproductivo masculino, sólo la inhibina B presentó un incremento significativo de 1,60 millones ($p=0,050$), al igual que ocurría para NTE.

NTEM y hormonas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Inhibina b	247	1,60	1,27	0,050	1,01	2,55

EE: error estándar

Las hormona luteinizante (LH) presentó una reducción no significativa de 1,30 millones de espermatozoides móviles ($p=0,220$).

NTEM y hormonas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
LH	247	-1,30	1,24	0,220	-1,98	1,17

EE: error estándar

La hormona estimulante del folículo (FSH) presentó una reducción no significativa de 1,19 millones ($p=0,300$).

NTEM y hormonas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
FSH	247	-1,19	1,18	0,300	-1,64	1,16

EE: error estándar

La globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) presentó una reducción no significativa de 1,29 millones ($p=0,310$).

NTEM y hormonas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
SHBG	247	-1,29	1,28	0,310	-2,11	1,27

EE: error estándar

La SHBG, con la variable normalizada presentó una reducción menor, pero tampoco fue estadísticamente significativa 1,08 millones (p=0,440).

NTEM y hormonas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
SHBG	247	-1,08	1,10	0,440	-1,30	1,12

EE: error estándar

Por último la testosterona se asoció a un decremento no significativo de 1,24 millones de móviles (p=0,440).

NTEM y hormonas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Testosterona	247	-1,24	1,31	0,440	-2,11	1,38

EE: error estándar

4.7.2.5 Número total de espermatozoides móviles (NTEM) y exposición a plaguicidas organoclorados.

Los datos de exposición a plaguicidas organoclorados cuantificados en muestras de sangre de la población de estudio, ya sean ajustados por el contenido de lípidos del suero, ya sean expresados por volumen, se han utilizado para investigar una posible asociación con los parámetros de calidad seminal, expresados como número total de espermatozoides móviles en el eyaculado (NTEM).

Número de plaguicidas por muestra

El número de plaguicidas detectados no mostró asociaciones significativas ni en su forma discreta ni dicotómica, clasificado como más y menos de 12 residuos detectados. Ambas situaciones mostraron una tendencia a la reducción en 1,05 millones, pero la forma discreta mostró una p=0,300, y en la forma dicotómica fue menos significativa con una p=0,820.

NTEM y número de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC de 95%	
Número de plaguicidas detectados	218	-1,05	1,05	0,300	-1,15	1,05
Número de plaguicidas en ≥ 12	218	-1,05	1,23	0,820	-1,58	1,44

EE: error estándar

Exposición a plaguicidas

También, la presencia o ausencia de cada uno de los plaguicidas organoclorados se ha asociado con el NTEM. Se presentan a continuación los resultados para cada residuo, ordenados de acuerdo al grupo al que pertenecen.

NTEM y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	219	1,13	1,29	0,630	-1,46	1,86
Endrín	219	-1,56	1,24	0,040	-2,36	-1,03
Diendrín	219	1,28	1,23	0,240	-1,18	1,93

EE: error estándar

El caso de la presencia o ausencia de alguno de los plaguicidas del grupo de las drinas (aldrín/diendrín/endrín), sólo el residuo de endrín se asoció a una reducción significativa de 1,56 millones de móviles ($p=0,040$), al igual que ocurrió para el NTE. El diendrín presentó un incremento no significativo de 1,28 millones de móviles ($p=0,240$) y por último, el aldrín presentó un incremento tampoco significativo de 1,13 millones ($p=0,630$).

NTEM y presencia de los plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	219	1,37	1,30	0,220	-1,22	2,30
Endosulfán II	219	-1,22	1,24	0,360	-1,88	1,26
Endosulfán diol	219	1,15	1,46	0,720	-1,84	2,42
Endosulfán éter	219	1,02	1,24	0,940	-1,49	1,55
Endosulfán lactona	219	-1,02	1,31	0,940	-1,74	1,66
Endosulfán sulfato	219	-1,72	1,23	0,010	-2,59	-1,15

EE: error estándar

En el caso particular del grupo del endosulfán, el endosulfán I, endosulfán diol y endosulfán éter, se asociaron con incrementos no significativos de 1,37, 1,15 y 1,02 millones ($p=0,220$, $p=0,720$ y $p=0,940$) respectivamente, como se puede ver el primero presenta al parecer una tendencia más clara al incremento. Para el caso de los otros tres derivados el endosulfán II, endosulfán lactona y endosulfán sulfato, sólo este último presentó un decremento estadísticamente significativo de 1,72 millones ($p=0,010$), al igual que ocurrió para NTE, seguido del primero con una reducción de 1,22 millones, aunque en este caso no fue significativo ($p=0,360$) y por último el menos asociado fue el endosulfán lactona con un decremento de 1,02 millones, con una ($p=0,940$).

NTEM y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	219	-1,50	1,30	0,120	-2,53	1,12
<i>p,p'</i> -DDT	219	1,16	1,23	0,480	-1,30	1,76
<i>p,p'</i> -DDE	219	1,09	1,69	0,870	-2,58	3,05
<i>o,p'</i> -DDD	219	-1,26	1,24	0,300	-1,93	1,22

EE: error estándar

No se observaron asociaciones significativas con el DDT o sus derivados, pero el *o,p'*-DDT presentó una reducción cercana a la significación marginal de 1,50 millones ($p=0,120$) y el DDD a una reducción menos significativa de 1,26 millones, ($p=0,300$). El *p,p'*-DDT y el DDE presentaron incrementos aunque no significativos de 1,16 y 1,09 millones ($p=0,480$ y $p=0,870$) respectivamente.

NTEM y presencia de plaguicidas

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
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

Finalmente, el lindano se asoció a una reducción marginalmente significativa de 1,44 millones ($p=0,090$), y la vinclozolina con un incremento cercano a la significación marginal de 2 millones ($p=0,160$), mientras que el mirex, el HCB y el metoxicloro se asociaron no significativamente el primero a una reducción de 1,04 millones ($p=0,850$) y los dos últimos a un incremento de 1,30 y 1,01 millones ($p=0,320$ y $p=0,960$) respectivamente.

Con objeto de investigar la asociación entre el NTEM y la concentración de plaguicidas organoclorados en suero, los datos numéricos se transformaron en su logaritmo neperiano para reducir el sesgo, obteniéndose una distribución normal tan sólo en el caso del mirex, la sumatoria de los DDT y los endosulfanes. A pesar de ello también se hizo esta transformación para el resto de residuos con objeto de reducir el sesgo.

Para el caso de presencia o ausencia de los plaguicidas, analizado en el apartado anterior, la máxima n fue de 221 sujetos, pero en la cuantificación de cada uno de los plaguicidas sólo se logró en un máximo de 213 individuos debido a que no para todos los individuos se contó con muestra suficiente. Además, para aquéllos valores en los que no se detectó el residuo específico, se asignó el valor de cero.

A continuación se presentan cada uno de los análisis numéricos clasificando los residuos por grupos de plaguicidas.

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	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

EE: error estándar

En el caso particular de aldrín/endrín/dieldrín, el análisis bivalente del NTEM y los residuos no evidenció asociaciones estadísticamente significativas, pero el aldrín presentó una reducción de 1,05 ($p=0,650$), y el endrín y dieldrín incrementos de 1,11 y 1,18 millones ($p=0,330$ y $p=0,150$), el último estuvo cerca de la significación marginal.

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	EE	P	IC 95%	
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
Σ Endosulfán	211	-1,09	1,14	0,510	-1,43	1,19

EE: error estándar

En el caso de los endosulfanes, sólo el endosulfán sulfato resultó con un decremento significativo de 1,23 millones ($p=0,020$), al igual que ocurrió en el análisis de NTE. El endosulfán diol y el endosulfán lactona también presentaron decrementos, aunque menores y no significativos 1,03 y 1,02 millones ($p=0,710$ y $p=0,780$) respectivamente. El endosulfán II, endosulfán I y el endosulfán éter presentaron incrementos no significativos de 1,29, 1,07 y 1,03 millones ($p=0,360$, $p=0,530$ y $p=0,720$) respectivamente. El primero de estos últimos fue el más significativo aunque no se acercó a la significación marginal. Finalmente, la suma de los endosulfanes presentó una disminución aunque tampoco alcanzó la significación estadística, 1,09 millones ($p=0,510$).

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i>-DDT	211	-1,25	1,25	0,320	-1,95	1,25
<i>p,p'</i>-DDT	211	1,09	1,09	0,300	-1,08	1,30
<i>p,p'</i>-DDE	210	-1,10	1,15	0,490	-1,45	1,20
<i>o,p'</i>-DDD	211	-1,07	1,10	0,480	-1,30	1,13
Σ DDT	207	-1,05	1,20	0,770	-1,50	1,35

EE: error estándar

En el grupo de los DDT, salvo el *p,p'*-DDT que mostró un incremento de 1,09 millones, el resto, incluido la sumatoria, mostraron reducciones en el NTEM, aunque ninguno de ellos de manera estadísticamente significativa.

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/ml)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
HCB	211	1,10	1,11	0,330	-1,11	1,35
Lindano	211	-1,09	1,13	0,500	-1,39	1,18
Vinclozolina	211	1,05	1,13	0,670	-1,21	1,35
Metoxicloro	211	-1,05	1,10	0,600	-1,28	1,16
Mírex	211	-1,22	1,16	0,180	-1,65	1,10

EE: error estándar

Por último, el mírex, presentó una reducción no muy cercana a la significación marginal de 1,22 ($p=0,180$), también se observaron reducciones para el lindano y el metoxicloro de 1,09 y 1,05 millones, aunque mucho menos significativas ($p=0,500$ y $p=0,600$, respectivamente). El HCB y la vinclozolina presentaron ambos incrementos no significativos de 1,10 y 1,05 ($p=0,330$ y $p=0,670$, respectivamente), aunque el hexaclorobenceno aparece con mayor significación estadística.

En el grupo de individuos en que se dispuso de la determinación de lípidos en suero se hizo la estimación de la concentración de residuo por gramo de lípido, aplicando el algoritmo numérico descrito previamente. La variable del NTEM y los residuos de organoclorados ajustadas por gramo de lípido fueron transformadas en su logaritmo neperiano por lo que se presentan los datos geométricos.

No se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre NTEM y los plaguicidas del grupo de las drinas ajustado por lípidos; el aldrín mostró una tendencia a la reducción en 1,03 millones, con una $p=0,890$, y para el caso del endrín y el dieldrín se observó un incremento idéntico de 1,10 millones de móviles, en ambos casos sin significación estadística ($p=0,530$ y $0,660$, respectivamente).

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	116	-1,03	1,26	0,890	-1,63	1,53
Endrín	77	1,10	1,16	0,530	-1,22	1,47
Dieldrín	71	1,10	1,25	0,660	-1,42	1,73

EE: error estándar

Cuando se analizó el grupo de los endosulfanes, en ningún caso se observaron asociaciones estadísticamente significativas, sólo endosulfán II mostró un incremento de 1,92 millones cercano a la significación marginal, el endosulfán I, endosulfán éter y endosulfán lactona también mostraron tendencias a incrementos menores que el anterior, de 1,19, 1,24 y 1,07, pero con menor significación estadística ($p=0,440$, $0,410$ y $0,790$, respectivamente). El endosulfán diol y el endosulfán sulfato mostraron tendencias a la reducción en $-1,09$ y $-1,24$ millones, pero tampoco fueron significativas, aunque el último caso presentó una mayor significación estadística ($p=0,620$ y $0,290$)

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	109	1,19	1,25	0,440	-1,31	1,85
Endosulfán II	48	1,92	1,56	0,150	-1,27	4,67
Endosulfán diol	133	-1,09	1,19	0,620	-1,55	1,30
Endosulfán éter	62	1,24	1,30	0,410	-1,36	2,08
Endosulfán lactona	122	1,07	1,28	0,790	-1,53	1,75
Endosulfán sulfato	62	-1,24	1,23	0,290	-1,87	1,21

EE: error estándar

En el caso de la relación entre el NTEM y el grupo del DDT y sus derivados ninguno mostró una asociación estadísticamente significativa, El *p,p'*-DDT mostró el incremento con mayor significación de 1,30 millones ($p=0,250$), el *o,p'*-DDT, DDD y DDE mostraron tendencias de incrementos menores en magnitud y mucho menos significación estadística de 1,22, 1,04 y 1,00 ($p=0,800$, $0,990$ y $0,860$)

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	27	1,22	2,16	0,800	-3,98	5,96
<i>p,p'</i> -DDT	92	1,30	1,25	0,250	-1,20	2,02
<i>p,p'</i> -DDE	140	1,00	1,23	0,990	-1,49	1,50
<i>o,p'</i> -DDD	89	1,04	1,25	0,860	-1,49	1,61

EE: error estándar

Finalmente cuando, el lindano, vinclozolina y el hexaclorobenceno fueron ajustados por lípido, tampoco mostraron asociaciones estadísticamente significativas, pero presentaron tendencias a incrementos respectivamente en orden decreciente en magnitud y significación estadística de 1,41, 1,14 y 1,12 millones ($p=0,230$, $0,520$ y $0,580$). En el caso del mírex y el metoxicloro, tampoco evidenciaron asociaciones estadísticamente significativas, pero presentaron reducciones de -1,08 y 1,23 millones ($p=0,720$ y $0,560$) respectivamente.

NTEM y concentración de plaguicidas (ng/g lípido)

Variable	n	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	84	1,41	1,33	0,230	-1,25	2,48
Vinclozolina	139	1,14	1,22	0,520	-1,30	1,69
Hexaclorobenceno	116	1,12	1,21	0,580	-1,32	1,64
Metoxicloro	86	-1,08	1,23	0,720	-1,63	1,41
Mírex	59	-1,23	1,42	0,560	-2,49	1,64

EE: error estándar

4.7.3 Análisis bivariante para la morfología espermática y sus determinantes

4.7.3.1 Morfología espermática y exposición a plaguicidas organoclorados

Todas las variables relacionadas con la morfología del semen se dan en porcentajes y en adelante se suprimirá el término extendido y sólo se referirán las variables por las siglas de la característica morfológica de que se trate, ya sean porcentajes de:

- i) formas normales o espermatozoides normales (PEN)
- ii) formas anormales o espermatozoides anormales (PEA)
- iii) cabezas anormales (ln) (PCA)
- iv) piezas intermedias anormales (PPIA)
- v) flagelos anormales (ln) (PFA)
- vi) Índice de teratozoospermia (IT)

Al igual que en los otros casos, los datos sobre residuos de los plaguicidas detectados, fueron utilizados transformados en su logaritmo neperiano de manera que

aunque las variables no alcanzaron con esto una distribución normal, si se redujo la dispersión o el sesgo de las mismas.

Con el porcentaje de espermatozoides normales (PEN) no se observaron asociaciones estadísticamente significativas con el grupo del aldrín/endrín/dieldrín.

PEN y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	0,00	0,03	0,847	-0,08	0,12
Endrín	0,01	0,07	0,746	-0,19	0,37
Dieldrín	0,01	0,02	0,541	-0,04	0,14

n=96, EE: error estándar

En cuanto a la relación del PEN y la concentración de plaguicidas del grupo de los endosulfanes no se observaron asociaciones estadísticamente significativas. De entre estos sólo el endosulfán éter y el sulfato presentaron reducciones en 0,01 y 0,03 (p=241 y 0,265 respectivamente). El endosulfán I y II presentaron incrementos de 0,02 y 0,04 (p=0,232 y 0,631) respectivamente. No se observaron modificaciones en el caso del endosulfán diol o el endosulfán lactona.

PEN y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	0,02	0,02	0,232	-0,01	0,17
Endosulfán II	0,04	0,19	0,631	-0,44	1,17
Endosulfán diol	0,00	0,01	0,624	-0,06	0,02
Endosulfán éter	-0,01	0,01	0,241	-0,08	0,00
Endosulfán lactona	0,00	0,01	0,421	-0,05	0,01
Endosulfán sulfato	-0,03	0,02	0,265	-0,22	0,02
Σ Endosulfán	0,00	0,03	0,756	-0,18	0,10

n=96, EE: error estándar

El porcentaje de espermatozoides normales no presentó ninguna relación estadísticamente significativa frente a DDT o sus derivados. Sólo el *o,p'*-DDT mostró una tendencia a la reducción en 0,21% cercano a la significación estadística marginal, y

el DDE una tendencia al incremento en 0,02% (p=0,500). En cuanto a los otros derivados no se observaron tendencias, salvo para la sumatoria de DDT con un incremento en 0,04% (p=0,351).

PEN y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	-0,21	0,08	0,104	-1,01	0,01
<i>p,p'</i> -DDT	0,00	0,01	0,574	-0,02	0,07
<i>p,p'</i> -DDE	0,02	0,03	0,500	-0,06	0,23
<i>o,p'</i> -DDD	0,00	0,02	0,588	-0,03	0,10
Σ DDT	0,04	0,05	0,351	-0,05	0,41

n=96, EE: error estándar

El PEN tampoco presentó asociaciones estadísticamente significativas frente a los compuestos lindano, vinclozolina, HCB, metoxicloro o mírex. Sólo en el caso del hexaclorobenceno se presentó un incremento de 0,05% cercano a la significación marginal, y para vinclozolina con un decremento de la misma magnitud (p=0,140 y 0,164), respectivamente. El lindano presentó un decremento ligeramente mayor 0,06%, un poco menos significativo (p=0,185). El metoxicloro y el mírex presentaron incrementos de 0,03 y 0,01% (p=0,257 y 0,553, respectivamente).

PEN y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	-0,06	0,04	0,185	-0,39	0,02
Vinclozolina	-0,05	0,02	0,164	-0,28	0,01
HCB	0,05	0,02	0,140	-0,01	0,28
Metoxicloro	0,03	0,02	0,247	-0,01	0,21
Mírex	0,01	0,03	0,553	-0,06	0,22

n=96, EE: error estándar

En cuanto al porcentaje de espermatozoides anormales (PEA) frente a los residuos del grupo del aldrín/dieldrín/endrín, tampoco presentaron variaciones en cuanto a porcentaje aunque tampoco fueron estadísticamente significativas.

PEA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	0,00	0,00	0,887	-0,02	0,01
Endrín	0,00	0,01	0,641	-0,02	0,06
Dieldrín	0,00	0,00	0,877	-0,01	0,01

n=96, EE: error estándar

Frente a los endosulfanes, tampoco se observaron variaciones en el PEA y estas tampoco fueron estadísticamente significativas.

PEA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	0,00	0,00	0,557	-0,02	0,01
Endosulfán II	0,00	0,03	0,830	-0,14	0,09
Endosulfán diol	0,00	0,00	0,587	0,00	0,01
Endosulfán éter	0,00	0,00	0,470	0,00	0,01
Endosulfán lactona	0,00	0,00	0,328	0,00	0,01
Endosulfán sulfato	0,00	0,00	0,393	0,00	0,03
Σ Endosulfán	0,00	0,01	0,662	-0,01	0,03

n=96, EE: error estándar

En cuanto a la relación del PEA solo frente al *o,p'*-DDT presentó un incremento de 0,03% cercano a la significación marginal ($p=0,138$). Pero frente a los otros derivados del DDT no se observaron variaciones y estas no fueron significativas. Sólo en el conjunto de los DDT se mostró una reducción de 0,01% pero tampoco fue estadísticamente significativa ($p=0,395$).

PEA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	0,03	0,01	0,138	0,00	0,14
<i>p,p'</i> -DDT	0,00	0,00	0,469	-0,01	0,00
<i>p,p'</i> -DDE	0,00	0,01	0,579	-0,03	0,01
<i>o,p'</i> -DDD	0,00	0,00	0,594	-0,02	0,01
Σ DDT	-0,01	0,01	0,395	-0,06	0,01

n=96, EE: error estándar

El PEA presentó un incremento de 0,02% frente a la vinclozolina que fue estadísticamente significativo ($p=0,034$), y en el caso del lindano hubo un incremento de 0,01% cercano a la significación marginal ($p=0,132$). El hexaclorobenceno, el metoxicloro o el mírex no presentaron alteraciones del PEA y estas observaciones tampoco fueron estadísticamente significativas.

PEN y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	0,01	0,01	0,132	0,00	0,07
Vinclozolina	0,02	0,00	0,034	0,00	0,06
HCB	0,00	0,00	0,362	-0,03	0,00
Metoxicloro	0,00	0,00	0,372	-0,03	0,00
Mírex	0,00	0,01	0,479	-0,04	0,01

n=96, EE: error estándar

Para el caso del porcentaje de piezas intermedias anormales (PPIA) no se observaron modificaciones frente al grupo de aldrín/dieldrín/endrín, salvo para el endrín, que presentó un incremento del 0,01%, pero tampoco fue estadísticamente significativo ($p=0,687$).

PPIA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	0,00	0,01	0,719	-0,08	0,04
Endrín	0,01	0,04	0,687	-0,09	0,21
Diendrín	0,00	0,01	0,703	-0,06	0,03

n=96, EE: error estándar

El PPIA frente al grupo de los endosulfanes no presentó modificaciones estadísticamente significativas, y sólo en el caso del endosulfán sulfato se observó una disminución de 0,03% cercana a la significación marginal ($p=0,102$). Para el endosulfán II la reducción fue del 0,01% pero tampoco fue significativa ($p=0,763$).

PPIA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	0,00	0,01	0,763	-0,03	0,05
Endosulfán II	-0,01	0,10	0,763	-0,54	0,29
Endosulfán diol	0,00	0,01	0,776	-0,03	0,01
Endosulfán éter	0,00	0,00	0,862	-0,01	0,02
Endosulfán lactona	0,00	0,00	0,399	0,00	0,03
Endosulfán sulfato	-0,03	0,01	0,102	-0,16	0,00
Σ Endosulfán	0,00	0,02	0,854	-0,09	0,06

n=96, EE: error estándar

El PPIA tampoco presentó asociaciones estadísticamente significativas con el grupo del DDT y sus derivados, y sólo el *o,p'*-DDT, presentó una reducción de 0,03% ($p=0,425$), los otros derivados no evidenciaron modificaciones.

PPCI y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	-0,03	0,04	0,425	-0,33	0,06
<i>p,p'</i> -DDT	0,00	0,01	0,462	-0,04	0,01
<i>p,p'</i> -DDE	0,00	0,02	0,627	-0,11	0,04
<i>o,p'</i> -DDD	0,00	0,01	0,670	-0,05	0,02
Σ DDT	0,00	0,03	0,944	-0,11	0,09

n=96, EE: error estándar

El porcentaje de piezas intermedias anormales frente a lindano, vinclozolina, hexaclorobenceno, metoxicloro y mírex no presentó asociaciones estadísticamente significativas, y sólo el HCB presentó una reducción de 0,03% cercana a la significación marginal ($p=0,135$). La vinclozolina y el metoxicloro presentaron también tendencias a la reducción de 0,02 y 0,01%, pero tampoco presentaron significación estadística ($p=0,205$ y $p=0,444$) respectivamente. Mírex presentó un incremento de 0,01% pero tampoco fue estadísticamente significativo ($p=0,548$).

PPIA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	0,00	0,02	0,642	-0,04	0,12
Vinclozolina	-0,02	0,01	0,205	-0,14	0,01
HCB	-0,03	0,01	0,135	-0,15	0,00
Metoxicloro	-0,01	0,01	0,444	-0,09	0,02
Mírex	0,01	0,02	0,548	-0,03	0,12

n=96, EE: error estándar

El porcentaje de cabezas anormales (PCA) no estuvo estadísticamente asociado al grupo de la drinas, sólo el aldrín presentó un incremento de 1,02 cercano a la significación marginal ($p=0,108$). El endrín presentó una reducción de 1,01 y el dieldrín un incremento de 1, pero estos no fueron estadísticamente significativos ($p=0,623$ y $p=0,990$, respectivamente).

PCA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	1,02	1,01	0,108	-1,00	1,04
Endrín	-1,01	1,02	0,623	-1,05	1,03
Dieldrín	1,00	1,01	0,990	-1,02	1,02

n=96, EE: error estándar

Frente al grupo de los endosulfanes, el PCA sólo en el caso de endosulfán I presentó una reducción de 1,01 cercano a la significación marginal ($p=0,146$), el endosulfán II y el diol, presentaron un incremento de la misma magnitud pero este no fue estadísticamente significativo ($p=0,755$ y $p=0,399$). Endosulfán éter y endosulfán lactona presentaron una reducción de 1 pero esta tampoco fue estadísticamente significativa ($p=0,720$ y $p=0,607$).

PCA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	-1,01	1,01	0,146	-1,03	1,00
Endosulfán II	1,01	1,03	0,755	-1,05	1,08
Endosulfán diol	1,01	1,01	0,399	-1,01	1,02
Endosulfán éter	-1,00	1,01	0,720	-1,01	1,01
Endosulfán lactona	-1,00	1,01	0,607	-1,01	1,01
Σ Endosulfán	1,01	1,01	0,437	-1,02	1,04

n=96, EE: error estándar

El PCA no presentó asociaciones estadísticamente significativas frente al DDT y su derivados, el mayor incremento fue de 1,02% ($p=0,319$). El p,p' -DDT y el DDE presentaron un decremento de 1 y el DDD un incremento de la misma magnitud, pero ninguno fue estadísticamente significativo ($p=0,520$, $p=0,980$ y $p=0,743$, respectivamente).

PCA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	1,02	1,02	0,319	-1,02	1,06
<i>p,p'</i> -DDT	-1,00	1,01	0,520	-1,02	1,01
<i>p,p'</i> -DDE	-1,00	1,01	0,984	-1,03	1,03
<i>o,p'</i> -DDD	1,00	1,01	0,743	-1,02	1,02
Σ DDT	1,00	1,02	0,946	-1,03	1,03

n=96, EE: error estándar

Para el caso del porcentaje de las cabezas anormales sólo el hexaclorobenceno presentó una reducción de 1,02 cercana a la significación marginal ($p=0,158$). El metoxicloro y el mírex presentaron reducciones de 1 y 1,01% no estadísticamente significativas ($p=0,856$ y $p=0,480$), y en el caso del lindano y la vinclozolina el incremento fue de 1, pero tampoco fueron estadísticamente significativos ($p=0,756$ y $p=0,699$).

PCA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	1,00	1,01	0,756	-1,02	1,03
Vinclozolina	1,00	1,01	0,699	-1,02	1,03
HCB	-1,02	1,01	0,158	-1,04	1,01
Metoxicloro	-1,00	1,01	0,856	-1,02	1,02
Mírex	-1,01	1,01	0,480	-1,04	1,02

n=96, EE: error estándar

En el estudio del porcentaje de flagelos anormales (PFA) y su relación con el grupo de aldrín/dieldrín/endrín, el dieldrín presentó un decremento estadísticamente significativo de 1,18% el cual fue marginalmente significativo ($p=0,078$). El endrín presentó un incremento de 1,18 y el aldrín otro de 1,01, pero estos no fueron estadísticamente significativos ($p=0,484$ y $p=0,911$, respectivamente).

PFA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	1,01	1,11	0,911	-1,22	1,25
Endrín	1,18	1,26	0,484	-1,35	1,87
Dieldrín	-1,18	1,10	0,078	-1,43	1,02

n=96, EE: error estándar

Respecto al grupo de los endosulfanes, el porcentaje de flagelos anormales presentó reducciones marginalmente significativas frente al endosulfán I y II de 1,17 y 1,73 ($p=0,63$ y $p=0,068$), respectivamente. Para el caso del endosulfán diol, éter y lactona presentaron incrementos de 1, 1,01 y 1,02%, pero estos no fueron estadísticamente significativos, el endosulfán sulfato y el conjunto de todos los endosulfanes presentaron reducciones de 1,06 y 1,03% respectivamente, aunque tampoco fueron estadísticamente significativos ($p=0,540$ y $p=0,834$) respectivamente.

PFA y concentración de plaguicidas

Compuestos	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	-1,17	1,09	0,063	-1,38	1,01
Endosulfán II	-1,73	1,34	0,068	-3,10	1,04
Endosulfán diol	1,00	1,07	0,981	-1,14	1,14
Endosulfán éter	1,01	1,06	0,911	-1,11	1,13
Endosulfán lactona	1,02	1,06	0,780	-1,01	1,14
Endosulfán sulfato	-1,06	1,11	0,540	-1,30	1,15
Σ Endosulfán	-1,03	1,13	0,834	-1,31	1,24

n=96, EE: error estándar

El porcentaje de flagelos anormales (PFA) frente al DDT y sus derivados no evidenciaron asociaciones estadísticamente significativas, pero el DDD presentó una tendencia al incremento de 1,07% ($p=0,388$) y el *o,p'*-DDT, el *p,p'*-DDT y el DDE mostraron reducciones de 1,02, 1,05 y 1,03 ($p=0,897$, $p=0,495$ y $p=0,825$) respectivamente.

PFA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	-1,02	1,20	0,897	-1,46	1,39
<i>p,p'</i> -DDT	-1,05	1,07	0,495	-1,20	1,09
<i>p,p'</i> -DDE	-1,03	1,13	0,825	-1,30	1,23
<i>o,p'</i> -DDD	1,07	1,08	0,388	-1,10	1,26
Σ DDT	1,02	1,16	0,900	-1,31	1,36

n=96, EE: error estándar

Por último, en el caso del metoxicloro, hubo una reducción de 1,15% cercana a la significación marginal ($p=0,136$). Para el caso del lindano, vinclozolina, hexaclorobenceno y mírex todos presentaron reducciones de 1,08, 1,05, 1,06 y 1,04% que no fueron estadísticamente significativas ($p=0,560$, $0,659$, $0,573$ y $0,742$, respectivamente).

PFA y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	-1,08	1,13	0,560	-1,38	1,19
Vinclozolina	-1,05	1,11	0,659	-1,28	1,17
HCB	-1,06	1,11	0,573	-1,31	1,16
Metoxicloro	-1,15	1,10	0,136	-1,40	1,05
Mírex	-1,04	1,12	0,742	-1,31	1,21

n=96, EE: error estándar

El índice de teratozoospermia (IT) no presentó asociaciones estadísticamente significativas frente al grupo de aldrín/dieldrín/endrín, incluso ni siquiera presentaron variaciones en los porcentajes de las mismas.

IT y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	0,00	0,00	0,499	0,00	0,00
Endrín	0,00	0,00	0,548	0,00	0,00
Dieldrín	0,00	0,00	0,836	0,00	0,00

n=96, EE: error estándar

Tampoco se observaron variaciones frente a los endosulfanes y sólo el endosulfán diol presentó una variación mínima (<0,01) estadísticamente significativa (p=0,037).

IT y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	0,00	0,00	0,447	0,00	0,00
Endosulfán II	0,00	0,00	0,339	0,00	0,00
Endosulfán diol	0,00	0,00	0,037	0,00	0,00
Endosulfán éter	0,00	0,00	0,551	0,00	0,00
Endosulfán lactona	0,00	0,00	0,198	0,00	0,00
Endosulfán sulfato	0,00	0,00	0,417	0,00	0,00
Σ Endosulfán	0,00	0,00	0,016	0,00	0,00

n=96, EE: error estándar

En el caso del índice de teratozoospermia (IT) frente al grupo del DDT y derivados, sólo se mostró una variación mínima en el caso del *o,p'*-DDT, la cual fue estadísticamente significativa (p=0,039), los otros derivados no mostraron variaciones y tampoco se observó significación estadística alguna.

IT y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	0,00	0,00	0,039	0,00	0,00
<i>p,p'</i> -DDT	0,00	0,00	0,392	0,00	0,00
<i>p,p'</i> -DDE	0,00	0,00	0,777	0,00	0,00
<i>o,p'</i> -DDD	0,00	0,00	0,675	0,00	0,00
Σ DDT	0,00	0,00	0,571	0,00	0,00

n=96, EE: error estándar

En el caso del IT y el lindano, vinclozolina, hexaclorobenceno, metoxicloro y mírex, sólo el HCB mostró una relación mínima que fue estadísticamente significativa (p=0,044), el mírex presentó una relación semejante pero sólo cercana a la significación marginal (p=0,185).

IT y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	0,00	0,00	0,855	0,00	0,00
Vinclozolina	0,00	0,00	0,970	0,00	0,00
HCB	0,00	0,00	0,044	0,00	0,00
Metoxicloro	0,00	0,00	0,772	0,00	0,00
Mírex	0,00	0,00	0,185	0,00	0,00

n=96, EE: error estándar

4.7.4 Análisis bivariante para las hormonas del eje reproductivo masculino y exposición a plaguicidas organoclorados

Los datos numéricos correspondientes a las determinaciones hormonales no presentaron una distribución normal, a excepción de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) en su transformación a la raíz cuadrada. Por esta razón se utilizó la transformación logarítmica además de la raíz cuadrada.

Para el caso del grupo de aldrín/dieldrín/endrín, inhibina B no presentó ninguna asociación estadísticamente significativa, y sólo con aldrín presentó una leve tendencia negativa -1,02 ng/ml (p=0,546).

Inhibina B y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	-1,02	1,04	0,546	-1,10	1,05
Endrín	1,01	1,04	0,864	-1,07	1,08
Dieldrín	1,02	1,04	0,630	-1,06	1,10

n=206, EE: error estándar

Con respecto al grupo de los endosulfanes, inhibina B tampoco presentó ninguna asociación estadísticamente significativa, pero para endosulfán I, endosulfán éter y el endosulfán sulfato, la tendencia fue negativa, los primeros dos de -1,02 y el tercero de -1,03 (p=0,523, p=0,447 y p=0,439, respectivamente). El endosulfán II, el endosulfán diol y el endosulfán lactona presentaron tendencias positivas con incrementos de 1,10, 1,01 y 1,03 (p=0,297, p=0,625 y p=0,253), respectivamente.

Inhibina B y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	-1,02	1,04	0,523	-1,10	1,05
Endosulfán II	1,10	1,10	0,297	-1,09	1,33
Endosulfán diol	1,01	1,03	0,625	-1,04	1,07
Endosulfán éter	-1,02	1,02	0,447	-1,07	1,03
Endosulfán lactona	1,03	1,02	0,253	-1,02	1,08
Endosulfán sulfato	-1,03	1,03	0,439	-1,09	1,04
Σ Endosulfán	1,01	1,05	0,901	-1,09	1,11

n=206, EE: error estándar

Inhibina B tampoco presentó ninguna asociación estadísticamente significativa con el DDT y sus derivados, y sólo el *p,p'*-DDT presentó una tendencia positiva con un incremento de 1,03 ($p=0,345$), mientras que el *o,p'*-DDT, el DDE y el DDD mostraron decrementos de -1,02, -1,04 y -1,03 ($p=0,785$, $p=0,489$ y $p=0,425$), respectivamente.

Inhibina B y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	-1,02	1,08	0,785	-1,19	1,14
<i>p,p'</i> -DDT	1,03	1,03	0,345	-1,03	1,09
<i>p,p'</i> -DDE	-1,04	1,05	0,489	-1,14	1,07
<i>o,p'</i> -DDD	-1,03	1,03	0,425	-1,10	1,04
Σ DDT	1,00	1,06	0,990	-1,13	1,13

n=206, EE: error estándar

La relación de inhibina B presentó un incremento cercano a la significación marginal con el hexaclorobenceno de 1,05 ng/ml ($p=0,134$), pero tampoco presentó ninguna asociación estadísticamente significativa con el lindano, la vinclozolina, el metoxicloro o el mírex, pero en el caso de los primeros la tendencia fue positiva con incrementos de 1,05 y 1,02 ng/ml, y en el caso de los últimos con decrementos de 1,00 y 1,04 ng/ml ($p=0,301$, $0,703$, $0,908$ y $0,436$), respectivamente.

Inhibina B y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	1,05	1,04	0,301	-1,04	1,14
Vinclozolina	1,02	1,04	0,703	-1,07	1,11
HCB	1,05	1,04	0,134	-1,02	1,13
Metoxicloro	-1,00	1,04	0,908	-1,07	1,07
Mírex	-1,04	1,05	0,436	-1,15	1,06

n=206, EE: error estándar

La hormona FSH no presentó asociaciones estadísticamente significativas cuando se analizó frente al grupo de las drinas, sólo el endrín presentó una tendencia a la reducción en -1,05 (p=0,238) y el aldrín y el dieldrín presentaron incrementos de 1 y 1,03 (p=0,965 y p=0,484), respectivamente.

FSH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	1,00	1,05	0,965	-1,09	1,09
Endrín	-1,05	1,05	0,238	-1,15	1,04
Dieldrín	1,03	1,05	0,484	-1,06	1,14

n=206, EE: error estándar

La hormona FSH tampoco presentó asociaciones estadísticamente significativas con el grupo de los endosulfanes. Endosulfán II y endosulfán diol presentaron tendencias hacia la reducción en -1,01 y -1,02 respectivamente, aunque éstas no fueron estadísticamente significativas (p=965 y p=654). Endosulfán I, endosulfán éter, endosulfán lactona y endosulfán sulfato mostraron incrementos muy semejantes de 1,03, 1,02, 1,02 y 1,01 (p=0,512, p=0,529, p=0,591, y p=0,768), respectivamente.

FSH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	1,03	1,05	0,512	-1,06	1,13
Endosulfán II	-1,01	1,12	0,965	-1,26	1,25
Endosulfán diol	-1,02	1,03	0,654	-1,09	1,05
Endosulfán éter	1,02	1,03	0,529	-1,04	1,08
Endosulfán lactona	1,02	1,03	0,591	-1,04	1,07
Endosulfán sulfato	1,01	1,04	0,768	-1,07	1,09
Σ Endosulfán	-1,01	1,06	0,911	-1,13	1,12

n=206, EE: error estándar

FSH y DDT y sus derivados no presentaron asociaciones estadísticamente significativas, y sólo el DDD presentó un decremento de 1,06 cercano a la significación marginal ($p=0,136$), el DDE presentó una reducción idéntica, pero menos significativa ($p=0,322$). El *o,p'*-DDT y el *p,p'*-DDT presentaron ambos incrementos de 1,13 y 1,01, el primero más cercano a la significación marginal, pero el segundo definitivamente no significativo ($p=0,205$ y $p=0,709$, respectivamente).

FSH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i>-DDT	1,13	1,10	0,205	-1,07	1,36
<i>p,p'</i>-DDT	1,01	1,04	0,709	-1,06	1,09
<i>p,p'</i>-DDE	-1,06	1,06	0,322	-1,20	1,06
<i>o,p'</i>-DDD	-1,06	1,04	0,136	-1,15	1,02
Σ DDT	-1,06	1,08	0,402	-1,23	1,09

n=206, EE: error estándar

La hormona FSH no presentó asociaciones estadísticamente significativas con lindano, vinclozolina, hexaclorobenceno, metoxicloro o mírex. Lindano y metoxicloro presentaron incrementos de 1,03 y la vinclozolina de 1,04 ($p=0,610$, $p=0,551$ y $p=0,498$) respectivamente, y el hexaclorobenceno y el mírex presentaron decrementos de -1,03 y -1,05 ($p=0,464$, y $p=0,456$) respectivamente.

FSH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	1,03	1,05	0,610	-1,08	1,14
Vinclozolina	1,04	1,05	0,498	-1,07	1,15
HCB	-1,03	1,04	0,464	-1,12	1,06
Metoxicloro	1,03	1,04	0,551	-1,06	1,11
Mírex	-1,05	1,06	0,456	-1,18	1,08

n=206, EE: error estándar

LH no presentó asociaciones estadísticamente significativas con el grupo de aldrín/dieldrín/endrín, todas ellas presentaron incrementos de 1,02, 1,01 y 1 ng/ml ($p=0,431$, $p=0,789$ y $p=0,957$), respectivamente.

LH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	1,02	1,03	0,431	-1,04	1,09
Endrín	1,01	1,03	0,789	-1,05	1,07
Dieldrín	1,00	1,03	0,957	-1,06	1,07

n=206, EE: error estándar

LH no se asoció con el residuo de los endosulfanes, sólo con el endosulfán diol y la sumatoria de todos presentó incrementos, marginalmente significativo en el primer caso de 1,04 ng/ml ($p=0,061$), y en el segundo un incremento significativo de 1,03, ($p=0,007$). El endosulfán I presentó un incremento de 1,05 cercano a la significación marginal ($p=0,119$) seguido del endosulfán éter con un incremento de 1,03 ng/ml ($p=0,194$). Los endosulfanes lactona y sulfato presentaron tendencias al incrementos de 1,02 y 1,03 ($p=0,373$ y $p=0,261$). El endosulfán II presentó una reducción de -1,00 ng/ml, el cual fue el menos significativo de todos los endosulfanes ($p=0,962$). Cabe destacar que en el conjunto, la Σ endosulfanes presentó un incremento de mayor magnitud, 1,11, el cual a su vez también presentó la máxima significación estadística ($p=0,007$).

LH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	1,05	1,03	0,119	-1,01	1,11
Endosulfán II	-1,00	1,08	0,962	-1,17	1,16
Endosulfán diol	1,04	1,02	0,061	1,00	1,09
Endosulfán éter	1,03	1,02	0,194	-1,01	1,07
Endosulfán lactona	1,02	1,02	0,373	-1,02	1,06
Endosulfán sulfato	1,03	1,03	0,261	-1,02	1,09
Σ Endosulfán	1,11	1,04	0,007	1,03	1,20

n=206, EE: error estándar

La hormona luteinizante (LH) presentó reducciones cercanas a las marginalmente significativas con el *o,p'*-DDT y el *p,p'*-DDT de -1,10 y 1,04 ng/ml, (p=0,123 y p=0,131) respectivamente. Pero frente al DDD, la reducción fue de sólo -1,02 y el DDE un incremento de la misma magnitud, pero sin significación estadística (p=0,663) en ambos casos.

LH y concentración de plaguicidas

Plaguicida	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	-1,10	1,07	0,123	-1,25	1,03
<i>p,p'</i> -DDT	-1,04	1,03	0,131	-1,09	1,01
<i>p,p'</i> -DDE	1,02	1,04	0,663	-1,07	1,10
<i>o,p'</i> -DDD	-1,02	1,05	0,663	-1,13	1,08

n=206, EE: error estándar

La hormona luteinizante presentó un incremento marginalmente significativo frente a metoxicloro de 1,06 (p=0,055) y de 1,03, pero no significativo frente al lindano y el mírex (p=0,400 y p=0,436, respectivamente). El hexaclorobenceno y la vinclozolina presentaron reducciones de -1,04 y -1, tampoco estadísticamente significativas (p=0,202 y p=0,937).

LH y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	1,03	1,04	0,400	-1,04	1,11
Vinclozolina	-1,00	1,04	0,937	-1,07	1,07
HCB	-1,04	1,03	0,202	-1,10	1,02
Metoxicloro	1,06	1,03	0,055	1,00	1,12
Mírex	1,03	1,04	0,436	-1,05	1,12

n=206, EE: error estándar

La globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), presentó incrementos no significativos frente al grupo de aldrín/dieldrín/endrín aunque el dieldrín presentó un incremento de 1,04 ng/ml cercano a la significación marginal ($p=0,160$). En el caso del aldrín y del endrín presentaron tendencias al incremento de 1,02 y 1,01 ($p=0,349$ y $p=0,630$) respectivamente.

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	1,02	1,03	0,349	-1,03	1,08
Endrín	1,01	1,03	0,630	-1,04	1,07
Dieldrín	1,04	1,03	0,160	-1,02	1,10

n=206, EE: error estándar

Cuando se analizó la hormona SHBG y el grupo de los endosulfanes, sólo el compuesto endosulfán lactona presentó una reducción estadísticamente significativa de 1,05 ($p=0,001$). Pero con los demás endosulfanes las asociaciones no fueron ni cercanas a la significación estadística marginal, frente al endosulfán I y el endosulfán éter también se asoció con reducciones de 1,02 y 1,01 ($p=0,398$ y $p=0,704$), respectivamente. En el caso del endosulfán II, el endosulfán diol y el endosulfán sulfato con incrementos de 1,05 y 1,02 en los últimos dos casos ($p=0,432$, $p=0,268$ y $0,426$, respectivamente).

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	-1,02	1,03	0,398	-1,07	1,03
Endosulfán II	1,05	1,07	0,432	-1,08	1,20
Endosulfán diol	1,02	1,02	0,268	-1,02	1,06
Endosulfán éter	-1,01	1,02	0,704	-1,04	1,03
Endosulfán lactona	-1,05	1,02	0,001	-1,09	-1,02
Endosulfán sulfato	1,02	1,02	0,426	-1,03	1,06
Σ Endosulfán	1,01	1,03	0,701	-1,05	1,08

n=206, EE: error estándar

El estudio de la asociación entre la hormona SHBG y el DDT y sus derivados no presentó ninguna asociación estadísticamente significativa, y sólo en el caso de *p,p'*-DDT se presentó un decremento cercano a la significación marginal de 1,03 (p=0,135). En el caso de DDE el decremento fue de 1,01 (p=0,827).

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	1,00	1,06	0,929	-1,11	1,12
<i>p,p'</i> -DDT	-1,03	1,02	0,135	-1,08	1,01
<i>p,p'</i> -DDE	-1,01	1,04	0,827	-1,08	1,06
<i>o,p'</i> -DDD	1,00	1,02	0,876	-1,04	1,05
Σ DDT	-1,02	1,04	0,671	-1,11	1,07

n=206, EE: error estándar

Mírex presentó una reducción estadísticamente significativa de 1,07 (p=0,050), y metoxicloro una reducción no significativa de 1,03 (p=0,232). En el caso de lindano, vinclozolina y hexaclorobenceno, todos presentaron incrementos no significativos de 1,01, 1,04 y 1,02 (p=0,846, p=0,220 y p=0,481), respectivamente.

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	1,01	1,03	0,846	-1,06	1,07
Vinclozolina	1,04	1,03	0,220	-1,02	1,10
HCB	1,02	1,03	0,481	-1,03	1,07
Metoxicloro	-1,03	1,02	0,232	-1,08	1,02
Mírex	-1,07	1,04	0,050	-1,15	1,00

n=206, EE: error estándar

Cuando analizamos la hormona SHBG que presentaba una distribución normal, no mostró asociaciones estadísticamente significativas con el grupo de las drinas (Aldrín, Dieldrín y Endrín). Únicamente para el caso del dieldrín, se evidenció una tendencia al incremento en 0,01 cercano a la significación marginal ($p=0,112$).

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	P	IC 95%	
Aldrín	0,00	0,00	0,348	-0,01	0,04
Endrín	0,00	0,00	0,621	-0,01	0,03
Dieldrín	0,01	0,01	0,112	-0,00	0,06

n=206, EE: error estándar

Con respecto al grupo de los endosulfanes, la variable normalizada de la SHBG nuevamente presentó casi las mismas significaciones estadísticas, y las variaciones sólo cambiaron en cuanto a magnitud, pero esto se debe a la función utilizada en la normalización, sólo el endosulfán lactona redujo en 0,021, con significación estadística ($p<0,001$).

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	-0,004	0,004	0,336	-0,037	0,004
Endosulfán II	0,017	0,028	0,439	-0,040	0,213
Endosulfán diol	0,003	0,003	0,253	-0,002	0,024
Endosulfán éter	-0,001	0,002	0,551	-0,013	0,004
Endosulfán lactona	-0,021	0,002	0,000	-0,050	-0,004
Endosulfán sulfato	0,002	0,003	0,411	-0,004	0,026
Σ Endosulfán	0,001	0,007	0,665	-0,018	0,043

n=206, EE: error estándar

Las relaciones con la variable SHBG normalizada con su raíz cuadrada fueron esencialmente las mismas, salvo en cuanto a las magnitudes, y esto se debe a la transformación utilizada.

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i> -DDT	0,000	0,020	0,960	-0,080	0,072
<i>p,p'</i> -DDT	-0,007	0,003	0,112	-0,037	0,000
<i>p,p'</i> -DDE	0,000	0,008	0,844	-0,038	0,025
<i>o,p'</i> -DDD	0,000	0,004	0,995	-0,014	0,015
Σ DDT	-0,003	0,012	0,609	-0,075	0,026

n=206, EE: error estándar

SHBG y sus relaciones con lindano, vinclozolina, hexaclorobenceno, metoxicloro y mírex, fueron aproximadamente iguales, aunque con mírex resultó una reducción de 0,036 ng/ml, con una significación ligeramente mayor (p=0,036).

SHBG y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	0,000	0,006	0,938	-0,025	0,021
Vinclozolina	0,005	0,006	0,332	-0,006	0,050
HCB	0,001	0,004	0,568	-0,008	0,026
Metoxicloro	-0,006	0,004	0,209	-0,039	0,002
Mírex	-0,036	0,008	0,036	-0,135	-0,000

n=206, EE: error estándar

Por último, testosterona presentó incrementos estadísticamente significativos con aldrín y endrín de 1,07 y 1,09 ($p=0,006$ y $p=0,000$), respectivamente. Para el caso del dieldrín, el incremento fue marginalmente significativo de 1,05 ($p=0,065$).

Testosterona y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Aldrín	1,07	1,02	0,006	-1,21	1,11
Endrín	1,09	1,02	0,000	-1,05	1,14
Diieldrín	1,05	1,03	0,065	1,00	1,10

n=206, EE: error estándar

En cuanto a la relación de testosterona con endosulfán II, y endosulfán diol presentaron incrementos estadísticamente significativos de 1,18 y 1,04 ($p=0,004$ y $p=0,029$) respectivamente. Endosulfán I y endosulfán sulfato presentaron también incrementos, pero estos no fueron estadísticamente significativos. Endosulfán lactona presentó una reducción significativa de 1,03 ($p=0,033$), y endosulfán éter presentó también una reducción de 1,01 ng/ml, pero en este caso no fue estadísticamente significativa ($p=0,648$).

Testosterona y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Endosulfán I	1,02	1,02	0,363	-1,03	1,07
Endosulfán II	1,18	1,06	0,004	-1,05	1,33
Endosulfán diol	1,04	1,02	0,029	-1,00	1,08
Endosulfán éter	-1,01	1,02	0,648	-1,04	1,02
Endosulfán lactona	-1,03	1,01	0,033	-1,06	-1,00
Endosulfán sulfato	1,00	1,02	0,829	-1,04	1,05
Σ Endosulfán	1,10	1,03	0,002	1,04	1,17

n=206, EE: error estándar

Testosterona en relación a DDE y a DDD mostró un incremento significativo de 1,10 y 1,06 ng/ml ($p=0,003$ y $0,008$), respectivamente. En el caso de *o,p'*-DDT y el *p,p'*-DDT se mostraron reducciones, pero en este caso no estadísticamente significativas de 1,01 y 1 ($p=0,879$ y $0,832$), respectivamente, aunque en el conjunto la Σ DDT presentaron, un incremento significativo de 1,16 ($p<0,001$).

Testosterona y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
<i>o,p'</i>-DDT	-1,01	1,05	0,879	-1,11	1,09
<i>p,p'</i>-DDT	-1,00	1,02	0,832	-1,04	1,03
<i>p,p'</i>-DDE	1,10	1,03	0,003	1,03	1,17
<i>o,p'</i>-DDD	1,06	1,02	0,008	1,01	1,10
Σ DDT	1,16	1,04	0,000	1,07	1,25

n=206, EE: error estándar

Testosterona también presentó incrementos significativos frente a lindano, hexaclorobenceno y metoxicloro de 1,07, 1,10 y 1,05 ng/ml ($p=0,012$, $0,000$ y $0,033$), respectivamente. Pero frente a la vinclozolina el incremento no fue significativo y frente al mirex, la reducción tampoco fue significativa ($p=0,987$ y $0,925$), respectivamente.

Testosterona y concentración de plaguicidas

Compuesto	β	EE	p	IC 95%	
Lindano	1,07	1,03	0,012	1,02	1,13
Vinclozolina	1,00	1,03	0,987	-1,05	1,06
HCB	1,10	1,02	0,000	1,06	1,15
Metoxicloro	1,05	1,02	0,033	1,00	1,09
Mírex	-1,00	1,03	0,925	-1,07	1,06

n=206, EE: error estándar

Discusión

5. Discusión

Durante los últimos 15 años hemos estado asistiendo a un interés creciente por parte de los clínicos, las autoridades sanitarias, e incluso la población en general, sobre el efecto que pudieran tener los factores ambientales, en el sentido más amplio de la palabra, sobre la salud reproductiva masculina. Tanto es así, que los estudios que denuncian una disminución de la cuenta espermática y un deterioro en la calidad seminal, con tendencias negativas temporales y grandes diferencias regionales, han trascendido el ámbito de las publicaciones científicas para ser un tema habitual en la prensa diaria no especializada. La publicación, en 1992, por Carlsen y colaboradores, del meta-análisis de 61 estudios realizados entre 1938 y 1990 que sugería una tendencia hacia la caída significativa en la concentración espermática en el varón sano fue el detonante de esta percepción negativa del binomio salud reproductiva y medioambiente actual. La información sobre calidad seminal revisada en ese artículo científico pronto

se vio acompañada de nuevos datos, no menos preocupantes, sobre el aumento en la incidencia de cáncer de testículo y la mayor prevalencia temporal y las diferencias regionales de las malformaciones del tracto genitourinario masculino (Toppari et al., 1996).

A este respecto, la hipótesis conocida como síndrome de disgenesia testicular liga las tres entidades, fertilidad, cáncer y malformación y reconoce una patogenia común para los tres procesos en la que factores exógenos al individuo, por ejemplo la exposición materno-infantil a compuestos químicos, juegan un papel primordial (Skkakebaek et al., 2001; Olea y Avivar, 2003). Dentro de este contexto, la hipótesis de trabajo es que la salud reproductiva del hombre occidental podría verse comprometida por factores ambientales, entre los que se incluyen hábitos personales, que pudieran afectar a la fertilidad humana.

En lo que se refiere específicamente a calidad seminal, es cierto que la hipótesis que defiende una asociación entre ocupación/medioambiente y cuenta espermática no es nueva. De hecho hay una tradición investigadora, clínica y epidemiológica que sitúa ciertas actividades, y por ende determinadas exposiciones de carácter ocupacional, en el punto de mira de los expertos en salud reproductiva (Olea y Fernández, 2007). Pero lo realmente novedoso es la incorporación, en estos últimos años, de la exposición ambiental de la población general en los estudios de los problemas de la salud reproductiva masculina, en general y del síndrome de disgenesia testicular, en particular.

Nuestro grupo de trabajo investiga, desde hace más de quince años, la hipótesis de disrupción endocrina en salud humana, según la cual la exposición humana a compuestos químicos que pueden interaccionar con los receptores nucleares, o modificar el patrón de síntesis o degradación de las hormonas, desencadenaría problemas en el desarrollo y la funcionalidad de los sistemas hormonales. A este respecto, la exposición humana a disruptores endocrinos con actividad hormonal/anti-hormonal, como es el caso de algunos plaguicidas organoclorados, 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. Este trabajo se encuadra dentro de esta hipótesis conceptual y trata de analizar si la exposición ambiental afecta a la salud reproductiva de una población de jóvenes andaluces.

Cierto es que la disrupción endocrina se había fundamentado, casi exclusivamente, en estudios experimentales y observaciones en especies animales que demostraban el carácter estrogénico/anti-estrogénico y androgénico/anti-androgénico de ciertos compuestos químicos, hasta que estudios más recientes han atribuido un papel de mayor peso a los disruptores endocrinos en la génesis de las malformaciones del tracto genitourinario en varones (García-Rodríguez et al., 1996; Fernández et al., 2007) y cáncer de mama en mujer (Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2007). Ha sido necesario el desarrollo de biomarcadores de exposición y efecto (Focus, 2006), más específicos que la medida aislada de unos pocos contaminantes químicos, para que estas asociaciones salgan a la luz (Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004).

Parámetros de calidad seminal

Con anterioridad a la publicación del meta-análisis de Carlsen, la caída en el recuento espermático ya fue sugerida en los años setenta cuando en trabajos realizados en Iowa City y en Nueva York (Nelson y Bunge, 1974) se mostraban valores medios de 48 y 79 millones de espermatozoides por ml en un grupo de 390 y 1300 individuos seleccionados pre-vasectomía y se comparaban con los 107 millones/ml, de un grupo de 1000 individuos, parejas de mujeres embarazadas (MacLeod y Gold, 1951), reclutados en la década de los 50. A partir de esta publicación, el debate quedó abierto y mientras que MacLeod y Wang (1979), tomando en consideración esta información y la generada por ellos mismos, concluyeron que no había evidencia para preconizar una caída en el recuento seminal, James y colaboradores analizando 17 artículos publicados entre 1934 y 1979, concluían que había evidencia más que suficiente para sugerir una tendencia a la disminución de la calidad seminal. A pesar del interés del tema, excepto en dos publicaciones que investigaron por una parte la calidad seminal de donantes sanos en Washington (Leto y Frensilli, 1981) y otro trabajo que investigó el efecto de la exposición compuestos orgánicos persistentes (Murature et al., 1987), lo cierto es que hasta el meta-análisis de 1992 ningún trabajo había añadido más información sobre “un efecto generalizado” perjudicial para la salud reproductiva. Por tanto, la publicación de Carlsen inició el debate especializado al sugerir que ciertamente la calidad seminal de hombres sanos había caído de 113 millones de espermatozoides/ml a un valor medio de 66 millones/ml (cercano al 50%) en un periodo de cincuenta años (Carlsen et al., 1992).

El mayor impacto del meta-análisis original de Carlsen es, sin duda, haber despertado el interés de la comunidad científica por comprobar si la hipótesis sobre un deterioro de la salud reproductiva masculina en el mundo occidental era aceptable y podría generalizarse a los diferentes colectivos interesados en este problema. Dentro de este contexto, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la salud reproductiva de un grupo de jóvenes voluntarios, reclutados en la provincia de Almería, abordando aspectos de diferente complejidad. De una parte, aquellos de una aproximación relativamente sencilla como son: i) el estudio pormenorizado de los parámetros que describen calidad seminal, ii) la exploración física de los jóvenes, y iii) la descripción hormonal del eje hipófisario-gonadal. Por otra, abordando el aspecto crucial de la salud reproductiva, como es la fertilidad de estos individuos. En ambas situaciones, se hace necesario tanto el estudio inicial como su prolongación en el tiempo con el seguimiento de la cohorte ahora establecida, siempre teniendo presente la hipótesis de trabajo: ciertos factores ambientales pueden estar modificando la capacidad reproductiva de la población joven con consecuencias difícilmente predecibles sobre la estabilidad reproductiva de la especie.

Por las razones aludidas, este trabajo pretende, además, crear la base de datos de referencia sobre parámetros seminales, cualidades físicas y niveles hormonales, en población joven para que sirva de comparación con estudios similares realizados en otras áreas geográficas y sean referencia en los estudios de tendencias temporales realizados en la misma región.

En el momento de planificación y diseño de este trabajo se fue consciente de que la heterogeneidad en términos de fertilidad de las poblaciones estudiadas, la edad y el estado socioeconómico son señaladas, sistemáticamente, como los mayores inconvenientes para llevar a cabo cualquier análisis comparativo entre poblaciones (diferencias geográficas) o de evolución en el tiempo (tendencias temporales). Además, otros factores de confusión (periodo de abstinencia), la metodología empleada para el análisis seminal, incluido el control de calidad inter- e intra-laboratorio y la misma técnica de análisis estadístico empleados pueden conducir a la obtención de conclusiones no apropiadas. De hecho, tanto el meta-análisis de Carlsen en el cual la consideración de estos factores está presente, como varios re-análisis posteriores (Swan et al., 1997) sólo han sido posibles cuando se cumplían las exigencias mínimas en el diseño de la serie. La conclusión de una caída anual en el recuento espermático de un 1,5 y 3,1%, en Europa y en Estados Unidos, respectivamente, viene, pues, sustentada

por la rigurosidad metodológica propiciada por la adecuación de los estudios que se analizaron. Nuestro trabajo tuvo presente estas recomendaciones desde su diseño para que cualquier ejercicio de comparación fuera posible.

Por otra parte, una vez acordados los criterios para el reclutamiento de la población de estudio, una de las mayores preocupaciones enunciadas por los investigadores en este campo es la subjetividad de las metodologías disponibles para la obtención de los distintos parámetros a considerar. Por ejemplo, en el caso particular del análisis seminal se han reportado, muy frecuentemente, variaciones intra- e inter-observador, así como de inter-laboratorios muy significativas que hacen que los resultados sean de muy difícil comparación (Auger et al., 2000). A este respecto, tanto la estandarización de la metodología y el establecimiento de controles de calidad apropiados, como el tamaño poblacional son factores de la mayor trascendencia. Téngase en cuenta que parámetros como la concentración espermática pueden variar de forma llamativa entre individuos. Así por ejemplo, el valor medio de espermatozoides por ml de semen eyaculado en nuestra serie es de 72 millones/ml, con una mediana de 51 millones/ml pero con un rango de 0-420 millones/ml. Generalmente, se reconoce un factor de 10 entre el cuartil 10 y el cuartil 90 (Jouannet et al., 1981). Estas diferencias se han discutido de forma exhaustiva en diferentes revisiones (Jegou et al., 1999; Auger et al., 1998; Weber 1998) y se han relacionado con tres tipos de factores de muy diversa índole: i) características de los hombres reclutados, ii) metodología empleada para el estudio seminal y el análisis de los datos, y iii) factores exógenos que puedan afectar a la producción y calidad seminal. Mientras que los dos primeros elementos son tenidos frecuentemente en consideración en las publicaciones científicas, los factores exógenos que afectan a la calidad seminal son, por lo general olvidados en esos estudios.

Uno de los puntos fuertes de este trabajo fue la integración en el programa de control de calidad establecido para todos los grupos europeos participantes centrado en el análisis de la concentración espermática, coordinado por el Departamento de Reproducción del Rigshospitalet de Copenhague en Dinamarca. El análisis de los resultados obtenidos en cada 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%.

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 representación poblacional son factores muy frecuentemente

discutidos y de gran controversia. Por ejemplo, se ha criticado que en el meta-análisis de Carlsen, doce de los estudios considerados tuvieran menos de 20 individuos y otros 29 estudios contaran con menos de 50 sujetos, número claramente insuficiente dada la variabilidad para extraer resultados concluyentes y establecer comparaciones entre poblaciones. Esto ocurre también, con frecuencia, en series de estudio temporal que reclutan menos de cincuenta individuos, propiciando que pequeñas variaciones en el protocolo de selección pueden tener consecuencias importantes en el resultado final (Auger et al., 1998) y desvirtúen las conclusiones extraídas.

En este trabajo de investigación, la población de estudio es muy homogénea. Se trata de un grupo de unos 300 jóvenes, con un rango de edad de 18 a 23 años, que presenta un hábito corporal normal ($IMC = 23,9 \text{ kg/m}^2$), con tan sólo un 3% de individuos obesos y 26% con sobrepeso. Los jóvenes declararon tener en su mayoría (98%) una salud buena o muy buena, y solo un 6% declararon haber sido tratados de forma prolongada de una dolencia crónica a lo largo de su vida. La mayor parte de los jóvenes declararon una residencia urbana (85%), coincidente con la distribución cuando se clasifican por el lugar de nacimiento de sus padres y del núcleo de población donde se desarrolló su embarazo. Es, por tanto, una población con muy bajo índice migratorio, limitado además a la provincia de Almería.

No hay diferencias raciales entre los individuos ya que todos son de raza blanca caucásica, mediterráneos, nacidos en el entorno de la provincia de Almería. Además, debido al protocolo de reclutamiento seguido, nueve de cada diez jóvenes participantes cursaban estudios universitarios y sólo diez jóvenes tenían únicamente estudios primarios. Esto justifica el número tan pequeño de jóvenes (16 sujetos) que declararon una actividad laboral distinta de los estudios secundarios o universitarios.

Jorgensen y colaboradores (Jorgensen et al., 2002) han estudiado la calidad seminal en la población joven de Dinamarca y han propuesto la realización de investigaciones similares en otros países europeos. De hecho, la serie de jóvenes daneses puede compararse ahora con la sueca, finlandesa, lituana o eslovena. Nuestro grupo de trabajo en un intento de incorporar nuestra casuística a las series del norte de Europa fue muy cuidadoso en la definición de los criterios de inclusión/exclusión y en la búsqueda de una población joven que soportara las exigencias de la comparabilidad. Desgraciadamente, nuestra población no pudo hacer uso del sistema nacional de reclutamiento para el servicio militar, como es el caso de las series del norte del continente, ya que fue abolido con anterioridad al inicio del estudio. La búsqueda de

población se centró, pues, en individuos jóvenes de fertilidad no conocida. Los sujetos seleccionados e incluidos en este estudio responden fielmente a estos requisitos pero además incluyen sujetos con diferentes grados de salud general, lo que no es el caso de la población de reclutas del norte de Europa donde no hay más que individuos sanos, aptos para el servicio militar.

En definitiva, nuestra población no tiene probada su fertilidad dada la juventud de los individuos y los hábitos culturales que coligan la paternidad a edades mayores. A este respecto, se observa una enorme disparidad en las poblacionales seleccionadas en los trabajos incluidos en el meta-análisis de Carlsen ya que hay series de hombres pareja de embarazadas, donantes de semen, pre-vasectomías, reclutas llamados a filas y grupos de jóvenes estudiantes, entre otras, lo que hace que la fertilidad de la población resultante sea muy distinta y vaya desde los hiper-fértiles que podrían darse ante una propuesta de vasectomía hasta la desconocida en grupos de jóvenes estudiantes voluntarios.

La capacidad de fecundar de un espermatozoide es un fenómeno complejo que incluye fenómenos de carácter celular y molecular. Algunos de estos factores son esenciales ya que permiten, por ejemplo, al espermatozoide alcanzar el ovocito (función cinética), interaccionar con la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (reacción del acrosoma y capacitación). También la integridad y composición del material genético son determinantes del desarrollo normal del embrión. A pesar del desarrollo de tests sofisticados que evalúan la función espermática, lo cierto es que ninguno de ellos puede indicar el potencial fértil de un hombre (Liu y Baker, 1992). En primer lugar, se ha sugerido que la concentración espermática no sería un buen indicador de fertilidad potencial ni de función testicular. En su lugar, se propone que la concentración espermática corregida por el volumen del eyaculado, que recoge las variaciones el volumen de plasma seminal, el cual no es constante, es el parámetro que debería ser usado para estimar la espermatogénesis de forma cuantitativa. Es interesante señalar que cuando así se ha hecho, el número total de espermatozoides en el eyaculado también refleja variaciones importantes en función de las zonas geográficas y las tendencias temporales frecuentemente descritas. En segundo lugar, se ha prestado especial atención a los parámetros de movilidad espermática y se ha sugerido que el parámetro que considera el número total de espermatozoides móviles pudiera ser también utilizado con objeto de cualificar a los individuos en estudio. Estas

consideraciones se han tenido en cuenta en el presente trabajo (Auger et al., 1995; Irvine et al., 1996; Jorgensen et al., 2001).

El volumen medio del eyaculado en nuestro estudio fue de 3,1 ml, con un 78% de las muestras superando los 2 ml establecidos por OMS como valor de referencia. La concentración media de espermatozoides se situó en 72 millones de espermatozoides por ml y con una mediana de 51 millones/ml. De esta manera el número total de espermatozoides eyaculados fue de 215 millones (mediana de 150), con un 81% de la población por encima del mínimo de 20 millones/ml, considerados en la actualidad como límite inferior de los valores de referencia. Es curioso que este criterio haya cambiado en los últimos años ya que esta cifra ha caído desde los 60 millones/ml considerado como límite hace 40 años, pasando por los 40 millones/ml reportados en los años 70 (Eliasson et al., 1978; Pflieger-Bruss et al., 2004), hasta los actuales 20 millones/ml considerados por la OMS (OMS, 1999).

Dentro de las series de jóvenes del norte de Europa, Tsarev y colaboradores (2005) publicaban, los parámetros seminales en una población lituana de 133 reclutas con una edad media de 19 años y los comparaban con grupos similares de Suecia (248 jóvenes) y Dinamarca (708) referidos con anterioridad por Andersen (2000) y Richthoff (2002), respectivamente. La concentración media expresada en millones de espermatozoides por ml fue de 78, 71 y 57, respectivamente para cada una de las series anteriores, lo que sitúa a nuestro grupo de estudio en un valor intermedio (72 millones/ml) entre los grupos con cifras mayores. Diferentes estudios han constatado que existen grandes diferencias regionales en los parámetros seminales de poblaciones equivalentes. De hecho, en una cohorte prospectiva longitudinal realizada en Copenhague (Carlsen et al., 2005) en la que participaron 158 jóvenes aportando una media de 12 muestras de semen durante la realización del estudio (al menos durante cinco años), la concentración de espermatozoides no superó la mediana de 41 millones/ml, lo que sitúa a la población danesa en los niveles más bajos del continente europeo, por debajo de las medianas de 41, 44, 54 y 57 descritas en Noruega, la República Checa, Finlandia y Estonia, respectivamente. La mediana de concentración en nuestra población fue de 51 millones/ml. En los estudios realizados en los países nórdicos-bálticos (Dinamarca, Noruega, Suecia, Finlandia, Estonia, Latvia y Lituania) con sujetos de edades comprendidas entre 18-20 años se ha podido constatar un gradiente este-oeste en calidad seminal que incluye los parámetros concentración espermática, recuento espermático total y porcentaje de espermatozoides

morfológicamente normales (Jorgensen et al., 2002). Los parámetros obtenidos en nuestra serie colocan a la población andaluza en una situación intermedia-alta dentro del conjunto.

A pesar de ello, la medida de los parámetros de movilidad, por otra parte, no arroja cifras tan satisfactorias como el recuento espermático, ya que la movilidad espermática total muestra una media del 59% y una mediana del 60%, sin embargo tan sólo el 50% de la población supera los parámetros de referencia establecidos por la OMS para la movilidad espermática progresiva en la actualidad (al menos un 20% de espermatozoides rápidos progresivos o en su defecto un 50% de espermatozoides con movilidad progresiva), lo que sitúa a casi la mitad (134/272) de la población por debajo de los valores de referencia. No obstante, el número total de espermatozoides móviles sitúa a la población en una media de 67 millones y una mediana de 86 millones.

Por último, la morfología espermática de la población de estudio también sitúa a nuestra cohorte de individuos en una situación particular ya que la media de espermatozoides normales estudiada siguiendo criterios estrictos de Tygerberg se sitúa en el 14% de formas normales (13% de mediana), este valor es muy similar al 13% descrito por Tsarev en su trabajo donde revisa los datos publicados para población joven en los países bálticos, con mejores parámetros seminales. Por otro lado, en nuestro estudio encontramos que un 15% de los voluntarios no superan el 5% de espermatozoides normales en el eyaculado.

Tras el análisis estadístico de los resultados, ciertas características de los jóvenes y su estilo de vida parecen ejercer un efecto sobre los parámetros seminales. Así por ejemplo, se ha encontrado una cierta asociación ($p=0,093$) entre la concentración espermática y el número total de espermatozoides y la edad, a pesar del rango tan estrecho considerado en este estudio (18-23 años), de tal manera que cada año de incremento en la edad significa un aumento medio de aproximadamente un millón de espermatozoides. Dato que es muy importante tener en cuenta si es que se van a hacer estudios prospectivos de seguimiento de la población.

De entre las variables de estilo de vida más frecuentemente descritas y asociadas con los parámetros seminales se encuentran el hábito de consumo de tabaco, que se daba en un tercio de nuestra población de estudio (33,3%), con una media de ocho cigarrillos/día, el consumo de cannabis de forma habitual declarado por un 22% de los jóvenes y el consumo de alcohol que alcanzó cerca del 70% de los jóvenes. De estas tres variables, tan sólo el consumo de tabaco parece ejercer un efecto negativo sobre el

número total de espermatozoides ($p=0,057$), que además se ve acentuado cuando se considera el consumo adicional de cannabis referido por 56 individuos en nuestro estudio ($p=0,037$). Numerosos estudios incluidos en un meta-análisis (Vine et al., 1994) han revisado y encontrado asociación entre calidad seminal y tabaco, aunque otros no han podido confirmar esta relación (Jensen et al., 2004). Otros estudios han asociado igualmente hábito tabáquico y calidad seminal, especialmente si la exposición había ocurrido durante la etapa embrionaria/fetal (madres fumadoras durante el embarazo) con una reducción de la concentración espermática del 20% respecto a los sujetos de madres no fumadoras en la gestación. La disminución alcanzaba el 48% si el consumo superaba 10 cigarrillos/día (Storgaard et al., 2003; Jensen et al., 2004 y 2005).

Es frecuente considerar esa hipótesis de trabajo que asocia la calidad espermática en la edad adulta a distintos acontecimientos ocurridos durante la etapa fetal y neonatal (embarazo y niñez), por lo que nos interesó conocer de forma particular algunas actividades de esta época que pudieran condicionar mayor exposición a contaminantes ambientales relacionados con salud reproductiva. A este respecto, uno de cada cuatro jóvenes declaró que sus madres trabajaban durante el embarazo, fundamentalmente en actividades manuales y agrícolas. Solo un 6% informaron que sus madres eran fumadoras durante su gestación. Los embarazos fueron a término en más del 90% de los casos. Ninguno de estos factores se asoció con la calidad espermática, excepto el lugar de residencia de las madres durante el embarazo, que significó una peor calidad seminal en los jóvenes ($p=0,050$), cuando las madres residieron en asentamientos urbanos durante el embarazo. En nuestro estudio el hábito tabáquico de las madres no ejerció efecto alguno sobre la calidad seminal de los hijos.

Interesante para los objetivos de este trabajo es lo que ocurrió cuando se consideraron ciertas actividades realizadas por los jóvenes, como es la ocupación ya que los que declararon estar realizando estudios universitarios presentaron una calidad espermática significativamente mejor ($p=0,009$) que los que tan sólo tenían estudios primarios. A pesar del interés de esta asociación lo cierto es que hay que tomarla con cierta cautela ya que tan solo 27 individuos de nuestra serie no son universitarios.

Algunos de los datos recogidos en la exploración física andrológica de los jóvenes parecen asociarse con los parámetros seminales. La mayor parte de los jóvenes mostró un buen desarrollo sexual secundario, agrupándose todos los individuos en los grados 4 y 5 de Tanner, excepto uno clasificado en estadio 3. Tan sólo se detectó un caso de criptorquidia unilateral derecha, aunque en 38 casos se detectaron testículos de

localización inadecuada, de los cuales dos estaban en canal inguinal y los 36 restantes estaban altos en el escroto. Al final, se clasificaron ocho jóvenes con ambos testículos fuera del escroto y 33 con uno de los testículos en localización escrotal anómala. Aún más interesante para este estudio ha sido la posibilidad de medir de forma reglada el volumen testicular mediante la utilización de un “orquidómetro estandarizado de Prader”, utilizado por los distintos centros de europeos que participaron en el estudio global. Gracias a esta metodología, sabemos que si bien el volumen medio de cada testículo es de 18,5 cc, con una mediana de 20 cc, lo cierto es que el rango de variación es amplio, yendo de 8-10 a 25 cc.

En principio, no parece haber una variación en el tamaño testicular significativa que se asocie con la edad de los jóvenes, al menos para el rango tan limitado de edades consideradas en nuestro trabajo, confirmando observaciones previas (Carlsen et al., 2005). No obstante, esta información es pertinente ya que debería ser considerada en el análisis del efecto del tamaño testicular y la calidad seminal en estudios de mayor rango de edad y en el seguimiento de los jóvenes.

Además de la medida del volumen testicular, la exploración testicular ha aportado otros datos de interés que sugieren la necesidad de incluir el examen andrológico en este tipo de trabajos. Por ejemplo, epidídimos anormales se palparon en ocho individuos, cuya anomalía principal consistió en la presencia de quistes; los vasos deferentes estuvieron ausentes a la palpación en 24 sujetos; se detectaron 27 posibles varicoceles, así como dos hidroceles. En todos los casos, los pacientes fueron derivados al urólogo para la realización de estudios complementarios. Estos datos no tendrían más importancia que su interés médico si no fuera porque se han encontrado asociados con el recuento espermático. Si son causa o consecuencia de las modificaciones de los parámetros seminales es un asunto que habrá que discutir en su momento, pero deberían ser tenidos en consideración antes de sacar conclusiones en este trabajo. Por ejemplo, la presencia de quistes epididimarios supone una caída en casi tres millones del número total de espermatozoides ($p=0,022$) y el tamaño testicular se convierte en uno de los mejores predictores de la cuenta espermática, con una relación positiva y significativa ($p < 0,010$) entre el tamaño de los testículos y el número total de espermatozoides. A este respecto, Carlsen y colaboradores (Carlsen et al., 2005) encuentran que la existencia de alguna enfermedad genital, entre las que se incluyen criptorquidismo, varicocele, infección y torsión testicular, reduce de forma significativa la concentración espermática en una serie de jóvenes daneses.

Al igual que la exploración genitourinaria nos ha aportado una información muy útil, algunos de los datos obtenidos en torno a la obtención de la muestra de semen también son dignos de consideración. En primer lugar está la estación del año de recogida de la muestra de semen, según la cual la estación en la que con mayor probabilidad el recuento espermático sería más bajo es la primavera ($p=0,015$), cuando se compara con la estación en que el recuento es más alto que es en invierno ($p=0,073$). El problema de las variaciones estacionales en el recuento espermático ha sido revisado recientemente (Jorgensen et al., 2006). En algunos estudios transversales los niveles más bajos se encuentran en los meses estivales o en otoño, otros estudios longitudinales no encuentran ninguna asociación entre estación de recogida y recuento espermático. Por ejemplo, Andolz publicaba en 2001 variaciones estacionales para los principales parámetros seminales con los niveles más altos en marzo y los menores en septiembre, después de ajustar por las variables de confusión (Andolz et al., 2001). Jorgensen confirmó estos resultados al considerar de manera conjunta los parámetros seminales obtenidos de las poblaciones europeas participantes en el estudio coordinado transversal auspiciado por la Unión Europea entre hombres de fertilidad probada, sin embargo estos resultados no se han podido confirmar entre población joven (Carlsen et al., 2005; Jorgensen et al., 2006). Durante el verano, algunos estudios realizados con trabajadores que desempeñan sus tareas tanto al aire libre como en el interior han podido comprobar reducciones similares en los parámetros seminales, excluyendo la posibilidad de que el aumento de temperatura sea el único factor asociado a la variabilidad estacional.

También, en lo que atañe a las características de recogida de la muestra de semen, el tiempo de abstinencia es del mayor interés para ser considerado entre las variables que condicionan los parámetros seminales. En nuestra serie, en el 93% de los casos se superaron las 48 horas, situándose el tiempo medio de abstinencia (media/mediana: 75,3/67,0 horas) en torno a los tres días, de acuerdo con el protocolo establecido y las recomendaciones dadas a los voluntarios. Es especialmente importante cuidar estos aspectos en cualquier diseño de estudio de calidad seminal ya que ambos factores tienen una influencia considerable sobre las variables seminales. En primer lugar, se ha descrito que el tiempo de abstinencia tiene un efecto positivo en el recuento espermático que se ve incrementado de forma lineal entre el día 0 y el 4º día, disminuyendo el ritmo de incremento entre el día 4º y 6º, estabilizándose con tiempos de abstinencia superiores a los seis días. Es interesante tener en cuenta que también el volumen eyaculado, la cuenta total y la movilidad progresiva incrementan con el tiempo

de abstinencia durante los primeros cuatro días, fenómeno que no se observa para la morfología espermática que parece no verse afectada por la abstinencia (Carlsen et al., 2005). Algunos autores, por el contrario, no han encontrado relación entre abstinencia y movilidad (Carlsen et al., 2004; De Jonge et al., 2004).

El potencial de fertilidad masculina depende de la presencia de espermatozoides en el eyaculado, de tal manera que este potencial está muy reducido cuando la concentración de espermatozoides es muy baja. Sin embargo, no hay una buena relación entre concentración y fecundidad, ya que, se conoce que la fertilidad no aumenta con incrementos de la concentración espermática. En estudios de parejas que tratan de concebir un hijo en un periodo de seis meses se demostró que el potencial de fertilidad disminuyó significativamente para concentraciones inferiores a 40 millones/ml (Bonde et al., 1998), aunque cuando aumenta el periodo de seguimiento (hasta tres años), los límites de fertilidad potencial pueden ser tan bajos como 5 millones/ml (Jouannet et al., 1988; Bostofte et al., 1982). En el manual de la OMS el límite se establece en 20 millones/ml (OMS, 1999). Jorgensen y colaboradores (2006) que recientemente revisaron el impacto de la calidad seminal sobre la fecundidad, refieren que el tiempo transcurrido hasta embarazo disminuye de forma significativa con un aumento en la concentración espermática de 20 a 40 millones/ml, que sigue creciendo hasta los 55 millones/ml, pero que se estabiliza a partir de esa concentración, sin que un aumento en la concentración espermática suponga una disminución del tiempo hasta embarazo. En la serie danesa un 20% de los jóvenes se encontraba por debajo de 20 millones, valor muy similar al 19% de individuos de este estudio con las mismas características. A este respecto, un estudio realizado en París por Auger y Jouannet en 1996 reveló que el porcentaje de individuos con eyaculado por debajo de 20 millones/ml se había incrementado de 4,1% a 12,2% en el periodo de 1973-1994 (Auger y Jouannet, 1996), lo que sugiere que este parámetro está sufriendo cambios que podrían contribuir a sostener la hipótesis de un problema de salud reproductiva masculina.

Finalmente, es preciso indicar que la gran variabilidad de criterios para definir la fecundidad sugiere que si se va a emplear el recuento espermático para comparar el potencial de fertilidad de diferentes poblaciones o en diferentes áreas geográficas, sería del mayor interés analizar la distribución poblacional y prestar una atención especial a la proporción de hombres con niveles mas bajos. Esta aproximación parece más adecuada que la simple comparación de medias aritméticas, geométricas o medianas (Bonde et al., 1999). También el porcentaje de formas móviles o la incidencia y tipo de

anomalías morfológicas parecen estar mas directamente relacionados con el potencial de fertilidad o fecundidad que el recuento exclusivo (Bonde et al., 1999; Jouannet et al., 1988). Por esta razón, el empleo del número total de formas móviles, estimado siguiendo los criterios de Irving (Irving et al., 1996), así como el porcentaje de formas normales, parece ser mas adecuado para aventurar el potencial de fertilidad que el recuento total de espermatozoides. De hecho, Jorgensen y colaboradores (2006), siguiendo a Guzick (Guzick et al., 2001) refieren que el hombre debería tener más del 12% de morfología normal para que no hubiera un compromiso en la fertilidad, que se presentaría por debajo del 9%, con una zona intermedia que incluye porcentajes entre 9 y 12%. Según Kruger el valor óptimo a partir del cual no encontraríamos problemas de fecundación *in vitro* se situaría en el 14% de formas normales siendo los individuos que presentan un porcentaje inferior al 5% los que verían comprometida su fertilidad de una forma más manifiesta (Kruger et al., 2004).

En este trabajo se ha prestado una atención especial a estos criterios de tal manera que el análisis bivalente, que nos ha permitido identificar determinantes del número total de espermatozoides, se ha realizado también para la identificación de determinantes del número total de espermatozoides móviles. Curiosamente, la mayor parte de las asociaciones significativas que se establecieron para el número total de espermatozoides repiten ahora su significación de tal manera que edad ($p=0,100$), consumo de algunos medicamentos como antibióticos y antivirales ($p=0,090$ y $p<0,001$, respectivamente), tabaquismo ($p=0,057$), estudios primarios ($p=0,073$), residencia materna urbana/rural ($p=0,040$), quistes epididimarios ($p=0,030$), tamaño testicular ($p=0,010$), estacionalidad de la recogida de la muestra ($p=0,017$) y tiempo de abstinencia ($p<0,001$) son determinantes del número de total de espermatozoides móviles.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y analizando los resultados numéricos de nuestro trabajo, es presumible que tan sólo 51 (18,7%) individuos podrían ser catalogados como varones con parámetros seminales alterados, al menos en las condiciones de medida actuales para la concentración espermática (<20 millones/ml según OMS, 1999) y que 58 (21,6%) individuos, con una concentración espermática entre 20 y 40 millones de espermatozoides por ml, si bien no estan por debajo del valor de referencia, presentaran tiempos estimados para la fecundación superiores a lo esperado para población normal.

Parámetros de función testicular

La concentración espermática, y por ende el número total de espermatozoides, son buenos marcadores de la función testicular y, más concretamente, de la espermatogénesis y de la abundancia y funcionalidad de las células de Sertoli (Johnson et al., 1984). Por esta razón, cualquier factor que pueda afectar la funcionalidad y diferenciación de las células de Sertoli ya sea durante el desarrollo embrionario del testículo o durante la pubertad del niño, o que dañe de forma irreversible a las células de Sertoli tras la pubertad se hará evidente a través de la reducción de espermatozoides producidos por el testículo. Dentro de este contexto el grupo de individuos de este estudio que presenta un recuento inferior al esperado podrían ser la expresión última de una exposición ambiental inadvertida. Por esta razón, todos y cada uno de los individuos fue investigado en los niveles hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.

La liberación pulsátil de GnRH en el hombre es esencial para la liberación de LH y FSH por el gonadotropo. Estas dos hormonas, a su vez, estimulan la producción de testosterona y la espermatogénesis, determinando la función reproductiva y sexual del varón. La LH estimula la producción de testosterona por las células de Leydig. Testosterona a su vez, modula la secreción de GnRH-LH actuando sobre el hipotálamo y la hipófisis.

Las concentraciones reducidas de testosterona ejercen un efecto de retroalimentación positiva y estimulan la secreción de GnRH, mientras que en concentraciones fisiológicas, la testosterona, a través de una retroalimentación negativa inhibe la secreción de GnRH-LH. El efecto inhibitorio de la testosterona sobre la secreción de LH por la hipófisis es directo, mientras que a nivel del hipotálamo el efecto inhibitorio de la testosterona sobre la secreción de GnRH es mediado por el sistema opioide. De lo anteriormente expuesto se desprende, que una disminución de la secreción de LH como consecuencia de una enfermedad hipotalámica o hipofisiaria resultará en una disminución de la secreción de testosterona. De modo similar, una reducción del nivel de testosterona debido a una lesión testicular determinará un incremento de los niveles séricos de LH. Además, la LH también es importante para la espermatogénesis, dado que la producción adecuada de testosterona es un elemento esencial para el desarrollo normal de los espermatozoides. De hecho los tubos seminíferos están rodeados por un líquido intersticial que contiene testosterona en

concentraciones 20-50 veces mayores que las halladas en el suero, y la espermatogénesis misma depende del mantenimiento de dichas concentraciones. Los valores medios circulantes de LH en la población de estudio se sitúan dentro de la normalidad (4,1 UI/l), con un rango de 1,2-11,0 UI/l.

Por su parte, la FSH es la principal hormona responsable del mantenimiento de la función de las células de Sertoli y de los túbulos seminíferos, y representa el factor regulador clave de la espermatogénesis. FSH estimula la conversión de los espermatocitos primarios en formas espermáticas más maduras y la función de las células de Sertoli. FSH es menos sensible que LH a la retroalimentación negativa de la testosterona. Los valores medios circulantes de FSH sitúan a la población de estudio dentro de la normalidad (media aritmética: 3,1 UI/ml), un rango de 0,4-10,6UI/ml y una mediana de 2,8 UI/ml.

Por último, el polipéptido testicular inhibina, elaborado por las células de Sertoli es el principal factor inhibitorio de la secreción de FSH. Así, en hombres castrados se observa una elevación de los niveles de LH y FSH. Por el contrario, si solamente se produce una lesión de los túbulos seminíferos la concentración de testosterona permanece normal y la FSH aumenta debido a la pérdida de inhibina. Se han identificado dos formas de inhibina, las cuales son heterodímeros; estos heterodímeros consisten en dos subunidades alfa distintas, denominadas beta-A o beta-B que se unen para formar un dímero, formándose la inhibina A y la inhibina B. Las 2 formas de inhibina son igualmente potentes como inhibidores selectivos de la secreción de FSH por la hipófisis anterior. La biosíntesis de inhibina es estimulada en la gónada masculina y femenina por la FSH, posiblemente por varios factores de crecimiento y por hormonas sexuales esteroideas específicas. Si se unen las 2 cadenas beta de inhibina se formará una molécula con funciones opuestas a ésta y se le ha denominado activina, puesto que tiene capacidad de estimular la FSH *in vitro*. A diferencia de la FSH, las activinas ejercen efectos bajos y sus acciones estimulatorias no son inhibidas por los antagonistas de la GnRH. Las activinas e inhibinas son parte de una larga familia de glucoproteínas caracterizadas por homología estructural con el factor beta de crecimiento transformante, una proteína mutagénica y el factor inhibidor de los conductos de Müller. Por último, los estrógenos también modulan la secreción de GnRH -LH en el hombre. En hombres adultos la administración de estradiol ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de LH y una disminución de la capacidad de respuesta de los gonadotropos a la estimulación con GnRH.

En el protocolo de estudio se incluyó la determinación de inhibina B obteniéndose un valor medio de 173,6 pg/ml y una mediana de 163 pg/ml, con un rango de 1 a 425 pg/ml, situando a la población dentro de la normalidad.

Algunos estudios han tratado de asociar los niveles circulantes de las hormonas sexuales masculinas con los parámetros seminales estudiados en la misma población (Jensen et al., 2004; Dhooge et al., 2007). Se ha propuesto que de la batería de hormonas sexuales masculinas disponibles para la caracterización hormonal en estudios de salud reproductiva, inhibina B y FSH podrían ser los marcadores más adecuados de espermatogénesis y de función de las células de Sertoli. Por esta razón algunos autores han establecido un valor umbral para estas dos hormonas (Inhibina B < 80 pg/ml y FSH > 10 IU/l), por debajo del cual parámetros seminales como la concentración espermática no superarían los valores de referencia establecidos por la OMS.

Inhibina B y FSH también han sido relacionadas con otros parámetros seminales como morfología y movilidad espermática (Uhler et al., 2003). Otros estudios han descrito cómo FSH y LH se relacionan inversamente con concentración espermática, morfología y movilidad; mientras que Inhibina B y testosterona libre lo hacen de manera directa con concentración espermática. Testosterona libre también se ha asociado con movilidad (Meeker et al., 2007).

En nuestro estudio, tanto el recuento total de espermatozoides como el recuento de formas móviles se asociaron con algunos de los marcadores bioquímicos, especialmente con la inhibina B ya que, en ambos casos, mayores niveles de inhibina se acompañaban de un mayor recuento ($p=0,038$) y un mayor número de formas móviles ($p=0,050$). El resto de las asociaciones tanto de sentido positivo (SHBG) como negativo (FSH, LH, testosterona) no alcanzaron la significación estadística.

A este respecto es interesante considerar que la inhibina B fue el mejor marcador que definió el estatus de fertilidad de los sujetos incluidos en un estudio de fertilidad por encima de otras hormonas como FSH o LH (Kumanov et al., 2006), cuando se comparó el perfil hormonal de setenta y cinco pacientes con problemas de infertilidad, con una edad media de $31,2 \pm 7,5$ años, con 12 sujetos control de fertilidad probada ($32,1 \pm 8,8$ años). Los niveles medios de inhibina B y de testosterona fueron significativamente menores en los sujetos infértiles que en los controles (inhibina B: $116,4 \pm 11,7$ pg/ml vs. $181,2 \pm 20,9$ pg/ml; $p=0,008$; testosterona: $13,6 \pm 0,9$ nmol/l vs. $25,1 \pm 2,9$ nmol/l; $p=0,008$). Además tanto el recuento espermático como el volumen testicular se correlacionaron significativamente y positivamente con los niveles de inhibina B.

Inhibina B presentó una correlación negativa con FSH y LH, y positiva con testosterona.

Por esta razón podemos concluir, siguiendo a Kumanov, que la medida de inhibina B puede proporcionar una información de mucha utilidad sobre el desarrollo adecuado de espermatogénesis en el varón por encima del proporcionado por otras hormonas sexuales (Kumanov et al., 2006).

Si bien en nuestro estudio tan sólo inhibina B ha mostrado una asociación estadísticamente significativa con algunos de los parámetros seminales, es interesante recordar que se trata de una población joven de fertilidad no probada y con unas características de salud muy aceptables. Asociaciones más llamativas entre marcadores bioquímicos y calidad seminal se han descrito, como ya se ha comentado, para poblaciones con patología reproductiva diversa. No obstante, la medida de inhibina B parece ser de gran utilidad en la caracterización de una población normal o aparentemente normal. A este respecto es de mayor interés el trabajo publicado por Jensen y colaboradores en el que estudiaron que el efecto que los tratamientos de fertilidad, recibidos por aquellas mujeres que los precisaban para lograr la concepción, podrían tener sobre la salud reproductiva de los hijos así concebidos, una vez alcanzada la madurez sexual, incluyendo el estudio de los parámetros seminales. Para ello seleccionaron jóvenes daneses pertenecientes a una cohorte prospectiva de población general con más de 2000 sujetos incluidos (Jensen et al., 2007), cuyas madres habían recibido algún tipo de tratamiento de fertilidad previo al embarazo de los sujetos indexados. Los investigadores encontraron, al comparar los sujetos que cumplían los criterios de inclusión frente a aquellos que no reunían los requisitos, que los hijos de madres tratadas con tratamientos de fertilidad tenían una menor concentración espermática (33 millones/ml vs. 48 millones/ml) y un menor recuento espermático (129 millones vs. 152 millones), testículos de tamaño inferior (19,3 ml vs. 20,2 ml), y menor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de espermatozoides móviles (61,8% vs. 65,5% y 8,6% vs. 10,5%, respectivamente). Además el 30% de estos jóvenes tenían una cuenta espermática por debajo del límite de referencia establecido por la OMS (< 20 millones/ml), frente al 20% que presentaban los jóvenes de madres no sometidas a este tipo de tratamientos previos al embarazo. Por otra parte, al comparar los niveles hormonales de los jóvenes cuyas madres habían recibido tratamiento para poder concebir con los jóvenes del grupo control, los primeros tenían mayores niveles de FSH, y menores niveles de testosterona.

Los efectos adversos encontrados por Jensen y colaboradores para algunos de los parámetros de calidad seminal, especialmente el que hace referencia a un 50% de reducción en la concentración espermática, son los mayores descritos hasta ahora para cualquiera de las variables estudiadas, incluso por encima del principal agente deletéreo sobre calidad seminal, hasta ahora descrito, como es el producido por el hábito tabáquico (del joven y especialmente de la madre durante el embarazo), al que se le atribuye una reducción de entre el 15-20% en concentración espermática (Jensen et al., 2004 y 2005).

Por último, para clarificar la influencia de los lípidos del suero en los parámetros seminales, Erguí y colaboradores estudiaron el perfil lipídico, hormonal y las características seminales de una población infértil, encontrando mayores niveles séricos de LDL y de triglicéridos totales, y menores concentraciones de testosterona en sangre en los individuos con menor movilidad espermática. Niveles séricos de FSH se correlacionaban inversamente con morfología espermática normal (Ergun et al., 2007).

Anomalías lipídicas, concretamente altos niveles medios de lípidos en sangre han sido descritos en varones azoospermicos infértiles, lo que parece estar relacionado directamente con efectos adversos a nivel testicular y en general con la espermatogénesis (Padron et al., 1989). La proteína LDL que transporta los ácidos grasos desde el hígado a los tejidos periféricos, está también relacionada con un aumento del contenido graso de las gónadas (Yamazaki et al., 2005). La hipercolesterolemia e hipertriglicemia disminuyen la capacidad del esperma en la reacción del acrosoma, o dicho de otra manera, reducen la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Díaz-Fontdevila et al., 1993).

Además de una motilidad correcta, el espermatozoide debe también experimentar algunos cambios estructurales para poder penetrar el oocito. Un evento crucial es la reacción del acrosoma, la cual es estimulada *in vivo* por algunos componentes del fluido oviductual, o bien, por el contacto con los componentes de la zona pelúcida. Esta reacción debe ocurrir antes de que el espermatozoide alcance la membrana plasmática del huevo. Los espermatozoides que no sufren la reacción acrosómica, los que tienen alguna anomalía a nivel del acrosoma o los que carecen de él, son incapaces de fecundar un ovocito de forma natural.

Exposición a disruptores endocrinos

Objetivo de este trabajo era, igualmente, estudiar la exposición ambiental de hombres jóvenes de la provincia de Almería a compuestos orgánicos persistentes, disruptores endocrinos, e investigar si estos compuestos químicos afectan a su salud reproductiva, a través de la medida de los parámetros seminales, el estudio de la función testicular y, posteriormente, el estudio de la fecundidad/fertilidad de los jóvenes una vez que se establezca el seguimiento reglado. Para ello, se determinó tanto la frecuencia de presentación como la concentración del residuo de 18 compuestos químicos extraídos del suero sanguíneo de los jóvenes participantes.

Aunque en la actualidad hay un mayor control en el empleo de los plaguicidas organoclorados en la agricultura y algunos de los considerados en este trabajo fueron prohibidos hace años, los niveles de exposición actuales de la población humana son tan importantes como en el pasado, debido, entre otras razones, a la elevada persistencia ambiental de estas sustancias, al transporte aéreo desde regiones donde se usan compuestos prohibidos en España, a la contaminación en formulaciones autorizadas y a su empleo fraudulento (Porta et al., 2002); además algunos de ellos, como la familia de los endosulfanes son compuestos que aún se emplean en las tareas agrícolas.

La exposición de la población de estudio a plaguicidas organoclorados puede tener un origen muy distinto, ya sea la ingesta pasiva del residuo en alimentos, la transferencia madres-hijos durante embarazo y lactancia y/o el uso de estos compuestos en la actividad laboral, personal o familiar. Con respecto a la vía alimentaria se han establecido con carácter internacional los niveles máximos de residuos de plaguicidas en productos de consumo (Comisión, Europea, SANCO/397/01-Final, 2001). La regulación se establece de tal manera que la cantidad de residuo contenido en el alimento y la ingesta estimada de ese alimento no suponga un riesgo significativo sobre la salud de la población expuesta. Bajo este criterio, se permiten cantidades máximas de plaguicidas organoclorados en los alimentos. No obstante, debido al uso abusivo de estos compuestos en unos casos, fraudulentos en otros, se pueden encontrar cantidades significativas de residuo en los productos alimentarios (Albero et al., 2003; Blasco et al., 2004). En función del alimento y el tipo de molécula de la que se trate se han encontrado distintas concentraciones (OMS, 1992; Gunderson, 1995; Li et al., 1998; Porta et al., 2002) que si bien rara vez sobrepasan los límites "legales" aconsejados,

demuestran la frecuencia de la impregnación alimentaria (Badia-Vila et al., 2000). De esta manera la vía alimentaria se señala como la fuente principal de exposición humana.

Las otras dos vías de exposición, materno-infantil y laboral también han merecido la atención de los investigadores que han evaluado la forma de transferencia madre-hijo durante el embarazo y lactancia (Cerrillo et al., 2005; Covaci et al., 2002; Saxena et al., 1981; López-Espinosa et al., 2007) y la influencia de las condiciones de trabajo (Cerrillo et al., 2005) sobre la exposición a pesticidas organoclorados.

En este trabajo se ha seleccionado para su análisis los pesticidas lindano, aldrín, dieldrín, endrín, hexaclorobenceno, vinclozolina, mirex, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, metoxicloro, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán-éter, endosulfán-diol, endosulfán sulfato y endosulfán-lactona, debido a que: i) se han descrito en tejidos biológicos humanos en nuestro medio (Olea et al., 1999; Campoy et al., 2001; Rivas et al., 2001; Botella et al., 2004; Cerrillo et al., 2005; Cerrillo et al., 2006; Carreño et al., 2006; López-Espinosa et al., 2007), ii) algunos de estos compuestos o sus metabolitos pueden actuar como potenciales carcinógenos al poseer una alta afinidad por el ADN (Jobling et al., 1995; Skakkebaek et al., 1998), y iii) pueden interferir sobre la homeostasis hormonal dado su efecto hormonal, estrogénico y antiandrogénico, ya probado en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Kelce et al., 1995; Soto et al., 1995; Sohoni y Sumpter, 1998; Andersen et al., 1999; Rivas et al., 2001).

Hay que recordar que en el catálogo de compuestos investigados tan sólo el grupo del endosulfán, metoxicloro, vinclozolina y lindano tienen un uso actual 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. Tal es el caso del lindano que está permitido en aplicaciones farmacológicas para combatir la sarna. A pesar de ello su empleo en agricultura ha sido posible hasta la fecha en regiones concretas de la península Ibérica, como es el caso de la Rioja (Olea et al., 1999). Especial es el caso del DDT que aún aparece como contaminante en las formulaciones de dicofol (Van de Plassche et al., 2003) o del metoxicloro y el aldrín que se prescriben para actuaciones concretas a pesar de su prohibición.

Los plaguicidas organoclorados analizados en este estudio tienen actividad hormonal, por lo que entran en la clasificación de disruptores endocrinos. Algunos de ellos se consideran como agonistas estrogénicos totales, como es el caso del *o,p'*-DDT, o agonistas estrogénicos parciales, en el resto de los casos, con una eficacia estrogénica con respecto a estradiol muy variable. Así por ejemplo, el lindano presenta un valor de

eficacia estrogénica que apenas si alcanza el 30% de la atribuida al estrógeno natural, mientras que la eficacia del endosulfán supera el 65% (Soto et al., 1995). La potencia proliferativa en los ensayos *in vitro*, le sirvió a Soto y colaboradores para ordenarlos en función de la concentración mínima a la que desencadenan un efecto estrogénico. Siguiendo este criterio *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDT, metoxicloro y endosulfán I y II son los plaguicidas organoclorados más potentes. Sólo mirex, clordano, endosulfán sulfato y endosulfán lactona son inactivos en los ensayos de estrogenicidad, aunque el primero se ha encontrado asociado a una mayor frecuencia de enfermedades de carácter hormonal (Moysich et al., 1998). Además del efecto agonista estrogénico, se hace necesario recordar que ha sido igualmente descrita la interferencia con el sistema androgénico para algunos de los compuestos considerados aquí, como es el caso del *p,p'*-DDE (Kelce et al., 1995; Kojima et al., 2003), que junto a los fungicidas vinclozolina y procloraz y al herbicida linurón (Vingaard et al., 2002) engrosan actualmente la lista de los antagonistas androgénicos.

Para minimizar la variabilidad intra-individual, poder comparar los resultados encontrados y aproximarse mejor a la concentración del plaguicida en los tejidos, muchos autores aconsejan que cuando los niveles de este tipo de compuestos se determinen en suero se realice el correspondiente ajuste por el contenido graso de la sangre (Laden et al., 2001). Lo cierto es que no siempre se encuentra una buena relación entre las medidas efectuadas en diferentes compartimentos (tejido adiposo y sangre), por lo que la comparación entre estudios epidemiológicos que utilizan diferentes sustratos son de difícil interpretación (Botella et al., 2003). No obstante, los estudios que han medido concentración de organoclorados en grasa ya sea de origen mamario, abdominal o glúteo (Kohlmeier y Kohlmeier, 1995; van't Veer et al., 1997) o en diversos órganos, una vez que se ha ajustado por el contenido en lípidos (Chu et al., 2003) sugieren que el contenido de plaguicidas organoclorados en cada órgano es muy similar e independiente del sitio de extracción de la muestra.

En la mayoría de estudios de cuantificación de compuestos químicos en poblaciones humanas se ha utilizado como sustrato el suero sanguíneo, debido principalmente a su relativa facilidad para la obtención de las muestras y la posible extrapolación de los resultados a otros tejidos (Mussalo-Rauhamaa et al., 1990). La utilidad del suero como marcador de exposición a plaguicidas organoclorados ha sido estudiada por numerosos autores, llegando siempre a conclusiones aparentemente satisfactorias (Archibeque-Engle et al., 1997; Stellman et al., 1998; Lopez-Carrillo et

al., 1999; Waliszewski et al., 2001, 2002, 2003, 2004). En general se postula que los pesticidas organoclorados se acumulan en los tejidos ricos en grasa como el tejido adiposo y los lípidos del suero, encontrando un patrón de equilibrio en el organismo (Músalo-Rauhamaa 1990; Waliszewski et al., 2001, 2002, 2003). Lopez-Carrillo y colaboradores encuentran una correlación altamente significativa entre los niveles de plaguicidas en suero y en tejido adiposo, si se expresan las concentraciones referidas al componente graso, concluyendo que el suero es un buen indicador de la exposición medioambiental a compuestos clorados, corroborando lo expuesto por otros autores (Stellman et al., 1998; Lopez-Carrillo et al., 1999; Rusiecki et al., 2005). Sin embargo otros trabajos recientemente publicados (Botella et al., 2004; Waliszewski et al., 2004) no encuentran la misma exactitud en la correlación grasa/suero, lo que mantiene cierto grado de incertidumbre sobre la utilidad de las medidas efectuadas en uno u otro compartimento.

El análisis de los resultados de exposición junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a la exposición humana a compuestos tóxicos persistentes permitió a nuestro grupo definir los factores que condicionan la exposición en la población joven almeriense (Carreño et al., 2007). De forma resumida, se constata que la exposición es importante y se pone de manifiesto por la identificación y cuantificación del residuo de al menos un plaguicida en cada uno de los jóvenes en estudio, alcanzando un valor medio de 11 residuos detectables por individuo. El compuesto organoclorado más frecuente es *p,p'*-DDE detectado en el 96% de las muestras, a concentraciones medias de 5,17 ng/ml suero o 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.

Además, se definieron para cada uno de los grupos de plaguicidas las variables que mejor se asocian a la exposición. Por ejemplo, los individuos de mayor edad ($p=0,016$), e IMC ($p<0,001$), hijos de madres de hábitat rural ($p=0,07$), fumadoras ($p=0,03$) y que desarrollaron algún trabajo manual durante el embarazo ($p=0,06$), y con periodos gestación más prolongados ($p<0,001$) mostraban mayores niveles de *p,p'*-DDT y sus metabolitos.

En lo que respecta al grupo de endosulfán y sus metabolitos, los sujetos de estudio con valores mas elevados de IMC (Endosulfán I, $p=0,06$; E-sulfato, $p=0,04$), hijos de madres que desarrollaron su embarazo en núcleos rurales (Endosulfán I,

p=0,04), con gestación más prolongada (Endosulfán II y E-Lactona, p=0,01), fumadores (E-éter, p=0,001), residentes en núcleos urbanos (Endosulfán II, p=0,1), y con mayor nivel educativo (Endosulfán II, p=0,06), presentaban niveles más elevados de plaguicidas de este grupo. El grupo de los endosulfanes está además presente en la totalidad de las muestras, en concentraciones medias de 22,66 ng/ml suero o 4029,55 ng/g lípido expresados como la sumatoria de endosulfanes (compuesto comercial y sus metabolitos). Este resultado no es de extrañar si se tiene en cuenta que este grupo de compuestos es de uso habitual en la agricultura intensiva, tipo de cultivo desarrollado mayoritariamente en el área de reclutamiento de los jóvenes de este estudio.

El grupo de los ciclodienos (aldrín/endrín/dieldrín) también estaba presente en la mayoría de los participantes en este estudio, habiéndose encontrado en cantidades cuantificables en el 79%, con concentraciones medias de 3.63 ng/ml suero o 482,12 ng/g lípido, demostrando, una vez más, que los compuestos de uso histórico acceden al organismo humano donde se acumulan y se transmiten a la descendencia durante el embarazo y lactancia.

Por último, el lindano se encontró en el 64,70% de las muestras estudiadas con valores medios de 1,66 ng/ml suero o 203,83 ng/g lípido y su presencia se correlaciona con los compuestos del grupo del DDT y los ciclodienos. Otros plaguicidas como metoxicloro y mirex se encontraron en menor proporción, 60,7% y 34,8%, respectivamente.

Disrupción endocrina y salud reproductiva

La información epidemiológica disponible sobre la asociación entre exposición a sustancias químicas, contaminantes medioambientales capaces de alterar el balance hormonal y su efecto sobre salud reproductiva, no es muy abundante y rara vez emana de trabajos desarrollados con este objetivo concreto. En muchas ocasiones se trata de derivaciones y aproximaciones de estudios planteados para dar respuesta a la contribución a la patogenia de la enfermedad de uno o unos pocos contaminantes medioambientales, generalmente pesticidas de uso agrícola, o de exposiciones químicas importantes ligadas a actividades profesionales concretas (Olea y Fernández,

2007). Quizás porque una de las grandes dificultades en este tipo de trabajos es la caracterización adecuada de la exposición (Olea y Fernández. 2007).

La hipótesis de causalidad de los disruptores endocrinos es relevante y plausible y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES) o las alteraciones observadas en trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenoestrógenos (Soto et al., 1995). A este respecto se propone que los compuestos medioambientales-disruptores endocrinos que se comportan como estrógenos pueden reducir el número de células de Sertoli producidas durante la etapa fetal mediante un mecanismo feed-back negativo sobre el control estrogénico ejercido por la secreción de la hormona FSH.

De hecho, varios grupos de investigación han descrito reducciones significativas en el recuento espermático de hijos de madres tratadas con DES durante el primer trimestre del embarazo (Dieckman et al., 1999) aunque otros autores no han podido confirmar estos resultados (Leavy et al., 1984) probablemente debido a que en el segundo caso, Leavy incluyó en el estudio a mujeres que habían recibido dosis significativamente inferiores de DES que en aquellos estudios donde se encontraron asociaciones positivas, 12g frente a 1 g de DES

Otro mecanismo de acción posible es el sugerido por Tielemans y colaboradores (Tielemans et al., 1999) mediante el cual la exposición a pesticidas reduciría la capacidad fecundante del espermatozoide humano “*in vitro*” de modo que en los tratamientos de fertilidad el porcentaje de éxito se vería significativamente disminuido en parejas de varones ocupacionalmente expuestos a estas sustancias.

De entre todos los contaminantes ambientales, los compuestos orgánicos persistentes, como algunos pesticidas, son del mayor interés debido a los largos periodos de retención en el organismo y al hecho de que muchos de ellos pertenecen al grupo de los compuestos organoclorados- disruptores endocrinos. Estos compuestos se bioacumulan preferentemente en el tejido adiposo, sin embargo algunos de ellos, como por ejemplo DDT y metabolitos, γ -HCH, PCBs y PCDDs, se bioacumulan también en los fluidos del tracto reproductivo masculino (Dallinga et al., 2002). De hecho, en el estudio de Rozati y colaboradores (Rozati et al., 2000) se encontraron PCBs en el plasma seminal de varones de parejas infértiles mientras que no se hallaron en los controles (parejas de mujeres embarazadas). Entre los infértiles se demostró una

correlación inversa, dosis-dependiente, entre la concentración de PCBs y la movilidad espermática.

Los pesticidas para los que se ha descrito actividad sobre la salud reproductiva son muy numerosos. La lista contiene productos tales como el β -HCH, carbaril, clordano, dicofol, dieldrín, DDT y sus metabolitos, endosulfán, heptacloro y H-epóxido, lindano (γ -HCH), malation, metomilo, metoxicloro, mirex, oxiclordano, paration, algunos piretroides sintéticos, toxafeno, y el transnanoclor.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la exposición humana a pesticidas organoclorados con actividad disruptora endocrina tendría consecuencias sobre la salud reproductiva, fenómeno que se pondría de manifiesto ya fuera por cambios en los niveles hormonales, o en los parámetros seminales (recuento, morfología o movilidad espermática). A este respecto son abundantes los trabajos que han tratado de asociar las concentraciones de los marcadores bioquímicos de función testicular (niveles hormonales de testosterona, estradiol, inhibina B, FSH y LH) con los niveles circulantes de residuos químicos. La acción de estos pesticidas podría ejercerse sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada o bien actuar directamente sobre el testículo ya que las actividades hormonales son muy variadas y no se puede prever *a priori* cuales serán los cambios esperados.

En nuestra población de estudio se encontró una asociación positiva y estadísticamente significativa entre la exposición a la mayoría de los COPs estudiados y los niveles de testosterona libre. Así, dentro del grupo de las drinas, una mayor exposición a aldrín y a endrín supuso valores superiores de testosterona en los sujetos analizados, con valores de $p=0,006$ y $p<0,0001$, respectivamente. Para el caso del dieldrín el incremento fue marginalmente significativo. Igual ocurrió cuando se estudió la relación existente entre exposición a endosulfán y metabolitos y los niveles de testosterona. En este grupo las asociaciones positivas y estadísticamente significativas correspondieron a los compuestos siguientes: endosulfán II ($p=0,004$), endosulfán diol ($p=0,029$), endosulfán lactona ($p=0,033$) y Σ endosulfán ($p=0,0002$).

Testosterona también se relacionó, en nuestra población, con la exposición a DDT y metabolitos, de forma que una mayor concentración de *p,p'*-DDE y *o,p'*-DDD supuso un incremento significativo de esta hormona, con valores de $p=0,003$ y $p=0,008$, respectivamente. Por último, testosterona además presentó incrementos significativos frente a lindano, hexaclorobenceno y metoxicloro, con valores de $p=0,012$, $p<0,0001$ y $p=0,033$, respectivamente.

La exposición a COPs asimismo se asoció con altos niveles de LH y de SHBG, de forma que una mayor exposición a endosulfán diol y a Σ endosulfán supuso valores superiores de LH en los sujetos analizados, con valores de $p=0,061$ y $p=0,007$, respectivamente. Para el caso del metoxicloro el incremento fue marginalmente significativo, $p=0,055$. Niveles superiores de endosulfán lactona y mirex se asociaron con mayores niveles de SHBG en nuestra población de estudio, con valores de $p=0,001$ y $p=0,05$, respectivamente.

A diferencia de lo descrito en algunos trabajos de investigación, en nuestra población de estudio no se ha encontrado relación alguna entre exposición a COPs y las hormonas FSH e inhibina B.

Los datos revisados en la literatura científica no permiten asegurar, de una manera clara, cuáles son los efectos producidos por la exposición a contaminantes ambientales-disruptores endocrinos sobre las hormonas reproductivas. Los efectos son, en general, limitados y varían de manera considerable de unas poblaciones a otras, lo que podría estar ocasionado por: i) los diferentes escenarios de exposición a los que las poblaciones están expuestas, ii) diferencias en los criterios de selección e inclusión de cada uno de los estudios, iii) las diferencias étnicas y de raza de los sujetos estudiados, o iv) ser fruto del azar cuando se realizan comparaciones múltiples.

Parece como si los distintos efectos ejercidos por los contaminantes ambientales-disruptores endocrinos y evidenciados *in vitro* (Bonfeld-Jorgensen et al., 2001) pudieran contribuir a la diversidad de consecuencias sobre el perfil hormonal sexual reproductivo encontrado en la literatura científica. Por ejemplo, *p,p'*-DDE tiene un efecto antiandrogénico y los PCBs, según el congénere de que se trate, ejercen diferentes actividades agonistas y/o antagonistas sobre las hormonas sexuales. Además algunos PCBs activan el receptor arílico AhR, lo que afecta indirectamente a la función de los receptores estrogénicos y androgénicos de las células de la próstata (Kizu et al., 2003; Pocar et al., 2005). No se conoce si este tipo de interacción también tiene lugar en otros órganos del individuo, pero es presumible que cualquier tejido con los receptores nucleares apropiados sea blanco del efecto disruptor.

El proyecto INUENDO, de financiación europea, ha investigado durante los últimos años, cuatro cohortes de hombres expuestos a PCBs y DDE con diferencias entre poblaciones realmente llamativas. Las poblaciones de estudio se han establecido en tres países europeos: Suecia, Polonia, Ucrania y en una población de esquimales (Inuits) de Groenlandia. La razón de incluir estos grupos particulares es la combinación

de las condiciones medioambientales de estos países, y el proceso de biomagnificación en la cadena alimentaria que supone la acumulación de COPs en la comida local fundamentalmente constituida por pescado, con concentraciones que a menudo sobrepasan los niveles alcanzados en las regiones donde estos compuestos se originan. Así por ejemplo, en aquellas dos poblaciones con una mayor exposición a DDE se vieron los efectos tanto sobre los niveles de testosterona como sobre la inhibina B, pero con diferente sentido en cada una (Jonsson et al., 2005).

También dentro del marco del proyecto europeo INUENDO Giwercman y colaboradores (Giwercman et al., 2006) encontraron una relación positiva entre exposición a PCB-153 y *p,p*-DDE y los niveles de hormona SHBG, asociación cercana a la significación estadística cuando se consideraron todos los individuos reclutados en los cuatro países. Sin embargo las asociaciones encontradas fueron diferentes en las poblaciones consideradas. Tanto en Groenlandia como en Ucrania la exposición a COPs se asoció con altos niveles de LH; pero si se consideraban todos los individuos los niveles de *p,p'*-DDE se relacionaron positivamente con la hormona FSH, lo que se explicaría debido a las propiedades antiandrogénicas descritas para este contaminante.

Estas observaciones coinciden con las descritas por Richthoff y colaboradores en un estudio realizado en Suecia con reclutas militares (Richthoff et al., 2003). Los autores de este trabajo encontraron una asociación positiva entre la exposición a COPs con los niveles de SHBG de esta población. Esta misma relación significativa ya había sido relatada igualmente en otros trabajos realizados con individuos de Suecia y de Latvia, aunque las asociaciones desaparecían al ajustar por edad (Hagmar et al., 2001). Además Richthoff y colaboradores describieron una correlación negativa y estadísticamente significativa entre los niveles de testosterona biodisponibles, medida como la relación testosterona/SHBG, y la exposición a compuestos organoclorados, cuantificada como la concentración de PCB-153 en suero. También se encontró una correlación inversamente proporcional entre movilidad espermática y concentración de PCB-153 (Richthoff et al., 2003).

Giwercman y colaboradores analizaron, además, otras hormonas, por ejemplo inhibina B ya que como se ha comentado es un buen indicador de la funcionalidad de las células de Sertoli y refleja el desarrollo de la espermatogénesis. En la población de Cracovia los niveles de esta hormona fueron menores en aquellos individuos altamente expuestos a *p,p'*-DDE, mientras que ocurría todo lo contrario entre los sujetos de Polonia (Varsovia) y de Groenlandia altamente expuestos a *p,p'*-DDE y CB-153,

respectivamente. Por otra parte, los niveles de testosterona libre se asociaron positivamente con altos niveles de *p,p'*-DDE en la población de Groenlandia pero no en ninguna de las otras tres cohortes (Giwercman et al., 2006).

Entre trabajadores altamente expuestos a DDT/DDE se han observado valores inferiores de testosterona pero valores normales en las gonadotropinas (Ayotte et al., 2001; Dalvie et al., 2004), aunque en poblaciones menos expuestas no se ha descrito ninguna asociación entre niveles de *p,p'*-DDE y hormonas como por ejemplo testosterona o gonadotropinas (Cocco et al., 2004; Hagmar et al., 2001).

Algunos trabajos epidemiológicos han sugerido que la exposición profesional a lindano se acompaña de un incremento significativo de los niveles de LH, un incremento no significativo de FSH y una ligera caída en los niveles de testosterona. Otros estudios demuestran que en humanos el lindano se acumula en los testículos, dañando el epitelio germinal, el número de espermatogonias y el número de células de Sertoli.

Endosulfán que es un xenoestrógeno capaz de aumentar los niveles de prolactina y competir por el receptor nuclear estrogénico, puede en muchachos retrasar la madurez sexual e interferir con la síntesis hormonal (Saiyed et al., 2003). De hecho esta observación no es nueva ya que en un estudio sobre agricultores que manejan habitualmente pesticidas se ha visto que tras periodos de uso continuado de al menos de tres años hay alteraciones significativas en el metabolismo de la testosterona, con incrementos en FSH y LH circulante así como testosterona, a pesar de que el efecto inmediato sobre esta hormona es su disminución, así como la de estradiol.

Exposiciones accidentales u ocupacionales a dioxinas también han sido asociadas con menores niveles de testosterona en hombres adultos, mientras que los resultados encontrados para otras hormonas son mas contradictorios; por ejemplo, se ha descrito una relación positiva entre exposición y FSH y LH en el estudio llevado a cabo por Egeland y colaboradores (Egeland et al., 1994), pero no se halló tal asociación en otro realizado por Henriksen (Henriksen et al., 1996).

Las variaciones geográficas encontradas en los diferentes estudios revisados, donde tratan de asociar exposición a contaminantes ambientales y niveles de diferentes hormonas sexuales, podrían contribuir a entender las diferencias regionales descritas para calidad seminal e incidencia de cáncer de testículo y de malformaciones urogenitales referidas en la literatura científica.

El bajo índice de participación de la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados sobre calidad seminal, así como la dificultad que supone el reclutamiento y análisis de las muestras seminales ha llevado a algunos investigadores a tratar de encontrar diferentes aproximaciones que sustituyan y/o mejoren estos inconvenientes. La manera de obtener la muestra de semen (extremadamente íntimo y personal, y potencialmente embarazoso) explicaría los porcentajes de participación de los estudios epidemiológicos sin voluntarios, lo que a su vez supone necesariamente la introducción de sesgos de selección importantes en el estudio. Debido a que las hormonas sexuales masculinas son necesarias tanto en el proceso de iniciación como en el de mantenimiento de la espermatogénesis, algunos autores han contemplado la posibilidad de utilizar su medida como una aproximación indirecta de calidad seminal. Se cree que de entre todas las hormonas sexuales masculinas, inhibina B y FSH podrían considerarse como buenos marcadores de espermatogénesis y de función de las células de Sertoli, por lo que la medida de estas dos hormonas, en suero, podría sustituir la medida convencional de los parámetros seminales en los estudios epidemiológicos de fertilidad (Jensen et al., 2004; Mabeck et al., 2005). Sin embargo esta opinión no es compartida por el grupo de Dhooge y colaboradores quienes aseguran que las variaciones regionales en calidad seminal no son necesariamente reflejo de patrones hormonales alterados de función testicular y que el examen tradicional del semen utilizado en la mayoría de los estudios epidemiológicos no puede sustituirse por el análisis de estos marcadores hormonales medidos en sangre/suero de los individuos (Dhooge et al., 2007).

La relación entre hormonas reproductivas y calidad seminal no ha sido suficientemente estudiada como para poder tomar esta determinación. Algunos estudios han encontrado que la medida de inhibina B en suero se relaciona positivamente con la concentración espermática, mientras que FSH lo hace mediante relación inversa (Jensen et al., 2004). Incluso estos autores se han atrevido a establecer valores umbrales para estas dos hormonas para los cuales la concentración espermática no superaría los valores de normalidad establecidos por la OMS (20 millones/ml); esto es inhibina B < 80 pg/ml y FSH > 10 IU/l. Inhibina B y FSH también han sido relacionadas con otros parámetros seminales como morfología y movilidad espermática.

En otro estudio clínico prospectivo americano, en el se incluían 145 parejas normales en edad reproductiva y con fertilidad probada, también se confirmaba la asociación positiva y significativa entre inhibina B y los parámetros seminales

concentración, morfología y movilidad espermática, y la relación negativa y significativa entre FSH y las variables concentración y morfología espermática (Uhler et al., 2003).

La relación entre hormonas sexuales masculinas y calidad seminal también se ha abordado en el trabajo de investigación aquí planteado. En nuestro estudio la medida de inhibina B en suero se relacionó positivamente con la concentración espermática, considerada como el número total de espermatozoides ($p=0,038$), así como con movilidad, cuantificada como el número total de espermatozoides móviles ($p=0,050$). Sin embargo, y a diferencia de lo encontrado por Uhler y colaboradores (Uhler et al., 2003) o por Jensen y colaboradores (Jensen et al., 2004), la medida de FSH en suero no se relacionó con ninguno de los parámetros seminales considerados, aunque si se pudo apreciar el sentido inverso de la asociación entre esta hormona con concentración y movilidad.

Entre 1999 y 2003, 400 varones de entre 18 y 54 años participaron en un estudio realizado en Boston (EEUU) con el objetivo de analizar los efectos del medio ambiente sobre la salud reproductiva masculina. Los resultados de este estudio revelaron valores por debajo de los establecidos por la OMS como referencia para concentración espermática y para morfología en aquellos individuos con mayores niveles de FSH, así como valores por debajo de los establecidos por la OMS como referencia para concentración espermática y para movilidad en aquellos sujetos mayores niveles de inhibina B. En esta población, FSH y LH estaban inversamente asociadas con concentración espermática, morfología y movilidad; mientras que Inhibina B y testosterona libre estaban positivamente relacionadas con concentración espermática. Testosterona libre también presentó una tendencia a la asociación con movilidad (Meeker et al., 2006).

Nuestro objetivo de trabajo era idéntico al contemplado por Meeker y colaboradores, sin embargo nuestros resultados no han podido corroborar las asociaciones encontradas en este trabajo entre FSH, LH o testosterona con los parámetros seminales de la población de estudio, salvo las anteriormente descritas para inhibina B.

Más de cien estudios epidemiológicos han investigado la asociación entre actividad laboral y calidad seminal, analizando el papel de la exposición química y física en los lugares de trabajo sobre la función reproductiva masculina. De esta manera se ha 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 pesticidas 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 pesticidas cuando se comparaban con los de menor exposición (Abel et al., 2000).

En nuestra población las asociaciones encontradas entre exposición medioambiental a pesticidas organoclorados y calidad seminal arrojaron los resultados siguientes. En primer lugar se consideró la relación entre el número total de espermatozoides y la presencia/ausencia y los plaguicidas seleccionados. En este sentido la presencia de endrín y endosulfán sulfato se asoció con una reducción significativa del número de espermatozoides con un valor de $p=0,018$ y $p=0,003$, respectivamente. La asociación significativa se mantuvo para endosulfán sulfato cuando el residuo se cuantificó en ng/ml. El número total de espermatozoides móviles, también se vio afectado por la presencia de alguno de los plaguicidas considerados, como por ejemplo endrín con una reducción significativa de 1,56 millones de espermatozoides móviles cuando se consideró la presencia/ausencia de este compuesto ($p=0,04$) y endosulfán sulfato, con una reducción significativa de 1,72 millones ($p=0,01$). Al igual que ocurrió con el número total de espermatozoides, se mantuvo la asociación entre endosulfán sulfato y el número total de espermatozoides móviles cuando el residuo se cuantificó en ng/ml.

Las variables de morfología del semen, consideradas en este estudio, no presentaron asociaciones estadísticamente significativas con la exposición medioambiental a pesticidas organoclorados y cuando lo hicieron supusieron una variación mínima en los porcentajes de las variables. Hay que recordar que el estudio de morfología espermática tan sólo se pudo realizar en una submuestra de 115 individuos lo que ha podido influir en la ausencia de asociaciones importantes.

La relación entre exposición medioambiental a pesticidas y calidad seminal también ha sido estudiada por el grupo de trabajo liderado por Hauser y colaboradores entre población fértil e infértil. Los resultados encontrados están a favor de una menor movilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides móviles entre la población altamente expuesta a compuestos organoclorados (concretamente PCBs y *p,p'*-DDE) (Hauser et al., 2005).

DDT 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 (De Jager et al., 2006; Aneck-Hahn et al., 2007). A pesar de que DDT y sus isómeros son estrógenos muy débiles cuando se comparan con el estrógeno natural se ha sugerido que tanto su bioacumulación como su vida media tan prolongada son responsables de la interferencia sobre la homeostasis hormonal actuando como débil estrógeno o como agonista androgénico a más altas dosis. Por otra parte DDE, el metabolito principal de DDT tiene actividad anti-androgénica y puede interferir sobre el equilibrio hormonal de forma contraria o incluso, podría suprimir la espermatogénesis en el epitelio en humanos.

Aunque en la mayoría de los países industrializados el uso de DDT está prohibido, su uso aun continúa en algunos países para el control de la malaria fundamentalmente. En estas regiones altas concentraciones de este pesticida son habitualmente cuantificadas en población ocupacionalmente expuesta (77900 ng/g en suero de aplicadores de DDT). Ayotte y colaboradores encontraron una asociación negativa y estadísticamente significativa entre los niveles de DDE cuantificados y la concentración espermática en la población general de estos países, así como con el volumen seminal y los niveles de testosterona en sangre (Ayotte et al., 2001). A pesar de que esta población no estaba profesionalmente expuesta a DDT los niveles de DDE encontrados fueron 300 veces superiores a los descritos en la población general canadiense (Ayotte et al., 2001).

Exposiciones a altas concentraciones de contaminantes medioambientales como las ocurridas en los accidentes de Yuso (Japón) en 1968 y de Yucheng (Taiwán) en 1979, donde más de 400 personas resultaron intoxicadas con aceite contaminado con PCBs y PCDFs, también pusieron de manifiesto como algunos compuestos ambientales podían afectar a las funciones reproductoras del hombre si la exposición ocurría en etapas de especial susceptibilidad (embarazo y lactancia). Las variables seminales de los niños expuestos en útero a estos contaminantes, analizadas cuando estos alcanzaban la edad adulta, mostraron una morfología espermática anormal, una reducida movilidad y los espermatozoides tenían mermada su capacidad para penetrar oocitos en experimentos *in vitro*, cuando se compararon con las variables seminales de un grupo control no expuesto apareando por edad (Guo et al., 2000; Hsu et al., 2003). Si la exposición había ocurrido postnatalmente los resultados encontrados fueron similares excepto para la movilidad espermática. La concentración seminal no se vio comprometida en ninguno de los dos grupos.

Menores concentraciones de PCBs, comparadas con la encontradas en los accidentes de Yuso y de Yucheng y en el rango de los niveles cuantificados en la actualidad en cualquier población europea, también han sido asociadas con efectos en los parámetros seminales, especialmente en aquellos relativos a la movilidad (Dallinga et al., 2002; Hauser et al., 2003 y 2005; Richthoff et al., 2003; Rignell-Hydbom et al., 2004).

Es necesario resaltar y concluir que el efecto global producido por la exposición a diferentes contaminantes ambientales-disruptores endocrinos no puede cuantificarse mediante la medida de uno o unos pocos marcadores químicos, por ejemplo PCB-153 y *p,p'*-DDE, sino mediante la identificación total de los distintos contaminantes químicos a los que el individuo está expuesto. Es obvia la dificultad que conlleva poder analizar todos los contaminantes ambientales a los que estamos expuestos, dada la variedad, características y elevado número de sustancias que podemos encontrar. Tan sólo en unas pocas ocasiones se ha abordado el tema de exposición ambiental de forma global, considerando no sólo factores confundentes que pueden condicionarla sino también con aproximaciones novedosas en las que la exposición es cuantificada a través de marcadores de “carga total” de compuestos que actuando a través de mecanismos comunes resultan en un efecto biológico final, consecuencia de la mezcla de elementos y la competencia que se establece entre sí y con los compuestos endógenos de similar vía de actuación (Fernández et al., 2004).

Parece evidente, además, que otra de las dificultades encontradas a la hora de establecer una relación de causalidad entre exposición a compuestos organoclorados persistentes-disruptores endocrinos y salud reproductiva masculina es la imposibilidad de asignar un valor objetivo de efecto hormonal *in vivo* a un compuesto químico para el cual los niveles de exposición se encuentran por debajo de aquellos en que los ensayos *in vitro* muestran efecto hormonal (Fernández et al., 2007). Esta pudiera ser la razón de la variabilidad de resultados encontrados en los estudios epidemiológicos que han considerado compuestos químicos de forma individualizada y para los cuales se han determinado niveles de exposición aparentemente desprovistos de actividad hormonal.

Por otra parte, en diferentes estudios realizados con animales no se ha podido evidenciar ninguna relación entre exposición a contaminantes ambientales y salud reproductiva cuantificada mediante el análisis de los niveles de diferentes hormonas esteroideas sexuales en suero (Guillette LJ, 1994). Los autores concluyen que las malformaciones genitales frecuentemente encontradas en los animales estudiados no

estaban asociadas con la exposición medioambiental medida en el momento que aparecían los efectos sino a contaminaciones ocurridas durante el desarrollo embrionario de los sujetos (Guillette LJ, 1994). Esta misma hipótesis es la defendida por Skakkebæk y colaboradores y descrita mediante el Síndrome de Disgenesia Testicular, tantas veces referido a lo largo de esta tesis doctoral (Skakkebæk et al., 2001).

En definitiva, la posibilidad de desarrollar en modelos animales (Mylchreest et al., 2000) los síntomas descritos por el TDS, en respuesta a exposiciones en útero, de por ejemplo el antiandrógeno dibutil ftalato, está favoreciendo la posibilidad de probar y de entender la relación existente entre la exposición a disruptores endocrinos y el desarrollo de diferentes patologías contempladas bajo la hipótesis conceptual del Síndrome de Disgenesia Testicular. Además, el hallazgo reciente de una relación inversa entre la distancia ano-genital y la concentración en orina de metabolitos de distintos ftalatos (Swan et al., 2005) podría suponer un paso substancial para el reconocimiento por parte de la comunidad científica y clínica de la importancia de la exposición a disruptores endocrinos sobre la salud reproductiva humana.

Estudios epidemiológicos, como el planteado en este trabajo de tesis doctoral, son necesarios para progresar en el conocimiento del papel de los contaminantes ambientales-disruptores endocrinos sobre todos aquellos parámetros que definen salud reproductiva masculina.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

El análisis de los resultados presentados en este trabajo junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a calidad seminal, parámetros hormonales y exposición humana a compuestos tóxicos persistentes, y sus posibles implicaciones en la salud reproductiva masculina, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. Los parámetros de calidad seminal se resumen en: i) volumen medio del eyaculado de 3,1 ml, con un 78% de las muestras superando los 2 ml establecidos por OMS como valor de referencia, ii) concentración media de espermatozoides de 72 millones de espermatozoides por ml y con una mediana de 51 millones/ml, con un 81% de la población por encima del mínimo de 20 millones/ml iii) un número total de espermatozoides eyaculados de 215 millones (mediana de 150), con 17,6% de nuestra población por debajo de los 40 millones de espermatozoides en el eyaculado, iv) la movilidad total presentó una media del 58,6 % (mediana 60%), con un 49,9% de la

población con valores inferiores a los establecidos por la OMS, y v) la morfología espermática presentó una media del 13,8% de formas normales. Teniendo en cuenta los valores de referencia de la OMS para la concentración espermática, es presumible que 51 individuos (18,7%) de nuestra serie serían catalogados como varones con fertilidad comprometida, al menos en las condiciones de medida actuales, y que 58 individuos (21,6%), si bien no infértiles, presentarían tiempos estimados para lograr un embarazo superiores al esperado en la población normal.

2. Ciertos factores parecen ser determinantes de la calidad seminal. A este respecto, se ha encontrado una asociación que no llega a ser significativa ($p=0,093$) entre el número total de espermatozoides y la edad, a pesar del rango de edad tan estrecho considerado en este estudio (18-23 años), de tal manera que cada año de incremento en la edad significa un aumento medio de aproximadamente un millón de espermatozoides. De entre los hábitos, tan solo el consumo de tabaco parece ejercer un efecto negativo sobre el número total de espermatozoides ($p=0,057$), que además se ve acentuado cuando se considera el consumo adicional de *Cannabis* ($p=0,037$). Ninguna de las características de las madres, excepto la residencia urbana durante el embarazo, que significó una peor calidad seminal en los jóvenes ($p=0,050$), ejerció efecto alguno sobre la calidad seminal de los hijos.

3. Junto a la presencia de quistes epididimarios, que supone una caída en casi tres millones del número de espermatozoides ($p=0,022$), el tamaño testicular se convierte en uno de los mejores predictores de la cuenta espermática, con una relación positiva y significativa ($p < 0,010$) entre el tamaño de los testículos y el número total de espermatozoides. Además, el tiempo de abstinencia ($p < 0,001$) y la estación del año de recogida de la muestra de semen ($p < 0,020$), cuando se compara la estación en que el recuento es más alto –invierno- con la estación en la que el recuento espermático es más bajo –primavera- son también determinantes del número de total de espermatozoides.

4. La mayor parte de las asociaciones significativas que se han establecido para el número total de espermatozoides en el eyaculado repiten su significación para el número total de espermatozoides móviles, de tal manera que edad ($p=0,100$), consumo de algunos medicamentos como antibióticos y antivirales ($p=0,090$ y $p < 0,001$, respectivamente), tabaquismo ($p=0,080$), estudios primarios frente a universitarios

($p=0,073$), residencia materna urbana/rural ($p=0,040$), quistes epididimarios ($p=0,030$), tamaño testicular ($p=0,010$), estacionalidad de la recogida de la muestra ($p=0,017$) y tiempo de abstinencia ($p < 0,001$) son determinantes del número de total de espermatozoides móviles.

5. Los parámetros bioquímicos de nuestra población la sitúan dentro de la normalidad. En el protocolo de estudio se incluyó la determinación de inhibina B (Valor medio 173,6 pg/ml, mediana 163 pg/ml, rango 1-425 pg/ml), la cual parece ser el marcador más sensible de entre los parámetros bioquímicos utilizados, ya que tanto el número total de espermatozoides ($p=0,038$) como el recuento de formas móviles ($p=0,050$) se asociaron con mayores niveles de inhibina B.

6. La población presenta una exposición importante a pesticidas organoclorados/disruptores endocrinos, con una media de 11 residuos por individuo. El pesticida organoclorado más frecuentemente encontrado fue el grupo de los endosulfanes y DDTs seguido de la vinclozolina. El p,p'DDE detectado en el 96% de los individuos, alcanzó la máxima concentración media de 5,17 ng/ml suero o 794 ng/g lípidos. Se encontró una asociación positiva y estadísticamente significativa entre la exposición a la mayoría de los pesticidas y los niveles de testosterona libre. Así, dentro del grupo de las drinas, una mayor exposición a aldrín y endrín supuso valores superiores de testosterona en los sujetos analizados ($p=0,006$ y $p<0,0001$, respectivamente). Igual ocurrió cuando se estudió la relación existente entre exposición a endosulfán y metabolitos y los niveles de testosterona. En este grupo las asociaciones positivas y estadísticamente significativas correspondieron a los compuestos endosulfán II ($p=0,004$), endosulfán diol ($p=0,029$), endosulfán lactona ($p=0,033$) y Σ endosulfán ($p=0,0002$). Testosterona también se relacionó con la exposición a DDT y metabolitos, de forma que una mayor concentración de p,p'-DDE y o,p'-DDD supuso un incremento significativo de esta hormona ($p=0,003$ y $p=0,008$, respectivamente), al igual que lindano, hexaclorobenceno y metoxicloro ($p=0,012$, $p<0,0001$ y $p=0,033$, respectivamente).

7. La exposición a pesticidas organoclorados asimismo se asoció con altos niveles de LH y de SHBG, de forma que una mayor exposición a endosulfán diol y a Σ endosulfán supuso valores superiores de LH en los sujetos analizados ($p=0,061$ y

p=0,007, respectivamente). Para el caso del metoxicloro el incremento fue marginalmente significativo (p=0,055). Niveles superiores de endosulfán lactona y mírex se asociaron con mayores niveles de SHBG en nuestra población de estudio (p=0,001 y p=0,05, respectivamente).

8. En el estudio de la relación entre el número total de espermatozoides y la presencia/ausencia de los plaguicidas seleccionados, la presencia de endrín y endosulfán sulfato se asoció con una reducción significativa del número de espermatozoides (p=0,018 y p=0,003, respectivamente). Además, se observó una caída significativa, en 1,56 (p=0,04) y 1,72 (p=0,01) millones de espermatozoides móviles, cuando se compararon los individuos que presentaban un residuo cuantificable de endrín y endosulfán sulfato, respectivamente, con aquellos en que estos residuos no eran medibles.

9. Parece evidente que una de las dificultades encontradas a la hora de establecer una relación de causalidad entre exposición a compuestos organoclorados persistentes-disruptores endocrinos y salud reproductiva masculina es la imposibilidad de asignar un valor objetivo de efecto hormonal *in vivo* a un compuesto químico para el cual los niveles de exposición se encuentran por debajo de aquellos en que los ensayos *in vitro* muestran efecto hormonal. Estudios epidemiológicos, como el planteado en este trabajo de tesis doctoral, que incluyan el uso de biomarcadores de exposición/efecto y carga hormonal total efectiva son necesarios para progresar en el conocimiento del papel de los contaminantes ambientales-disruptores endocrinos sobre los parámetros que definen salud reproductiva masculina.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

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

Adami HO, Bergstrom R, Mohner M, et al. Testicular cancer in nine northern European countries. Int J Cancer 1994; 59(1):33-8.

Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. J Androl 2003; 24(3):343-2.

Aitken RJ. Sperm maturation and oocyte interaction. Rabe T, Strowitzki T, Diedrich K, eds. Manual on assisted reproduction. Springer, Berlin 2000; pp: 1-9.

Albero B, Sanchez-Brunete C, Tadeo JL. Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J Chromatogr A* 2003; 1007(1-2):137-43.

Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, et al. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003; 18(10):2082-8.

Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF, et al. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 1999; 107:89-108.

Andersen AG, Jensen TK, Carlsen, E. et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod* 2000; 15:366-72.

Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod* 1999; 14(3):731-5.

Andolz P, Bielsa MA, Andolz A. Circannual variation in human semen parameters. *Int J Androl* 2001; 24(5):266-71.

Andrade-Rocha FT. Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests. *J Clin Lab Anal* 2003; 17(6):247-58.

Aneck-Hahn NH, Schulenburg GW, Bornman MS, et al. 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

Archibeque-Engle SL, Tessari ID, Winn DT, et al. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J Toxicol Environ Health* 1997; 52(4):285-93.

Ashford N, Miller CS. Low-level chemical exposures: A challenge for science and policy. *Environ Sci Tech* 1998; 32:508-9.

Auger J, Kuntzmann JM, Czyglik F. Decline in semen quality of fertile men during the last 20 years. *N Engl J Med* 1995; 59:33-8.

Auger J, Jouannet P. Changes in semen quality: fact or fiction? The French experience. In: Hamamah S, Mieusset, R, editors. Male gametes: production and quality, Paris, INSERM 1996; pp: 121-34.

Auger J, Jouannet P. Baisse de la production et de la qualite' spermatique chez l'homme: facteurs de variation et proble`mes me`thodologiques. *Andrologie* 1998; 8:9-24.

Auger J, Eustache F, Ducot B, et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000; 15:2360-8.

Avivar C, Durán I, Olea N, et al. Estudio de la calidad seminal en población joven del sureste español. *An Clin* 2004; 29(4):81-92.

Ayotte P, Giroux S, Dewailly E, et al. DDT spraying for malaria control and reproductive function in Mexican men. *Epidemiol* 2001; 12(3):366-7.

Badia-Vila M, Ociepa M, Mateo R, et al. Comparison of residue levels of persistent organochlorine compounds in butter from Spain and from other European countries. *J Environ Sci Health* 2000; 35:201-10.

Bardin CW, Cheng CY, Mustow NA, et al. The Sertoli cell. Knobil E & Neill JD, eds. *The physiology of reproduction*, 2^a ed., Raven Press, 1994; 20:1291-333.

Berman NG, Wang C, Paulsen CA. Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *J Androl* 1996; 17:68-73.

Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Gonadal function in men with testis cancer. *Fertil Steril* 1983; 39:68-75.

Blasco C, Lino CM, Pico Y, et al. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *J Chromatogr A* 2004; 1049(1-2):155-60.

Botella B, Crespo J, Rivas A, et al. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 2004; 96(1):34-40.

Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998; 352, 1172-7.

Bonde JP, Hjollund NH, Kolstad HA, et al. Environmental semen studies – is infertility increased by a decline in sperm count? *Scand J Work Environ Health* 1999; 25 Suppl 1:12-6.

Bonefeld-Jorgensen EC, Andersen HR, Rasmussen TH, et al. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicol* 2001; 158(3):141-53.

Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between sperm count and semen volume, and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int J Androl* 1982; 5:267-75.

Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Has the fertility of Danish men declined through the years in terms of semen quality? A comparison of semen qualities between 1952 and 1972. *Int J Fertil* 1983; 28:91-5.

Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, et al. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ* 1996; 312:471-2.

Campoy C, Jimenez M, Olea-Serrano MF, et al. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum Dev* 2001; 65:183-90.

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

Carlsen E, Andersson AM, Petersen JH, et al. History of febrile illness and variation in semen quality. *Hum Reprod* 2003; 18(10):2089-92.

Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, et al. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004; 82(2):358-66.

Carlsen E, Swan SH, Petersen JH, et al. Longitudinal changes in semen parameters in young Danish men from the Copenhagen area. *Human Reprod* 2005; 20:942-9.

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

Carson, R. Silent Spring. Boston: Houghton Mifflin Company; 1962

Cerrillo I, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, et al. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ Res* 2005; 98(2):233-9.

Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Ibarluzea J, et al. Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 2006; 62(11):1917-24.

CEC (2001) Strategy for a Chemicals Policy (White paper, COM (2001) 88 Final), Brussels, Belgium.

Chu S, Covaci A, Schepens P. Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium. *Environ Res* 2003; 93:167-76.

Cocco P, Loviselli A, Fadda D, et al. Serum sex hormones in men occupationally exposed to dichloro-diphenyl-trichloro ethane (DDT) as young adults. *J Endocrinol* 2004; 182(3):391-7.

Colborn T, Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human Connection. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing; 1992.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101:378-84.

COM706. Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. 1999.

Comité Científico de la Toxicidad, la Ecotoxicidad y el Medio Ambiente (SCTEE) de la Comisión. Efectos sobre la salud de las personas y de la fauna de las sustancias químicas alteradoras de los procesos endocrinos, con especial énfasis en la fauna y en los métodos de pruebas sobre ecotoxicidad. Bruselas. 1999.

Covaci A, Hura C, Schepens P. Selected persistent organochlorine pollutants in Romania. *Sci Total Environ* 2001; 280:143-52.

Crowley WF, Whitcomb RW, Jameson JL, et al. Neuroendocrine control of human reproduction in the male. *Recent Prog Horm Res* 1991; 47:27-67.

Dallinga JW, Moonen EJ, Dumoulin JC, et al. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Hum Reprod* 2002; 17(8):1973-9.

Dalvie MA, Myers JE, Thompson ML, et al. The long-term effects of DDT exposure on semen, fertility, and sexual function of malaria vector-control workers in Limpopo Province, South Africa. *Environ Res* 2004; 96(1):1-8.

Dalvie MA, Myers JE, Thompson ML, et al. 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.

De Jager C, Farias P, Barraza-Villarreal A, 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.

De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004; 82(1):57-65.

De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, et al. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 2003; 18(5):1055-61.

De Ziegler D, Cedars MI, Hamilton E, et al. Factors influencing maintenance of Sperm motility during in Vitro processing. *Fertil Steril* 1987; 48:816-20.

Diamond JM. Ethnic differences. Variation in human testis size. *Nature* 1986; 320:488-9.

Diaz-Fontdevila M, Bustos-Obregon E. Cholesterol and polyunsaturated acid enriched diet: effect on kinetics of the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:76-80.

Dieckmann WJ, Davis ME, Rynkiewicz LM, et al. Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? 1953. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(6):1572-3.

Dhooge W, van Larebeke N, Comhaire F, et al. Regional variations in semen quality of community-dwelling young men from flanders are not paralleled by hormonal indices of testicular function. *J Androl* 2007; 28(3):435-43.

Dodds EC, Lawson W. Synthetic Estrogenic Agents without the phenantrene nucleus? *Nature* 1936; 13: 996.

Durán I, Ardoy M, Núñez AI, et al. “Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino” En: *Embriología clínica. 501 preguntas sobre biología, clínica y laboratorio de reproducción.* Castilla JA, Núñez AI. Eds, 2001; 1:1-50.

Duty SM, Silva MJ, Barr DB, et al. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiol* 2003; 14(3):269-77.

Egeland GM, Sweeney MH, Fingerhut MA, et al. Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin. *Am J Epidemiol* 1994; 139(3):272-81.

Eliasson R. Semen analysis. *Environ Health Perspect* 1978; 24:81-5.

Environment and climate research programme. European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. EUR 17549, Environment and Climate Research Programme, Brussels 1996.

Ergun A, Kose SK, Aydos K, et al. Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. *Arch Androl* 2007; 53(1):21-3.

Estrogens in the environment I. Conference proceedings. National Institute Environment and Health Sciences. North Carolina, 1997

European Workshops on Endocrine Disrupters; Aronsborg, Sweden. European Commission; 2001.

Fernández MF, Pedraza V, Olea N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer J* 1998; 11:11-7.

Fernández MF, Rivas A, Olea-Serrano F, 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.

Fernández MF, Olmos B, Granada A, et al. Human Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Prenatal Risk Factors for Cryptorchidism and Hypospadias: A Nested Case-Control Study *Environ Health Perspect*: doi:10.1289/ehp.9351. [Online 8 June 2007]

Fernández MF, Molina-Molina JM, Lopez-Espinosa MJ, et al. Biomonitoring of environmental estrogens in human tissues. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210(3-4):429-32.

Fernández MF, Santa-Marina L, Ibarluzea JM, et al. Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: a biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43(8):1290-9.

Fernández MF, Arrebola JP, Taoufik J, et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 2007; in press.

Fernández MF, Araque P, Molina-Molina JM, et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of Southeastern Spain women. *Chemosphere* 2007, submitted.

Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, et al. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 1996; 65:1009-14.

Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, et al. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reprod* 2003; 18:1383-94.

Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 2004; 127(3):305-15.

Franken DR, Kruger TF. What is a normal spermatozoon? En: *Atlas of human sperm morphology evaluation*. Taylor & Francis ed. 2004; pp: 49-74.

Gambacorta M, Sfondrini G. Statistical evaluation in cryptorchids: light and electron microscopy study. En Bierich, JR y Giarola A., Eds. Cryptorchidism. Academic Press, NY, 1979.

Garcia AM, Flecher T, Benavides FG, et al. Parental agricultural work and selected congenital malformations. Am J Epidemiol 1999; 149:64-74.

Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, Noguera-Ocaña M, et al. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. Environ Health Perspect 1996; 104:1090-5

Gil Salom M, Bellver J, Romero JL, et al. Espermatogénesis: conceptos básicos. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Eds. Reproducción humana 2ª ed. Mc Graw Hill-Interamericana, 2002; 273-8.

Gill WB, Schumacher GF, Bibbo M, et al. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities J Urol 1979; 122:36-9.

Giwercman AH, Rignell-Hydbom A, Toft G, et al. Reproductive hormone levels in men exposed to persistent organohalogen pollutants: a study of Inuit and three European cohorts. Environ Health Perspect 2006; 114(9):1348-53.

Guillette LJ Jr. Endocrine-disrupting environmental contaminants and reproduction: lessons of the study of wildlife. En: Women's Health Today: Perspectives on Current Research and Clinical Practice (eds D.R. Popkin & L.J. Peddle) Parthenon Publication Group, New York, 1994; pp:201-7.

Gunderson EL. Dietary intakes of pesticides, selected elements and other chemicals. FDA Total Diet Study, June 1984. JAOAC Int 1995; 78:910-21.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med 2001; 345:1388-93.

Hagmar L, Björk J, Sjödin A, et al. Plasma levels of persistent organohalogen and hormone levels in adult male humans. Arch Environ Health 2001; 56:138-43.

Handelsman DJ. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. Human Reproduction 1997; 12:2701-5.

Hauser R, Williams P, Altshul L, et al. Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalates in relation to human sperm motility. *Environ Health Perspect* 2005; 113(4):425-30.

Hauser R, Williams P, Altshul L, et al. Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalates in relation to human sperm motility. *Environ Health Perspect* 2005; 113(4):425-30.

Henriksen GL, Michalek JE, Swaby JA, et al. Serum dioxin, testosterone, and gonadotropins in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiol* 1996; 7(4):352-7.

Hess RA, Bunick D, Lee KH, et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390(6659):509-12.

Hjollund NH, Bonde JP, Henriksen TB, et al. Job strain and male fertility. *Epidemiol* 2004; 15(1):114-7.

Hjollund NH, Bonde JP, Henriksen TB, et al. Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiol* 2004; 15(1):21-7.

Ibarluzea J, Fernandez MF, Santa-Marina L, et al. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control* 2004; 15(6):591-600.

Informe EUR 18345 CEE. La investigación de los alteradores endocrinos en la UE. Bruselas. (1997).

Irvine S, Cawood E, Richardson D, et al. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996; 312:467-71.

Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, et al. Fertility and offspring sex ratio of men who develop testicular cancer: a record linkage study. *Human Reprod* 2000; 15:1958-61.

James WH. Secular trend in reported sperm counts. *Andrologia* 1980; 12:381-8.

Jegou B, Auger J, Multigner L, et al. The saga of the sperm count decrease in humans and wild and farm animals. In: Gagnon C, editor. The male gamete. From basic science to clinical application. Cache River Press 1999; pp: 445-54.

Jensen TK, Giwercman A, Carlsen E. Semen quality among members of organic food associations in Zealand, Denmark. Lancet 1993; 341:13-8

Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. Fertil Steril 2004; 82:863-70.

Jensen TK, Jorgensen N, Punab M, 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.

Jensen MS, Mabeck LM, Toft G, et al. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. Human Reprod 2005; 20:2559-66.

Jensen TK, Jorgensen N, Asklund C, et al. Fertility treatment and reproductive health of male offspring: a study of 1,925 young men from the general population. Am J Epidemiol 2007; 165(5):583-90.

Jobling S, Sumpter JP. Male sexual development in "a sea of oestrogen". Lancet 1993; 342: 124-5.

Jobling S, Reynolds T, White R, et al. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. Environ Health Perspect 1995; 103(6): 582-7.

Joffe M. Decreased fertility in Britain compared with Finland. Lancet 1996; 347:1519-22.

Johnson L, Zane RS, Petty CS, et al. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. Biol Reprod 1984; 31:785-95.

Johnson L, Chaturvedi PK, Williams JD. Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans. *Biol Reprod* 1992; 47:1091-8.

Jonsson BA, Rylander L, Lindh C, et al. Inter-population variations in concentrations, determinants of and correlations between 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) and 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-ethylene (p,p'-DDE): a cross-sectional study of 3161 men and women from Inuit and European populations. *Environ Health* 2005;4:27.

Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reprod* 2001; 16:1012-9.

Jørgensen N, Carlsen E, Neramo I, 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. *Human Reprod* 2002; 17:2199-208.

Jørgensen N, Asklund C, Carlsen E, et al. Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. *Int J Androl* 2006; 29(1):54-61.

Jouannet P, Czyglik F, David G, et al. Study of a Group of 484 fertile men. Part I: distribution of semen characteristics. *Int J Androl* 1981; 4:440-9.

Jouannet P, Ducot B, Feneux D, et al. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 1988; 11:379-94.

Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, et al. A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J Occup Health* 2004; 46(2):109-18.

Kelce WR, Stone CR, Laws S. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 1995; 381:457

Kelce WR, Lambright CR, Gray LE Jr, et al. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142:192-200.

Kizu R, Okamura K, Toriba A, et al. A role of aryl hydrocarbon receptor in the antiandrogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Arch Toxicol* 2003; 77(6):335-43.

Kojima H, Iida M, Katsura E, et al. Effects of a diphenyl ether-type herbicide, chlornitrofen, and its amino derivative on androgen and estrogen receptor activities. *Environ Health Perspect* 2003; 111(4):497-502.

Kohlmeier L, Kohlmeier M. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ Health Perspect* 1995; 103(13):99-106.

Korach KS, McLachlan JA. Techniques for detection of estrogenicity. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 7:5-8.

Kruger TF, Van der Merwe F, Van Waart J. The tygerberg strict criteria: what are the clinical thresholds for in vitro fertilization, intrauterine insemination and in vivo fertilization?. In: *Atlas of human sperm morphology evaluation*. Taylor & Francis ed. 2004; pp: 13-9.

Kumanov P, Nandipati K, Tomova A, et al. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril* 2006; 86(2):332-8.

Laden F, Hankinson SE, Wolff MS, et al. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: An extended follow-up in the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* 2001; 91:568-74.

Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, et al. Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 2006; 226(2-3):90-8.

Leary FJ, Resseguie LJ, Kurland LT, et al. Males exposed in utero to diethylstilbestrol. *JAMA* 1984; 252(21):2984-9.

Lemcke B, Behre HM, Nieschlag E. Frequently subnormal semen profiles of normal volunteers recruited over 17 years. *Int J Androl* 1997; 20:144-52.

Leto S, Frensilli FJ. Changing parameters of donor semen. *Fertil Steril* 1981; 36:766-70.

Li YF, Cal DJ, Singh A. Technical hexachlorocyclohexane use trends in China and their impact on the environment. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998; 35:688-97.

Liu DY, Baker HW. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992; 58:465-83.

López-Carrillo L, Torres-Sanchez L, Lopez-Cervantes M, et al. The adipose tissue to serum dichlorodiphenyldichloethane (DDE) ratio: some methodological considerations. *Environ Res* 1999; 81(2):142-5.

López-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, et al. Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit Contam* 2007; 24(1):95-102.

López Teijon M, Garcia F, Serra O, et al. Semen quality in a population of volunteers from the province of Barcelona. 2007 (manuscrito en prensa)

Lottrup G, Andersson AM, Leffers H, et al. Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *Int J Androl* 2006; 29:172-80.

Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80(4-5):369-81.

Lue Y-H, Sinha H, Swerdloff PI, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: Role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinol* 1999; 140:1709-17.

Mabeck LM, Jensen MS, Toft G, et al. Fecundability according to male serum inhibin B-a prospective study among first pregnancy planners. *Hum Reprod* 2005; 20(10):2909-15.

MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoön counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J Urol* 1951; 66:436-49.

MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril* 1979; 31:103-16.

Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, et al. Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinol* 2005; 146:613-23.

Mármol-Maneiro L, Fernández D'Pool J, Sánchez BJ, et al. Perfil seminal en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. *Invest Clin* 2003; 44:105-17.

Martínez-Navarro L, Álvarez-Miro M, Castilla-Alcalá JA, et al. Modificaciones seminales en donantes de semen (1983-1995). *Prog Obstet Ginecol* 1998; 41:353-8.

Martínez Vidal JL, Moreno Frias M, Garrido Frenich A, et al. Determination of endocrine-disrupting pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum by GC-ECD and GC-MS-MS and evaluation of contributions to the uncertainty of the results. *Anal Bioanal Chem* 2002; 372(7-8):766-75.

Martini AC, Molina RI, Estofan D, et al. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil Steril* 2004; 82(2):374-7.

McLachlan JA. Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1993; 101:386-7.

Meistrich M, van Beek MEAB: Spermatogonial stem cells. DeJardins C, Ewing LL. Eds. *Cell and molecular biology of the testis*. Oxford University Press, 1993; pp: 226-95.

Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl* 2007; 28(3):397-406.

Mees MM CCPA. Is sperm quality actually declining? A literature survey. National Institute of Public Health and the Environment Bilthoven 1997; Report no. 65:30-1.

Miller WR, Sharpe RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related cancer* 1998; 5:69-96.

Møller H, Skakkebæk NE. Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 1997; 8:904-12.

Møller H. Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *APMIS* 1998; 106:232-9.

Møller H, Skakkebæk NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *Br Med J* 1999; 318:559-62.

Moore HDM, Hartman TD, Pryor JP. Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int J Androl* 1983; 6:310-8.

Moreno Frias M, Garrido Frenich A, Martinez Vidal JL, et al. Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 760(1):1-15.

Moreno Frias M, Jimenez Torres M, Garrido Frenich A, et al. Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed Chromatogr* 2004; 18(2):102-11.

Mortimer D. Practical laboratory andrology. Oxford University Press, 1994.

Moysich KB, Ambrosone CB, Vena JE, et al. Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1998; 7:181-8.

Mussalo-Rauhamaa H, Hasanen E, Pyysalo H, et al. Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer* 1990; 66(10):2124-8.

Murature DA, Tang SY, Steinhardt G, et al. Phthalate esters and semen quality parameters. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1987; 14:473-7.

Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, et al. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 2000; 55(1):143-51.

Naghma-E-Rehan, Sobrero AJ, Fertig JW. The semen of fertile men: statistical analysis of 1300 men. *Fertil Steril* 1975; 26:492-502.

Nef S, Shipman T, Parada LF. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev Biol* 2000; 224:354-61.

Nelson CMK, Bunge RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril* 1974; 25:503-7.

Newbold RR, McLachlan JA. Diethylstilbestrol associated defects in murine genital tract development. In McLachlan, J.A. (ed.), *Estrogens in the Environment, IP Influences on Development*. New York: Elsevier; 1985; pp: 228-313.

Olea N, Olea-Serrano MF. Estrogens and the environment. *Cancer Prevention J* 1996; 5:1-6.

Olea N, Pulgar R, Perez P, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996; 104(3):298-305.

Olea N, Barba A, Lardelli P, et al. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol Ind Health* 1999; 15:151-8.

Olea N. Bisphenol A and Dental Sealants: Olea's Response. *Environ Health Perspect* 2000; 108(12):A546.

Olea N, Fernández MF, Araque P, et al. Perspectives on endocrine disruption. *Gac Sanit* 2002; 16(3):250-6.

Olea N, Avivar C. Disruptores endocrinos en biología de la reproducción. *Asebir* 2003; 8(2): 10-5.

Olea N, Fernández MF. Chemicals in the environment and human male fertility. *Occup Environ Med* 2007; 64(7):430-1.

Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reprod* 2001; 16:1768-76.

OMS, World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, UK: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1987.

OMS, World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.

OMS, World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

Padron RS, Mas J, et al. Lipids and testicular function. *Int Urol Nephrol* 1989; 21(5):51-9.

Paulsen CA, Berman NG, Wang C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril* 1996; 65:1015-20.

Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 1997; 100:831-4.

Petersen PM, Skakkebaek NE, Giwercman, A. Gonadal function in men with testicular cancer: biological and clinical aspects. *APMIS* 1998; 106:24-36.

Pérez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, et al. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 1998; 106(3):167-74.

Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia* 2004; 36(6):337-45.

Pocar P, Fischer B, Klonisch T, et al. Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reprod* 2005; 129(4):379-89.

Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, et al. Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish population: a puzzle without pieces and the protection of public health. *Gac Sanit* 2002; 16(3):257-66.

Porta M, Ballester F, Ribas-Fito N, et al. Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish general population. Criteria for a diagnosis of the present situation. *Gac Sanit* 2006; 20(3):233-8.

Punab M, Zilaitiene B, Jorgensen N, et al. Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int JAndrol* 2002; 25:243-52.

Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. Testicular tumors with endocrine manifestations. In De Groot LJ and Jameson JL (eds), *Endocrinology*, 4th edn. Philadelphia: Saunders; 2000.

Richthoff J, Rylander L, Hagmar L, et al. Higher sperm counts in Southern Sweden compared with Denmark. *Human Reprod* 2002; 17:2468-73.

Richthoff J, Rylander L, Jönsson BAG, 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.

Rignell-Hydbom A, Rylander L, Giwercman A, et al. Exposure to CB-153 and p,p'-DDE and male reproductive function. *Human Reprod* 2004; 19(9):2066-75.

Rivas A, Fernandez MF, Cerrillo I, et al. Human exposure to endocrine disrupters: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 2001; 109(3):185-97.

Rivas A, Lacroix M, Olea-Serrano F, et al. Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 82(1):45-53.

Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, et al. Xenoestrogens and male infertility: myth or reality? *Asian J Androl* 2000; 2(4):263-9.

Rusiecki JA, Matthews A, Sturgeon S, et al. A correlation study of organochlorine levels in serum, breast adipose tissue, and gluteal adipose tissue among breast cancer cases in India. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5):1113-24.

SACO 100EN. Endocrine disrupting chemicals: A challenge for the EU?. European Parliament, Public Health and Consumer Protection Series, Strasbourg, 1998.

Saxena MC, Siddiqui MK, Bhargava AK, et al. Placental transfer of pesticides in humans. *Arch Toxicol* 1981; 48(2-3):127-34.

Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, et al. Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ Health Perspect* 2003; 111(16):1958-62.

Schlatt S, Weinberger GF. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testis. *Int J Androl* 1994; 17:214-22.

Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, et al. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. Environ Health Perspect 2001; 109(3):239-44.

Schulze W, Rehder U. Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. Cell Tissue Res 1984; 237:395-407.

Sergerrrie M, Ouhilial S, Bissonnette F, et al. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. Human Rep 2000; 15(6):1314-21.

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet 1993; 341:1392-5.

Skakkebaek NE, Giwercman A, De Kretser D. Pathogenesis and managemet of male infertility. Lancet 1994; 343:1473-9.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? APMIS 1998; 106(1):3-11.

Skakebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder whith environmental aspects. Hum Reprod 2001; 16:972-8.

Slama R, Eustache F, Ducot B, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. Human Reprod 2002; 17:503-15.

Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. Journal of Endocrinol 1998; 158:327-39.

Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, et al. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. Clin Chem 1995; 41:1888-95.

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, et al. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environ Health Perspect 1995; 103 Suppl 7:113-22.

Soto AM, Michaelson CL, Prechtl NV, et al. Assays to measure estrogen and androgen agonists and antagonists. *Adv Exp Med Biol* 1998; 444:9-23.

Sousa M, Barros A, Takahasi K, et al. Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme. *Human Reprod* 1999; 14:1279-86.

Stellman SD, Djordjevic MV, Muscat JE, et al. Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(6):489-96.

Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, et al. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts? *Epidemiol* 2003; 14(3):278-86.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm density declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 1997; 105:1228-32.

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, Kruse RL, Liu F, et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect* 2003; 111(12):1478-84.

Swan SH, Kruse R, Liu F, et al. Geographic differences in semen quality of fertile US males. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111(4): 414-20.

Swan SH, Main KM, Liu F, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1056-61.

Swan SH. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticides exposure. *Int J Androl* 2006; 29(1):62-8.

Tanner, JM. *Growth at Adolescence* (Oxford: Blackwell), 2nd edition, 1962.

Tielemans E, van Kooij R, te Velde ER, et al. Pesticide exposure and decreased fertilisation rates in vitro. *Lancet*. 1999; 354(9177):484-5.

Tsarev I, Gagonin V, Giwercman A, et al. Sperm concentration in Latvian military conscripts as compared with other countries in the Nordic–Baltic area. *Int J Androl* 2005; 28:208-14.

Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996; 104:741-803.

Tramontano F, Malanga M, Farina B, et al. Heat stress reduces poly(ADPR)polymerase expresión in rat testis. *Mol Hum Rep* 2000; 6(7):575-81.

Tripp BM, Lamb D. Sertoli Cell: Morphology, function and regulation. Lipschulz LI, Howards SS, eds. *Infertility in the male*, 3^a ed. Mosby, 1997; 4:71-105.

Uehling DT. Fertility in men with varicocele. *Int J Fertil* 1968; 13:58.

Uhler ML, Zinaman MJ, Brown CC, et al. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3:1535-42

Vandenberg LN, Eichmiller F, Hauser R, et al. Human exposure to Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2007; in press.

Van de Plassche EJ, Schwegler AMGR, Rasenberg M, et al. DDT in dicofol. Consulta en www.unece.org (Junio, 2003).

Van't Veer P, Lobbezoo IE, Martin-Moreno JM, et al. DDT (dicophane) and postmenopausal breast cancer in Europe: case-control study. *BMJ* 1997; 315:81-5.

Van Waelegheem K, De Clercq N, Vermeulen L, et al. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Human Reprod* 1996; 11:325-9.

Velez de la Calle JF, Rachou E, le Martelot MT, et al. Male infertility risk factors in a French military population. *Human Reprod* 2001; 16(3):481-6.

Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, et al. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1994; 61(1):35-43.

Vinggaard AM, Nellemann C, Dalgaard M, et al. Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicol Sci* 2002; 69(2):344-53.

Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, et al. Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001; 40(3):432-8.

Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, et al. Persistent organochlorine pesticide levels in maternal blood serum, colostrum, and mature milk. *Bull Environ Contam Toxicol* 2002; 68(3):324-1.

Waliszewski SM, Gomez-Arroyo S, Infanzon RM, et al. Comparison of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003; 71(1):156-62.

Waliszewski SM, Carvajal O, Infanzon RM, et al. Copartition ratios of persistent organochlorine pesticides between human adipose tissue and blood serum lipids. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004; 73(4):732-8.

Walker AH, Bernstein L, Warren DW, et al. The effect of in utero ethinyl oestradiol exposure on the risk of cryptorchid testis and testicular teratomas in mice. *Br J Cancer* 1990; 62:599-602.

Weber RFA VJ. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Bias and confounding in studies of sperm counts. *Pure Appl Chem* 1998; 70:1703-11.

Weidner IS, Møller H, Jensen TK, et al. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 1998; 106:793-6.

Weinbauer GF, Gomoli J, Simoni M, et al. Physiology of testicular function. Nieslag E, Behre HM. eds. *Andrology: Male Reproductive health and dysfunction*. Springer, Berlin 1997; 3:25-7.

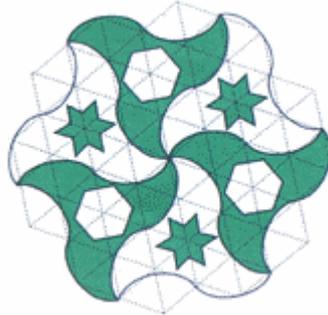
Wolf H, Politch JA, Martinez A, et al. Leukocytospermia is associated with poor semen Quality. *Fertility Sterility* 1990; 51:528-36.

Wu JQ, Yang QY, Tao JG, et al. Epidemiological study on semen quality of 562 volunteers aged 22-30 *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2004; 25(1):44-8.

Yamazaki T, Sasaki E, *et al.* Increased VLDL secretion and gonadal fat mass in mice over-expressing liver acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1. *J Biol Chem* 2005; 280:21506-14.

Yazawa H, Sasagawa I, Ishigooka M, *et al.* Effect of immobilitation stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Human Reprod* 1999; 7:1805-10.

8. Anexos



CUESTIONARIO JÓVENES

Identificación:

Código:

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 dá 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:

Buena:

Mala:

Muy mala:

A2. ¿Tiene/ha tenido alguna enfermedad crónica ó por un largo período de tiempo?

No:

Sí:

Si contestó SÍ, indique qué enfermedad y cuánto tiempo ha estado enfermo.

A3. ¿Ha tomado alguna medicación durante los últimos 3 meses?

No:

Sí:

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:

No:

Sí:

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre:

A7. ¿Se sometió su madre a algún tratamiento cuando estaba embarazada de usted?

No lo sabe:

No:

Sí:

Si contestó SÍ, qué tipo:

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A8. ¿Trabajó su madre, mientras estaba embarazada de usted?

No lo sabe:

No:

Sí:

Si contestó SÍ, qué tipo de trabajo: _____

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A9. Nos interesa saber si su nacimiento ocurrió tras 9 meses de embarazo:

Sí:
No, pretérmino , en qué semana _____
No, postérmino en qué semana _____
No lo sabe:

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A10. ¿Cuáles fueron sus medidas al nacer?

Peso: _____ gramos
Longitud: _____ cm
No lo sabe:

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A11. ¿Tuvo alguna enfermedad grave en el primer año de su vida?

No lo sabe:
No:
Sí:

Si contestó SÍ, qué enfermedad: _____

Marque aquí si ha recibido la información directamente de su madre:

A12. ¿Fumaban sus padres cuando usted era niño?

Sí, ambos:
Sí, uno de mis padres:
No:
No lo sabe:

Marque aquí si recibió la información directamente de sus padres:

B. CONDICIONES DE SALUD

B1. ¿Ha recibido algún tratamiento médico o quirúrgico en uno ó ambos testículos?

No:
Sí, operación: (Operación(es)-año(s): 19
_____)
Sí, tratamiento hormonal: (Comienzo del tratamiento: 19
_____)
No lo sabe:

¿Nació con uno ó ambos testículos fuera del escroto, pero descendió/descendieron sin tratamiento?

Sí, un testículo: ¿Derecho ó izquierdo? _____
Sí, ambos testículos:
No:
No lo sabe:

B2. ¿Ha padecido paperas de adulto?

No lo sabe: **Continue en B5**
No: **Continue en B5**
Sí:

B3. ¿Qué edad tenía cuando tuvo paperas? _____ año

B4. ¿Tuvo alguna complicación testicular relacionada con las paperas?

No lo sabe:
Sí, en un testículo:
Sí, ambos:
No:

B5. ¿Ha sido alguna vez golpeado de forma que causara hinchazón, hematoma ó cardenal en el escroto?

Sí: año: 19____
No:

B6. ¿Ha sido alguna vez operado de alguna de las siguientes enfermedades?

Sí: Año: No:

No sabe:

Hernia inguinal:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Varicocele:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Torsión de testículos:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cáncer testicular:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otras dolencias en pene tracto urinario ó escroto:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inflamación de la vejiga	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gonorrea	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infección por clamidia	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inflamación de próstata	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Varicocele en escroto	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hernia inguinal	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermedad de tiroides	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B8. ¿Está satisfecho de su vida sexual?

Sí:

No:

Si contestó no, ¿por qué no?

veces	Nunca	Frecuentemente	A
Inapetencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Problemas con erección	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eyacuación precoz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

No eyaculación
Otros problemas

C. ESTILO DE VIDA Y CONDICIONES DE TRABAJO

C1. ¿Fuma?

No:
Sí, cigarrillos: , número por día: _____
Sí, otros: , 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: No:

C6. ¿Va al Instituto/Universidad?

Sí: CONTINUE EN LA SECCIÓN D.
No:

¿Qué edad tenía cuando abandonó el Colegio/Instituto?
años

¿Cuántos años ha ido al colegio? _____ años

¿Cuál es la graduación mas alta que ha obtenido?

- Primaria.
- Diplomatura
- Licenciatura
- Estudiante
- Sin estudios**

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 mas 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	Rara vez/ nunca las semanas:			
-Pintura industrial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Pintura de edificios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Soldador de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Torno, taladro y cortador de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Desengrasantes de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Limpieza con disolventes orgánicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Pegamento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Soldador	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Uso de herbicidas o pesticidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Producción fotográfica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo con óxido de nitrógeno	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo de laboratorio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo con pesticidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo a temperaturas >50 °C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Exposición a radiación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-¿Has sufrido stress?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

D. HISTORIA COMO PADRE

D1. ¿Ha tenido hijos? ¿Sabe si es responsable de algún embarazo?

No:

Sí:

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: **CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA**
Sí:

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: **CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA**
Sí:

Si contestó SÍ, ¿cuál fue la razón?

D5. ¿Recibió tratamiento para el problema de infertilidad?

No: **CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA**
Sí:

Si contestó SÍ, ¿qué tratamiento recibió y, tuvo éxito?

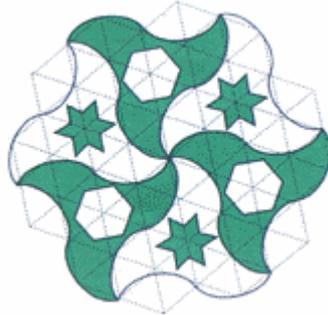
D6. ¿Cuánto tiempo intentaron usted y su pareja que quedara embarazada antes de que fueran a tratamiento?

_____meses y/o _____ años

Si cree que existen otras condiciones referentes a su trabajo, condiciones de vida o salud, deberíamos saberlas, por favor escribálas aquí.

HA LLEGADO AL FINAL

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN



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 dá 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:

Buena:

Mala:

Muy mala:

A2. ¿Tiene/ha tenido alguna enfermedad crónica ó por un largo período de tiempo?

No:

Sí:

Si contestó SÍ, indique qué enfermedad y cuánto tiempo ha estado enfermo.

A3. ¿Ha tomado alguna medicación durante los últimos 3 meses?

No:

Sí:

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:

No:

Sí:

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre:

A7. ¿Se sometió su madre a algún tratamiento cuando estaba embarazada de usted?

No lo sabe:

No:

Sí:

Si contestó SÍ, qué tipo:

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A8. ¿Trabajó su madre, mientras estaba embarazada de usted?

No lo sabe:

No:

Sí:

Si contestó SÍ, qué tipo de trabajo: _____

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A9. Nos interesa saber si su nacimiento ocurrió tras 9 meses de embarazo:

Sí:
No, pretérmino , en qué semana _____
No, postérmino en qué semana _____
No lo sabe:

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A10. ¿Cuáles fueron sus medidas al nacer?

Peso: _____ gramos
Longitud: _____ cm
No lo sabe:

Marque aquí si recibió la información directamente de su madre:

A11. ¿Tuvo alguna enfermedad grave en el primer año de su vida?

No lo sabe:
No:
Sí:

Si contestó SÍ, qué enfermedad: _____

Marque aquí si ha recibido la información directamente de su madre:

A12. ¿Fumaban sus padres cuando usted era niño?

Sí, ambos:
Sí, uno de mis padres:
No:
No lo sabe:

Marque aquí si recibió la información directamente de sus padres:

B. CONDICIONES DE SALUD

B1. ¿Ha recibido algún tratamiento médico o quirúrgico en uno ó ambos testículos?

No:
Sí, operación: (Operación(es)-año(s): 19
) _____
Sí, tratamiento hormonal: (Comienzo del tratamiento: 19
) _____
No lo sabe:

¿Nació con uno ó ambos testículos fuera del escroto, pero descendió/descendieron sin tratamiento?

Sí, un testículo: ¿Derecho ó izquierdo? _____
Sí, ambos testículos:
No:
No lo sabe:

B2. ¿Ha padecido paperas de adulto?

No lo sabe: Continúe en B5
No: Continúe en B5
Sí:

B3. ¿Qué edad tenía cuando tuvo paperas? _____ año

B4. ¿Tuvo alguna complicación testicular relacionada con las paperas?

No lo sabe:
Sí, en un testículo:
Sí, ambos:
No:

B5. ¿Ha sido alguna vez golpeado de forma que causara hinchazón, hematoma ó cardenal en el escroto?

Sí: año: 19____
No:

B6. ¿Ha sido alguna vez operado de alguna de las siguientes enfermedades?

Sí: Año: No:

No sabe:

Hernia inguinal:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Varicocele:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Torsión de testículos:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cáncer testicular:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otras dolencias en pene tracto urinario ó escroto:	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inflamación de la vejiga	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gonorrea	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infección por clamidia	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inflamación de próstata	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Varicocele en escroto	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hernia inguinal	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermedad de tiroides	<input type="checkbox"/>	19____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B8. ¿Está satisfecho de su vida sexual?

Sí:

No:

Si contestó no, ¿por qué no?

veces	Nunca	Frecuentemente	A
Inapetencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Problemas con erección	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eyacuación precoz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

No eyaculación
Otros problemas

D. ESTILO DE VIDA Y CONDICIONES DE TRABAJO

C1. ¿Fuma?

No:
Sí, cigarrillos: , número por día: _____
Sí, otros: , 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: No:

C6. ¿Va al Instituto/Universidad?

Sí: CONTINUE EN LA SECCIÓN D.
No:

¿Qué edad tenía cuando abandonó el Colegio/Instituto?
años

¿Cuántos años ha ido al colegio? _____ años

¿Cuál es la graduación mas alta que ha obtenido?

- Primaria.
- Diplomatura
- Licenciatura
- Estudiante
- Sin estudios**

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 mas 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	Rara vez/ nunca las semanas:			
-Pintura industrial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Pintura de edificios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Soldador de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Torno, taladro y cortador de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Desengrasantes de metal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Limpieza con disolventes orgánicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Pegamento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Soldador	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Uso de herbicidas o pesticidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Producción fotográfica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo con óxido de nitrógeno	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo de laboratorio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo con pesticidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Trabajo a temperaturas >50 °C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Exposición a radiación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-¿Has sufrido stress?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

D. HISTORIA COMO PADRE

D1. ¿Ha tenido hijos? ¿ Sabe si es responsable de algún embarazo?

No:

Sí:

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: CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA
Sí:

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
c. Abandonamos tras _____ meses y/o _____ años

D4. ¿Le han hecho alguna vez algún test para averiguar por qué su pareja no quedaba embarazada?

No: CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA
Sí:

Si contestó SÍ, ¿cuál fue la razón?

D5. ¿Recibió tratamiento para el problema de infertilidad?

No: CONTINÚE EN LA ÚLTIMA PÁGINA
Sí:

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 escribálas aquí.

HA LLEGADO AL FINAL

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN