



Universidad de Granada  
FACULTAD DE MEDICINA

---

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UNA GUÍA PARA  
LA EVALUACIÓN DE ESTUDIOS SOBRE CALIDAD  
SEMINAL**

---

María Serrano Molina  
GRANADA, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Serrano Molina  
D.L.: GR 24460734  
ISBN: 978-84-9083-286-8



Dña. M<sup>a</sup> CELIA VÉLEZ FERNÁNDEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. María Serrano Molina ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UNA GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ESTUDIOS SOBRE CALIDAD SEMINAL”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 22 de septiembre de 2014

Fdo: M<sup>a</sup> Celia Vélez Fernández



D. PABLO JUAN ÁLVAREZ ARÁNEGA, DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y TÉCNICO DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA DE LA FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL ALEJANDRO OTERO.

CERTIFICA:

Que Dña. María Serrano Molina ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UNA GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ESTUDIOS SOBRE CALIDAD SEMINAL”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 22 de septiembre de 2014

Fdo: Pablo J. Álvarez Aránega



D. JOSÉ ANTONIO CASTILLA ALCALÁ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE LABORATORIO CLÍNICO Y DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES” DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. María Serrano Molina ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UNA GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ESTUDIOS SOBRE CALIDAD SEMINAL**” que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 22 de septiembre de 2014

Fdo: José Antonio Castilla Alcalá





La doctoranda, María Serrano Molina y los directores de la tesis, Dña M<sup>a</sup> Celia Vélez Fernández, D. Pablo Juan Álvarez Aránega y D. José Antonio Castilla Alcalá Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 22 de septiembre de 2014

Director/es de la Tesis

Doctoranda

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:



Agradecimientos:

Con esta tesis doctoral cierro una de las etapas más bonitas y enriquecedoras de mi vida, tanto en el terreno profesional como en el personal.

Esta etapa comenzó en julio de 2011, perdiéndome entre los pasillos del HUVN en el intento de llegar hasta las puertas de la Unidad de Reproducción, entonces ignoraba que, entre esas paredes pasaría tantas horas y experimentaría tantas emociones.

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que durante el transcurso de este periodo, de una forma u otra, han hecho posible que esta tesis se haya llevado a cabo:

A los miembros la Unidad de Reproducción porque de ellos he aprendido pequeñas y grandes lecciones que me acompañarán en mi camino y me han hecho crecer en todos los sentidos.

A la Dra. Mari Carmen Gonzalvo por haberse involucrado de forma totalmente desinteresada en mi aprendizaje, por todos sus conocimientos transmitidos, por la seguridad que nos da saber que está siempre ahí y sobre todo por la confianza que ha depositado en mi. Todo lo que se, te lo debo en gran parte, a ti.

A la Dra. Ana Clavero por su amabilidad y eterna sonrisa.

A Lorena, Nacho, Julia, Eva, Irene y Ana Paula, por acogerme en mis inicios.

A Silvia, Inma, Blanca, Ali, por todas las vivencias compartidas: las risas y los llantos, los momentos de estrés y los de relajación, los éxitos y los fracasos, que sin duda nos han unido de una forma especial. Os quiero.

A Marisa, por su forma de enseñar, de trabajar y de mirar al mundo. Las personas como tu son difíciles de encontrar y yo he sido muy afortunada al hacerlo. Me va a costar no verte cada día.

A Marina, Consu, Vane y Mario, por todo lo aprendido al intentar enseñaros. Ánimo y perseverancia.

A Toñi (mi madre granaina) por apoyarme en duros momentos, por su calidez y su cariño constante. Has sido uno de mis pilares, no tengo palabras para agradecerte tanto...

A Patro, Laura, Julia, Conchi, Sara y Aurora por el tiempo que os he restado en estos años y porque por mucho tiempo que pase sin veros, con una mirada sigue bastando.

A mis directores, la Dra. Celia Vélez y el Dr. Pablo Álvarez por sus enseñanzas, dedicación y tiempo y en especial al Dr. José Antonio Castilla por creer en mi. Nadie se hace grande demostrando lo pequeño que otros pueden ser, grande es aquel que puede engrandecer a la gente que tiene alrededor, y sin duda, eres muy grande Dr. Castilla.

Por último, debo un especial agradecimiento a mis padres, Antonio y Rosa, por su cariño, su comprensión y su ánimo en todos y cada unos de los momentos más importantes de mi vida. Por darme alas desde muy pequeña y hacerme ver que las limitaciones nos las imponemos nosotros mismos. Sois mi vida.

***A mis padres***



*“Las ciencias tienen las raíces amargas,  
pero muy dulces los frutos”*

Aristóteles





Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes **revistas** científicas:

- Sánchez-Pozo MC, Mendiola J, Serrano M, Mozas J, Björndahl L, Menkveld R et al. Proposal of guidelines for the appraisal of SEMen QUALity studies (SEMQUA). Hum Reprod 2013;28:10-21.
- M. Serrano, M.C. Gonzalvo, M.C. Sanchez-Pozo, A. Clavero, M.F. Fernandez, M.L. Lopez-Regalado et al. Adherence to reporting guidelines in observational studies concerning exposure to persistent organic pollutants and effects on semen parameters. Hum Reprod 2014;29:1122-1133.

Y han sido presentados en las siguientes **reuniones** científicas nacionales:

- XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (Barcelona, España). Mayo 2014.
- VII Congreso Asociación Española para el estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) (Sevilla, España). Noviembre 2013.
- XVI Congreso Nacional de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (Pamplona, España). Abril de 2013.

e internacionales:

- 29th edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (Londres, Reino Unido). Julio 2013.
- 5th International Congress Reproductive Medicine and Beyond. (Sevilla, España). Abril 2013.



# ÍNDICE



INTRODUCCIÓN.....	1
1. Semen.....	3
1.1 Valoración de la calidad seminal .....	3
1.2 Control de calidad en análisis de semen .....	7
1.2.1 Calidad de la fase pre-analítica.....	8
1.2.2 Calidad de la fase analítica (metrológica) .....	10
1.2.3 Calidad de la fase post-analítica .....	17
1.3 Interpretación del análisis de semen.....	18
1.3.1 Coherencia biológica .....	18
1.3.2 Coherencia analítica .....	20
1.4 Evolución de la calidad seminal.....	23
1.5 Estilo de vida y calidad seminal .....	25
1.6 Factores ambientales y calidad seminal .....	31
1.6.1 Disruptores endocrinos .....	31
1.6.2. Síndrome de disgenesia gonadal.....	35
2. Plaguicidas.....	40
3. Exposición a disruptores endocrinos y calidad seminal.....	46
4. Guías para evaluar la calidad de artículos en el ámbito de la salud .....	52
4.1 Justificación .....	52
4.2 Historia .....	53
4.3 Estado actual .....	56
4.4 Adherencia a las Guías para evaluar la calidad de artículos científicos en el ámbito de la salud.....	65
OBJETIVOS .....	67
MATERIAL Y MÉTODOS .....	71
1. Elaboración de una guía para la evaluación de estudios sobre calidad seminal (SEMQUA). .....	73
2. Aplicabilidad de SEMQUA y comparación con STROBE .....	76

---

2.1 Criterios de inclusión y exclusión de artículos: .....	77
2.2 Búsqueda sistemática .....	78
2.3 Explotación de datos .....	80
2.4 Evaluación de la calidad de los estudios .....	81
2.5 Análisis estadístico.....	81
RESULTADOS.....	83
1. Resultados del proceso de elaboración de SEMQUA.....	85
2. Resultados tras aplicar SEMQUA.....	92
2.1 Selección de artículos en la búsqueda bibliográfica .....	92
2.2 Explotación de datos y descripción de artículos .....	96
2.3 Evaluación del grado de acuerdo .....	99
DISCUSIÓN .....	117
CONCLUSIONES .....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143

# **INTRODUCCIÓN**





## 1. Semen

Entendemos por semen el líquido expulsado al exterior a través de la uretra durante la eyaculación. Está compuesto por secreciones del aparato genital masculino, dividiéndose en líquido seminal, espermatozoides y otras células. Las fracciones de semen durante el eyaculado no son homogéneas (Björndahl et al., 2010). La primera fracción del eyaculado (secreciones de testículo y epidídimo) es la de mayor concentración de espermatozoides.

Los parámetros seminales reflejan el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orientan sobre patologías del sistema genital. Sólo excepcionalmente, como en casos de ausencia total de espermatozoides (azoospermia) o movilidad (astenozoospermia total), predicen la fertilidad del varón, ya que dichos estados pueden ser transitorios y la esterilidad es un concepto que hace referencia a la pareja.

Debido a que los espermatozoides se acumulan en el epidídimo una vez que han sido liberados a la luz de los túbulos seminíferos, y la viabilidad de estos en él se puede ver afectada si existe algún trastorno epididimario funcional (Correa-Pérez et al., 2004), es importante conocer el tiempo transcurrido desde la última eyaculación. Se recomienda el análisis de semen tras un período de abstinencia sexual de 2 a 7 días (WHO, 2010). Sin embargo, también es importante en los parámetros espermáticos el período de abstinencia sexual desde la penúltima eyaculación debido a que el contenido del epidídimo no se vacía por completo tras una eyaculación (Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004; Amann, 2010).

### 1.1 Valoración de la calidad seminal

Para una correcta realización e interpretación de un análisis de semen deben tenerse presentes diferentes aspectos previos y posteriores al análisis, así como la utilización de técnicas y criterios reconocidos internacionalmente como los editados por la OMS (2010) o la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) (Kvist and Björndahl, 2002), y aplicar procedimientos de control de calidad interno y externo.

La OMS, en sus recomendaciones para el análisis de semen, divide las magnitudes biológicas a estudiar en estándares, opcionales e investigación (Tabla 1) (WHO, 2010).

**Tabla 1. Clasificación de parámetros a incluir en un análisis de semen según OMS-10 (WHO, 2010)**

<b>Estándares</b>	Examen macroscópico: licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen, pH
	Presencia de agregados y aglutinaciones de espermatozoides
	Movilidad espermática
	Vitalidad espermática
	Número de espermatozoides y otras células
	Morfología espermática
	Detección de anticuerpos antiespermatozoide unidos a la superficie espermática
<b>Opcionales</b>	Índices de defectos múltiples espermáticos
	Técnica inmunocitoquímica para la detección de leucocitos
	Interacción entre espermatozoide y moco cervical
	Análisis bioquímicos del líquido seminal
	Análisis automático de la movilidad espermática
<b>Investigación</b>	Especies reactivas de oxígeno
	Test de unión a zona pelúcida
	Evaluación de la reacción acrosómica
	Test del ovocito de hámster
	Evaluación de la cromatina espermática

Un seminograma debe, como mínimo, incluir los parámetros estándares, valoración macroscópica (licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen, y pH), presencia de agregados y aglutinaciones, movilidad espermática, vitalidad espermática, número de espermatozoides y otras células, morfología espermática y detección de anticuerpos antiespermatozoide unidos a la superficie espermática, cuyos límites inferiores de referencia se muestran en la Tabla 2 (WHO, 2010).

**Tabla 2. Límites inferiores de referencia en los parámetros de semen según manual de la OMS-10 de análisis de semen (WHO, 2010)**

Propiedades	Límite inferior de referencia (IC 95%)
Volumen (ml)	1.5 (1.4 - 1.7)
Movilidad total (progresivos + no progresivos, %)	40 (38 - 42)
Movilidad progresiva	32 (31 - 34)
Vitalidad (vivos, %)	58 (55 - 63)
Nº total de espermatozoides ( $10^6$ /eyaculado)	39 (33 - 46)
Concentración de espermatozoides ( $10^6$ /mL)	15 (12 - 16)
Morfología espermática (normal, %)	4 (3.0 - 4.0)

La metodología empleada para el cálculo de los diferentes valores de referencia ha ido variando con los años. Los límites inferiores de referencia en los parámetros de semen según manual de la OMS-10 de análisis de semen (WHO, 2010), mostrados en la Tabla 2, han sido obtenidos a partir de resultados de varios estudios retrospectivos sobre calidad seminal y fertilidad de las parejas. Las muestras analizadas fueron obtenidas a partir de hombres cuya pareja quedó gestante en un tiempo máximo de 12 meses sin uso de ningún tratamiento anticonceptivo. Las muestras incluidas en este estudio cumplieron los siguientes requisitos: Muestra completa, y una por hombre, obtenida con un tiempo de abstinencia comprendido entre 2-7 días. Se analizaron aproximadamente 1800 muestras de 8 países pertenecientes a 3 continentes.

Los nuevos límites inferiores de referencia establecidos por OMS (2010) son similares a los puntos de corte establecidos por numerosas publicaciones usando otras metodologías (Van Zyl et al., 1976; Kruger et al., 1986; Kruger et al., 1988; Guzick, 2001). Tomando como ejemplo la morfología espermática, numerosos autores han abogado a lo largo de los años por una disminución de los valores de referencia. En todos estos estudios el valor de corte entre población fértil y estéril está comprendido entre el 3-14%, lo que pone de manifiesto una concordancia entre el nuevo límite inferior de referencia para la morfología espermática editado en el manual OMS-2010 y los recientes datos publicados al respecto (Menkveld, 2010).

## **1. 2 Control de calidad en análisis de semen**

La estandarización y control de calidad de las técnicas empleadas en el análisis de semen, presentan dificultades, principalmente debido al gran número de factores que pueden influir en su resultado. Debido a esto, diferentes autores (Björndahl et al., 2010), y en concreto la OMS (WHO, 2010), han intentado dictar unas pautas para el examen del semen.

La amplia aceptación y uso del manual de la OMS ha provocado un incremento de la estandarización de las técnicas de análisis de semen, sin embargo es necesario un entrenamiento adecuado del personal que realiza los diferentes procedimientos (Barratt et al., 2011). La mayoría de los estudios de control de calidad han puesto en evidencia que diferentes laboratorios y diferentes técnicos del mismo

laboratorio producen diferentes valores (Jequier y Ukrombe, 1983; Neuwinger et al., 1990; Barroso et al., 1999; Franken et al., 2000; Keel et al., 2000; Auger et al., 2000; Álvarez et al., 2005; Palacios et al., 2012; Tomlinson et al., 2012). Varias sociedades nacionales organizan cursos de formación continuada y los laboratorios de andrología implementan sistemas de calidad para la acreditación del laboratorio, lo cual se ha convertido en un requisito necesario en algunos países como Estados Unidos, (American Fertility Society, 1992) o en Europa (Directive 2004/23/EC).

El proceso de análisis de semen consta de tres fases: pre-analítica, analítica y post-analítica. La variabilidad de los procedimientos se debe a fluctuaciones o cambios que sufre dicho proceso en cualquiera de estas 3 fases. El conjunto de la variabilidad producida en las fases pre-analítica y post-analítica se conoce como variabilidad extra-analítica (NCCLS, 1991). La variabilidad técnica es un fenómeno propio de los procesos de medida y, por tanto, de los procesos químico-analíticos, por el cual los resultados obtenidos al medir repetidamente una magnitud en un mismo espécimen suelen ser ligeramente diferentes entre sí (Haeckel, 1993).

### **1.2.1 Calidad de la fase pre-analítica**

La fase pre-analítica comprende la obtención del espécimen, así como la preparación, el transporte y la conservación del mismo. Para evitar al máximo las disconformidades propias de esta fase, es preciso normalizar todas las actividades que la integran, y controlar todos los instrumentos propios de esta fase (Young, 1995).

Los factores que influyen en la fase pre-analítica pueden ser clasificados en dos grupos, variabilidad biológica (variaciones biológicas intra e interindividuales) y factor técnico, y los dos deberían ser controlados tanto como sea posible para una adecuada interpretación del resultado obtenido (ver sección 1.2).

- Variabilidad biológica intraindividual: Estos factores con influencia en parámetros seminales son clasificados como: (1) Fisiológicos: provoca que los parámetros seminales de un individuo puedan variar, independientemente del estatus de salud de los pacientes (Álvarez et al.,

2003; Fraser, 2001), pueden ser clasificados como aleatorios (estrés, dieta, ejercicio, abstinencia sexual, estímulo sexual) o sistemáticos (edad). (2) Patológicos: en el caso de semen: fiebre, varicocele, criptorquidia. (3) Iatrogénicos: como resultado de tratamientos médicos o cirugías.

- Variabilidad biológica interindividual: es el fenómeno por el cual los parámetros seminales varían dentro de una cierta población específica. Por ejemplo diferencias entre diferentes grupos de edad o entre países. Una población puede ser dividida en subconjuntos de población más homogéneos, si se tienen en cuenta factores que aumentan la variabilidad biológica interindividual; así se recomienda que cada laboratorio haga un esfuerzo por tener sus propios valores de referencia para los diferentes parámetros en función de los diferentes grupos.

Una muestra biológica para cualquier determinación debe obtenerse en la forma adecuada, del paciente correcto, en el momento correcto y con la adecuada preparación del paciente; y debe realizarse el análisis o manejo correcto que responda a la pregunta correcta o necesidad determinada. La calidad en la fase pre-analítica puede garantizarse implantando un sistema de calidad que cumpla los requisitos de las normas ISO 15189:2003 y UNE 179007 "Sistemas de gestión de la calidad para Laboratorios de reproducción asistida". Las variables pre-analíticas incluyen la adecuación o no de la petición del análisis, la identificación y preparación adecuadas del paciente, la exactitud en la recogida de muestras, la manipulación de las muestras y su transporte al laboratorio. Deben utilizarse indicadores y especificaciones de calidad para las peticiones de analítica, muestreo, transporte y recepción de las muestras, y se debe exigir a los profesionales de laboratorio que controlen y mejoren todas las etapas incluidas en la fase pre-analítica.

#### **1.2.1.1 Control de correcta identificación de muestras**

Cuando se obtiene un espécimen biológico de un paciente, se pueden generar etiquetas de identificación únicas antes o en el mismo momento de la obtención. En algunos casos, no obstante, hay sistemas informáticos que permiten hacer la petición al laboratorio vía terminal remoto. Estos sistemas pueden preparar una lista de trabajo que incluya detalles de la identificación del paciente y las pruebas solicitadas.



Al mismo tiempo, se generan una o varias etiquetas de identificación únicas para pegar al contenedor o contenedores de especímenes. En esta situación, la persona que recibe el espécimen solamente debe “identificar positivamente al paciente” y pegar la etiqueta en el contenedor de recogida identificándolo así de manera única. Los datos de identificación del espécimen permanecen pegados al contenedor de especímenes durante todo el proceso analítico (Burnett et al., 1993).

Sin embargo, el laboratorio recibe, por lo general, una petición cumplimentada, ya sea junto con el espécimen o bien para solicitar su recogida protocolizada. Es importante asegurar que en el contenedor del espécimen y en la petición se registren unos datos mínimos de modo que puedan relacionarse inequívocamente.

#### **1.2.1.2 Cadena de custodia**

El mecanismo por el cual el espécimen se asocia con el paciente y la petición es de vital importancia. Cuando la asociación deba ser comprobada a efectos legales, puede que cada paso de las actividades del proceso operativo tenga que ser verificado por terceros. La llamada “cadena de custodia” empieza con la identificación del paciente y continua a través de todo el proceso operativo hasta que es emitido el informe (Hawcroft y Hector, 1987; de los Santos et al., 2013).

#### **1.2.2 Calidad de la fase analítica (metrológica)**

El control de calidad analítico es el término utilizado para describir los pasos prácticos encaminados a asegurar que los errores en los datos analíticos estén dentro de un margen de error aceptable. Esto significa que los errores inevitables cometidos son cuantificados para permitirnos decidir si son de una magnitud aceptable y que errores inaceptables son descubiertos para decidir qué acción correctiva puede ser tomada. Las técnicas y actividades implicadas en el control de calidad analítico pueden ser divididas en tres niveles de operación: (1) Control de primera línea (control de instrumentos/calibración); (2) Control de segunda línea (control de calidad interno); (3) Control de tercera línea (control de calidad externo).

El valor verdadero de una magnitud se obtendría con una medición perfecta, pero como tal medición no existe, el valor verdadero es incognoscible. Por lo tanto,

aunque en la teoría se use el valor verdadero, en la práctica se utilizan otros valores considerados convencionalmente como verdaderos.

La variabilidad analítica puede desglosarse en aleatoria y sistemática, según se trate de errores sistemáticos o aleatorios. El error sistemático es la diferencia entre la media que se obtendría de un número infinito de mediciones (en la práctica vale con  $n \geq 20$ ) del mismo mesurado y su valor verdadero. El error aleatorio es la diferencia entre el resultado de una medición y la media que se obtendría de un número infinito de mediciones (en la práctica vale con  $n \geq 20$ ) de la misma magnitud particular (Stöckl et al., 1996). El error total (o inexactitud) es el concepto que integra la variabilidad aleatoria y la sistemática de manera que es la diferencia entre el resultado de una única medición y el valor verdadero del mesurado.

Cuando se realizan series de mediciones sucesivas, el error sistemático permanece constante o varía de forma previsible, mientras que los errores aleatorios varían de forma imprevisible. Con los procedimientos de medida se producen errores aleatorios, por ello, al efectuar mediciones repetidas de una magnitud biológica en un mismo espécimen realizado bajo condiciones rutinarias de trabajo, generalmente no se obtienen resultados iguales entre sí. La concordancia entre resultados de medida independientes obtenidos en un mismo espécimen en unas condiciones estipuladas se denomina “precisión”; cuanto menor es la dispersión de resultados mayor es la precisión y viceversa.

La variabilidad analítica debida a fluctuaciones aleatorias se cuantifica mediante la desviación típica analítica, varianza, o coeficiente de variación analítico. Según la definición de la Federación Internacional de Química Clínica, la “imprecisión” es la desviación típica o el coeficiente de variación de los resultados de un conjunto de medidas repetidas. Idealmente la imprecisión interdiaria de cualquier procedimiento de medida debería ser nula. Es importante establecer cuál es la desviación típica interdiaria máxima tolerable (denominada especificación de calidad), de manera que esta debe ser tal que permita diferenciar entre una variación intraindividual fisiológica y una variación intraindividual debida a algún estado patológico; también debiera permitir la detección de variaciones fisiológicas intraindividuales no descritas hasta el momento (Fraser et al., 1992).

La concordancia entre la medida obtenida a partir de un amplio número de resultados de la medición de una magnitud particular y su valor verdadero se denomina “exactitud”; la exactitud es un concepto cualitativo, y no posee valor numérico.

La variabilidad analítica debida a variaciones sistemáticas del procedimiento de medida se cuantifica mediante el error sistemático, que se estima calculando la diferencia entre la medida de un gran número de mediciones repetidas y el valor verdadero.

Nuestro grupo ha establecido las especificaciones de calidad para los parámetros seminales, según diversos modelos propuestos por la Conferencia de Estocolmo (Kenny et al., 1999), basadas en la variación biológica (Álvarez et al., 2003), basadas en el estado del arte (Castilla et al., 2005), y basadas en la opinión de los clínicos (Aguilar et al., 2008; Clavero et al., 2014).

#### **1.2.2.1 Control de calidad interno**

Como hemos comentado, para poder confiar en que los productos del laboratorio clínico cumplan los requisitos preestablecidos, es necesario realizar un conjunto de acciones internas o externas conocido como “aseguramiento de la calidad”. Estas acciones deben estar planificadas, deben realizarse sistemáticamente y deben ser demostrables. Las acciones internas consisten en la selección de los procedimientos de medida y el control de los procedimientos, todo ello con el fin de detectar y corregir las disconformidades que se hayan producido y, en última instancia, decidir sobre la conformidad de los informes de laboratorio clínico. El conjunto de estas acciones se conoce como control interno de la calidad (Fuentes y Panadero, 1998).

El control de los resultados pretende, en primera instancia, detectar la existencia de errores de medida superiores a los tolerables, pudiendo utilizarse diferentes materiales (Tabla 3). A los resultados obtenidos de analizar estos materiales se les aplicará diferentes técnicas estadísticas (gráficas de Levy-Jennings, gráficas de Youden, sumas acumuladas o cálculos de la media mensual de las muestras de pacientes analizados).

**Tabla 3. Materiales con los que realizar el Control de Calidad Interno y Externo en el análisis de semen.**

<b>Actividad</b>	<b>Control de Calidad Interno</b>	<b>Control de Calidad Externo</b>
Concentración espermática	Semen crioconservado	Semen crioconservado
	Video	Video
	Suspensión espermática	Suspensión espermática
	Suspensión bolitas látex	Suspensión bolitas látex
Movilidad espermática	Semen crioconservado	Semen crioconservado
	Video	Video
Morfología espermática	Semen crioconservado	Semen crioconservado
	Video	Video
	Portas teñidos	Portas teñidos
	Portas fijados	Portas fijados
	Fotos	Fotos
Vitalidad espermática	Semen crioconservado	Semen crioconservado
	Video	Video
	Portas teñidos	Portas teñidos
Test hipoosmótico	Semen crioconservado	Semen crioconservado
	Video	Video
Anticuerpos antiespermatozoides directo	Semen crioconservado	Semen crioconservado
	Video	Video
Anticuerpos antiespermatozoides indirecto	Sueros	Sueros

Otros aspectos claves del Control de Calidad Interno son: control de la variabilidad interobservador, formación de nuevo personal y la evaluación de los métodos (Fuentes y Panadero, 1998). Una parte importante del control interno es controlar las diferencias interobservador y realizar reuniones para homogenizar criterios, para que las diferencias entre los distintos técnicos sean mínimas (Franken et al., 2000; Björndahl et al., 2002; Franken et al., 2003).

La aplicación de medidas de control de calidad interno, a nivel de observador, cuando entra a formar parte de un equipo de trabajo un nuevo miembro, exigen que este sea debidamente instruido y realice mediciones en paralelo con el resto del equipo hasta conseguir que no existan desviaciones sistemáticas. Por lo tanto, la formación del nuevo personal para llevar a cabo técnicas en un laboratorio de andrología constituye la piedra angular de la garantía de calidad. La curva de aprendizaje es el esfuerzo requerido para adquirir la nueva habilidad en un periodo de tiempo específico. El tipo de curva (ascendente o gradual) depende de la dificultad inherente de la técnica. El proceso de aprendizaje tiene que ser seguido de cerca, documentado y estar aprobado por el director del laboratorio. Por lo tanto, es importante establecer unos criterios de formación y un umbral de rendimiento que debe cumplirse con el fin de garantizar la experiencia necesaria para realizar los procesos independientemente. Igualmente, es deseable que unas medidas de control de calidad se apliquen con el fin de garantizar que dichos umbrales de rendimientos se mantienen una vez alcanzados. Los diferentes niveles de habilidad descritos para el análisis de semen serían: (1) comprensión básica establecida, (2) capaz de trabajar bajo supervisión, (3) permiso para trabajar sin supervisión; y (4) capaces de formar a otras personas.

#### **1.2.2.2 Control de calidad externo**

Los programas de evaluación externa de la calidad más conocidos son los denominados tipo I (Fuentes y Panadero, 1998) basados en la participación de diversos laboratorios que miden, con los mismos o diferentes procedimientos de medida, una o más magnitudes en los mismos materiales de control, y en el que los resultados obtenidos por un laboratorio son comparados con los resultados obtenidos por el resto de los laboratorios participantes o expertos. Por tanto, permite conocer cómo están funcionando los procedimientos de medida de un determinado laboratorio

en relación a cómo funcionan en otros laboratorios. Por otra parte, los programas de control de calidad entre laboratorios constituyen la base de la transferibilidad de los resultados (Álvarez et al., 1989).

Los programas de evaluación externa de la calidad suelen estar organizados por fabricantes de materiales de control, organismos oficiales o sociedades científicas. La participación es voluntaria, aunque en algunos países la ley obliga a los laboratorios a participar en un programa de evaluación externa de la calidad y sus resultados pueden ser inspeccionados oficialmente.

La participación en un programa de evaluación externa de la calidad facilita información (anónima) cualitativa en comparación con otros laboratorios. Además, se obtienen una serie de ventajas que van más allá de la posibilidad de comparar resultados de su propio laboratorio con el conjunto de los resultados de otros laboratorios. Los programas con ensayos cuantitativos subdividirán a los participantes en grupos de métodos o en grupos de instrumentos, y esto permite al participante juzgar si está “trabajando como la mayoría”. Estos datos informan al laboratorio sobre las tendencias en diferentes métodos de medida. Otro aspecto importante de la evaluación externa de la calidad es su uso para finalidades de formación. Por ejemplo, el organizador del programa no sólo enviará muestras para analizar, sino que también en determinados casos remitirá el contexto clínico en el que los resultados han de ser interpretados. Este sistema pone en juego no sólo la capacidad del laboratorio de producir buenos resultados, sino también de interpretarlos frente a valores de referencia y en el contexto de la problemática clínica (Burnett, 1998).

El manual de la OMS (2010) de análisis de semen hace diferentes apuntes sobre dichos programas. Se recomienda que los programas de control de calidad externo e interno se complementen. Que las muestras del control de calidad externo se analicen de la misma manera que si fueran muestras de rutina, por lo que métodos o técnicas de rutina que no puedan aplicarse a los materiales del control de calidad externo no deben ser utilizados, ya que un método analítico que no puede ser evaluado difícilmente alcanzará niveles adecuados de precisión. En este sentido y dado que la mayoría de programas de control de calidad externo europeos utilizan para la evaluación de la movilidad grabación en disco versátil digital (DVD), se recomienda por el Comité de Control de Calidad del Grupo de Interés Especial en

Andrología (SIGA) de la ESHRE que el personal técnico del laboratorio de Andrología se acostumbra a la evaluación rutinaria de la movilidad a través de monitores de vídeo (Bjorndahl et al., 2010).

Las muestras empleadas en los programas de control de calidad externo deberán abarcar todo el rango clínico de los parámetros seminales. En caso de utilizarse pocas muestras en el programa de control de calidad externo deberán utilizarse aquellas que tengan parámetros próximos a niveles de decisión clínica (en concentración entre 3-30 mill/mL, en movilidad entre 10-40% de espermatozoides móviles, y en morfología entre 0-15% de formas normales). Dicho material debe proceder de varones seronegativos para HIV y hepatitis.

En la Tabla 3 aparecen reflejados algunos ejemplos de con qué material realizar el control de calidad externo. Todo este material tiene ventajas e inconvenientes. Así, la evaluación de movilidad por DVD tiende a dar unos resultados muy optimistas sobre la imprecisión, que puede hacer que muchos laboratorios consideren innecesario dos lecturas de la movilidad. El semen congelado puede presentar problemas a la hora de la homogeneización, y los portas teñidos tienden a decolorarse y los fijados a deteriorarse. Por esto, el material debe analizarse lo antes posible desde la recepción.

Distintos programas de control de calidad externo para el análisis de semen se han puesto en práctica por diversas Sociedades Científicas en varios países europeos (por ejemplo QuaDeGA en Alemania, PNEEC en Reino y el programa de EQA de la ESHRE). En España, tras una experiencia piloto con 18 laboratorios, se instauró en 1999 el primer programa de control de calidad externo auspiciado por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) dicho programa está coordinado por el Comité de Control de Calidad del SIGA-ESHRE y organizado por laboratorio CEIFER de Granada. Actualmente, el material de dicho programa es también distribuido al programa de evaluación externa de la calidad de la Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA) y de la Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM) y sus resultados procesados en conjunto (Castilla et al., 2005). Siendo un programa de control de calidad externo tipo I, es decir, consiste en analizar alícuotas de una misma muestra en diferentes laboratorios dos veces al año. El procesamiento de los resultados se realiza de forma anónima,

introduciendo los datos por duplicado con verificación de los mismos en la aplicación informática encargada de su análisis estadístico. Todos los resultados se analizan por técnica y método utilizado, calculándose media, desviación estándar, coeficiente de variación, máximo, mínimo y rango intercuartílico. Se descartan todos los valores que sean  $\pm 3DS$  (Álvarez et al., 2005; Palacios et al., 2012).

En resumen, la participación en programas de control de calidad externo, permite a un laboratorio determinado comparar sus resultados con los del resto de los grupos participantes o los resultados obtenidos por expertos (Palacios et al., 2012). También permite la evaluación y comparación entre diferentes métodos dentro de un mismo laboratorio, siendo por tanto, una herramienta clave en el aseguramiento de la calidad analítica (Cooper et al., 1999).

### **1.2.3 Calidad de la fase post-analítica**

Comprende todas las actividades, desde la obtención del resultado de la medición de una magnitud, hasta su llegada al solicitante. El informe de los resultados ha de ser claro y simple, y debe incluir la determinación o actividad realizada, y en el caso del análisis de semen, la unidad de medida y el límite inferior de referencia. Los laboratorios deben tener personal que pueda asesorar a los clínicos en la evaluación e interpretación de los resultados de las pruebas y técnicas del laboratorio, y de la precisión, exactitud y eficacia de los métodos utilizados. El término "elaboración de informes" incluye tanto el contenido del informe y la validación de los datos, como la información en sí misma. Normalmente se describen dos tipos de validación: la técnica y la clínica.

En las rutinas administrativas es importante que, además de un correcto manejo de los documentos, el laboratorio cuente con rutinas adecuadas para reaccionar a los "valores de alarma" (azoospermia por ejemplo, en hombres con una concentración espermática previa superior a los límites inferiores de referencia), así como procedimientos estándar para hacer frente a las quejas de los pacientes y clínicos. Otro aspecto importante es controlar el tiempo entre la recogida de la muestra de semen y la entrega del informe final al clínico que lo ha solicitado.



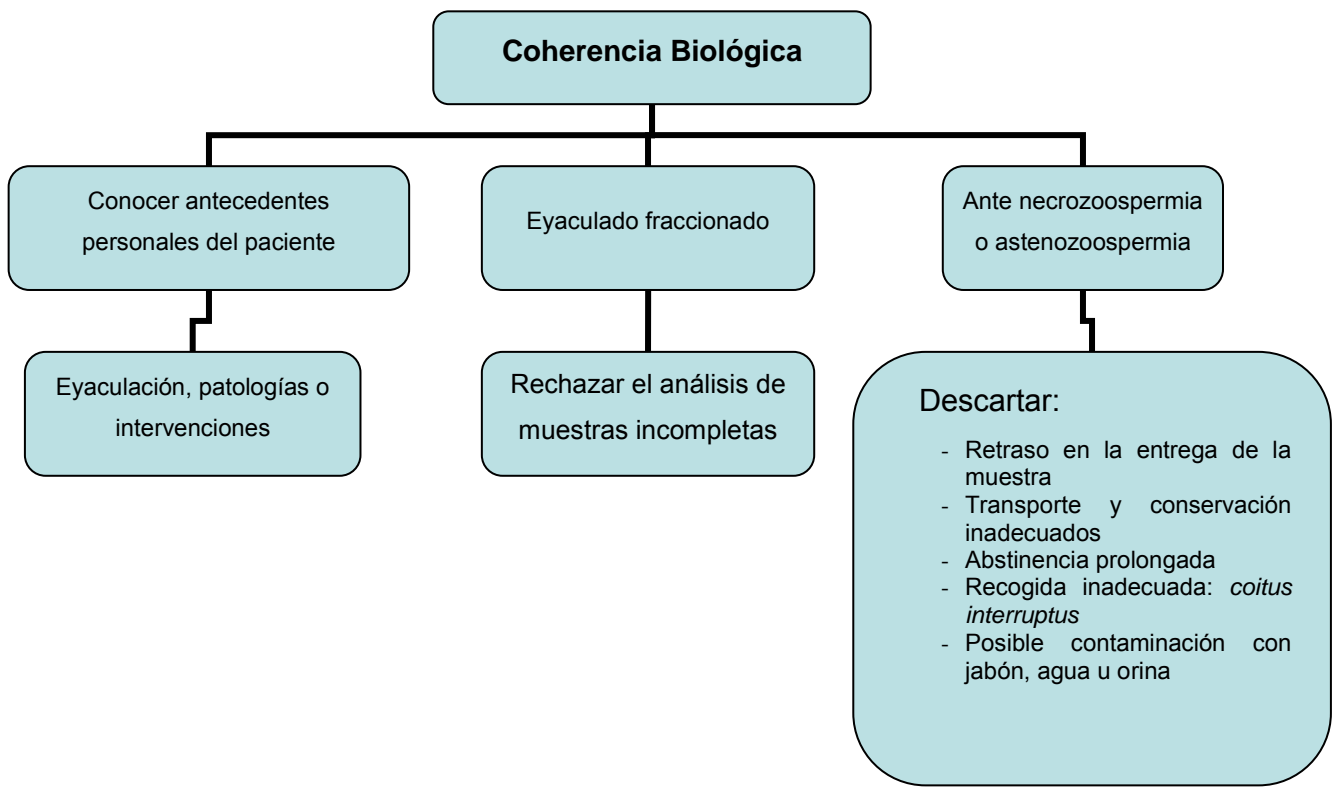
### **1.3 Interpretación del análisis de semen**

Para que un análisis de semen sea clínicamente útil, debemos asegurar la coherencia biológica y analítica de los resultados y tener presente determinadas limitaciones del análisis de semen y sus valores de referencia. Para todo esto será fundamental tener presente diferentes aspectos antes (fase preanalítica), durante (fase analítica) y después (fase postanalítica) de su realización, así como la utilización de técnicas y criterios reconocidos internacionalmente como los editados por la OMS.

#### **1.3.1 Coherencia biológica**

Se debe tener presente la eyaculación fraccionada heterogénea del semen humano, comentada anteriormente, y los factores clínicos que afectan a su calidad para realizar interpretaciones fisiopatológicas coherentes. Por tanto, cualquier resultado que obtengamos de analizar una muestra incompleta no reflejará el total del eyaculado, por lo que nunca deben analizarse muestras incompletas. Éstas las sospecharemos ante casos de una alta concentración de espermatozoides y escaso volumen, o ante bajos recuentos con escaso volumen con seminogramas normales anteriores (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de coherencia biológica en un análisis de semen.



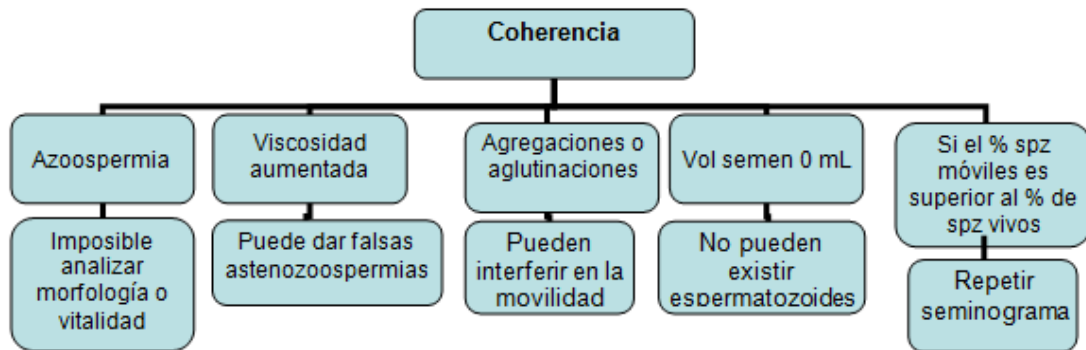
De igual manera deberemos interpretar una posible influencia negativa, principalmente ante déficit de movilidad espermática con análisis anteriores normales, o ante necrozoospermia totales, si existe:

- Retraso en la entrega de la muestra en laboratorio desde su recogida.
- Transporte y conservación inadecuados de la muestra.
- Periodos de abstinencia prolongados.
- Recogida inadecuada: *coitus interruptus*.
- Posible contaminación de la muestra con jabón, agua u orina.

Deberemos tener presente, para una adecuada coherencia biológica de nuestro informe, si el paciente padece alguna patología (anorquia, agenesis bilateral de conductos deferentes, etc.) o ha sido sometido a alguna intervención (vasectomía) o ha estado expuesto a diferentes factores y fármacos, enfermedades sistémicas, etc. (Mortimer et al., 2013).

### 1.3.2 Coherencia analítica

La obtención de determinados resultados puede llevar a la imposibilidad de valorar otras magnitudes del seminograma básico (Tabla 1). Por ejemplo, en caso de azoospermia no podremos realizar análisis de movilidad o morfología. En casos de astenozoospermia no podremos realizar la determinación de anticuerpos antiespermatozoide, informando en estos casos estas pruebas como “no valorables” (Figura 2).

**Figura 2. Diagrama de coherencia analítica en un análisis de semen.**

En otras ocasiones determinados resultados deben resaltarse pues condicionan la interpretación del análisis de semen. Por ejemplo, la presencia de agregaciones o aglutinaciones. Su presencia puede interferir en la valoración de la movilidad, ya que podríamos interpretar como no progresivo a un elevado número de espermatozoides progresivos que se encuentran capturados. De esta manera, si el porcentaje de espermatozoides atrapados es mayor de 25%, la valoración de la motilidad se realizará exclusivamente con espermatozoides libres, debiéndose anotar que porcentaje de espermatozoides se encuentran atrapados (Björndahl et al., 2010).

Si la muestra posee una viscosidad elevada pueden producirse “falsas astenozoospermias”, además de valoraciones muy dispares. Si tal eventualidad se solventa mediante la dilución con medio, en el seminograma se deberá anotar que la valoración se ha realizado con la muestra diluida.

A veces la obtención de determinados resultados nos obligará a repetir determinados procedimientos analíticos o nos invalidará el análisis de semen y nos obligará a solicitar una nueva muestra. Por ejemplo, cuando el porcentaje de espermatozoides móviles sea superior al porcentaje de espermatozoides vivos o la suma de espermatozoides móviles totales sea mayor o menor que la suma de espermatozoides progresivos y no progresivos. No pueden existir espermatozoides si el volumen de semen es cero.

En función del resultado obtenido en el seminograma se distinguen las patologías que se describen a continuación.

- **Aspermia:** ausencia de semen (o eyaculación retrógrada).
- **Astenozoospermia:** porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.
- **Astenoteratozoospermia:** porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia.
- **Azoospermia:** ausencia de espermatozoides en el eyaculado, definido como el límite inferior de cuantificación por el método de conteo utilizado.
- **Criptoospermia:** ausencia de espermatozoides en la muestra en fresco y presencia en el pellet tras centrifugado de la muestra.

- **Hemospermia:** presencia de eritrocitos en el eyaculado (Hematospermia).
- **Leucospermia:** presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del valor umbral (Leucocitospermia, piospermia).
- **Necrozoospermia:** bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
- **Normozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado), porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides con morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia.
- **Oligoastenozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) y porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligoastenoteratozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado), porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligoteratozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) y porcentaje de espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) por debajo del límite inferior de referencia.
- **Teratozoospermia:** porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia.

#### 1.4 Evolución de la calidad seminal

Los factores sociales, epidemiológicos y ambientales parecen incidir sobre los distintos parámetros seminales, incluida la morfología. La exposición a factores ambientales, tales como la presencia de pesticidas, insecticidas y metales pesados repercutirían directamente sobre la espermatogénesis disminuyendo la calidad seminal (Juul et al., 2014). De igual modo, el uso abusivo de drogas, alcohol, medicamentos inadecuados, infecciones oportunistas de glándulas sexuales masculinas y el estrés afectarían de forma negativa a la calidad seminal.

Todos estos factores han hecho que sean numerosos los autores que han descrito una evidente disminución de la calidad seminal en las últimas décadas (Jørgensen et al., 2011; Mendiola et al., 2013; Rolland et al., 2013) aunque otros, en cambio, no la detecten (Fish et al., 1996; Thorup et al., 2010; Fisch y Braun, 2013).

Según algunos autores la calidad seminal ha disminuido a lo largo de los últimos cincuenta años en los países industrializados (Carlsen et al., 1992; Swan et al., 2000). Los estudios indican una disminución significativa del 50% en la calidad seminal de hombres sin problemas de fertilidad (Carlsen et al., 1992). Estos resultados han sido muy discutidos dentro de la comunidad científica realizándose diferentes intentos de volver a analizar los datos (Andersen et al., 2000; Swan et al., 2000; Jouannet et al., 2001). Sin embargo, la cuestión de los cambios temporales en la calidad seminal sigue siendo un tema controvertido, hay estudios que concluyen que la calidad del semen no ha variado o que incluso ha aumentado en algunas regiones (Jouannet et al., 2001). Sin embargo, otras investigaciones encontraron un deterioro de la calidad seminal en hombres jóvenes de la población general en el norte (Andersen et al., 2000; Jørgensen et al., 2002) y sur de Europa (Fernández et al., 2012; Mendiola et al., 2013). Aproximadamente el 20% de los hombres jóvenes de varios países europeos tenían una concentración espermática por debajo del nivel de referencia de la OMS y el 40% de los hombres tenía una concentración de espermatozoides por debajo del nivel que se ha asociado con la prolongación del tiempo hasta el embarazo ( $40 \times 10^6$  spz/ml) (Bonde et al., 1998; Geoffroy-Siraudin et al., 2012). Recientemente se ha descrito un declive de la calidad seminal en países de casi todos los continentes; África (Feki et al., 2009), Asia (Dama y Rajender, 2012; Haimov-Kochman et al., 2012), Europa (Geoffroy-Siraudin et al., 2012), Oceanía (Shine et al., 2008). Estas tendencias en la calidad seminal también pueden tener implicaciones más amplias para la salud en general, ya que los hombres con baja calidad seminal parecen tener aumentadas las tasas de mortalidad teniendo también una menor esperanza de vida (Jensen et al., 2009).

Estudios realizados en todo el mundo sobre hombres fértiles utilizando protocolos estandarizados han demostrado diferencias regionales significativas en la calidad seminal (Jørgensen et al., 2001; Swan et al., 2003; Iwamoto et al., 2006). Los hombres finlandeses tienen una concentración espermática un 35% mayor que los varones daneses, siendo estos últimos los que peores resultados mostraron en

cuanto a concentración espermática y recuento total de espermatozoides seguidos de los escoceses y lo franceses (Jørgensen et al., 2001). No se encontraron diferencias regionales similares en la calidad del semen de hombres fértiles de diferentes ciudades de Estados Unidos (Swan et al., 2003). También se encontró que los japoneses fértiles tenían una concentración espermática del mismo bajo nivel que los hombres daneses (Iwamoto et al., 2006), teniendo los hombres de Singapur concentraciones aún más bajas (Chia et al., 1998). Las razones de estas diferencias geográficas significativas en la calidad seminal son en gran parte desconocidas y deben seguir siendo examinadas. Se han observado diferencias regionales similares en otros trastornos del sistema reproductor masculino, incluyendo cáncer testicular de células germinales (TGC) y malformaciones congénitas del tracto reproductor masculino (Skakkebæk et al., 2001).

### 1.5 Estilo de vida y calidad seminal

Durante los últimos 50 años se han producido grandes cambios en el estilo de vida occidental. Un estudio inicial por Laven et al. (1988) sugirió que los hábitos de vida podían desempeñar un papel clave en la calidad del semen. El estilo de vida contribuiría a las tendencias negativas observadas en la salud reproductiva masculina. Los factores socio-psico-conductuales más estudiados son los siguientes:

**Índice de masa corpora (IMC):** La obesidad está alcanzando proporciones epidémicas en todo el mundo (Mokdad et al., 2001; Caballero, 2007). Varios estudios en hombres de la población general y en hombres infértiles (Kolozsar et al., 2005; Magnúsdóttir et al., 2005; Kort et al., 2006; Hammoud et al., 2008; Martini et al., 2010; Sermondade et al., 2013) han demostrado que la obesidad masculina se asocia con una reducción de la calidad seminal. Además el bajo índice de masa corporal también se asocia con una reducción de la calidad del semen (Jensen et al., 2004a). Sin embargo, otros estudios indican que el índice de masa corporal no tiene un efecto significativo sobre la calidad seminal (Li et al., 2011). Recientemente, un estudio multicéntrico realizado a 330 pacientes infértiles ha asociado la obesidad con un mayor riesgo de daño en el ADN espermático (Dupont et al., 2013) en discordancia con Eisenberg et al. (2014), que sólo encuentra asociaciones negativas para el volumen y el recuento espermático.



**Tabaco:** Son numerosos los estudios que han observado un deterioro de la calidad seminal producida por el tabaquismo (Shen et al., 1997; Segerie et al., 2000; Gour et al., 2010; Li et al., 2011; Yu et al., 2013). Un meta-análisis publicado en 1994 sobre la base de 20 estudios (Vine et al., 1994) encontró que los fumadores tuvieron una reducción significativa en la concentración espermática y un estudio danés en hombres de la población general observó una relación dosis-respuesta entre el tabaquismo y la movilidad de los espermatozoides y el recuento total de espermatozoides (Ramlau-Hansen et al., 2007a). Curiosamente, el tabaquismo materno durante el embarazo tiene un impacto negativo muy pronunciado en la calidad seminal en la descendencia lo que indica que la exposición prenatal también es importante (Storgaard et al., 2003; Jensen et al., 2004b; Ramlau-Hansen et al., 2007b). Se ha demostrado en algunos estudios que el tabaquismo materno durante el embarazo aumenta el riesgo de hipospadias (Brouwers et al., 2007) y criptorquidias (Thorup et al., 2006; Jensen et al., 2007) en la descendencia masculina. Por otro lado, un meta-análisis ha demostrado que el tabaquismo materno durante el embarazo no se asocia con un mayor riesgo de cáncer testicular de células germinales (TGC) en los hijos (Tuomisto et al., 2004). Sin embargo, el considerable aumento de la prevalencia del tabaquismo entre las mujeres jóvenes en la mayoría de los países europeos en los últimos años sólo puede agravar la incidencia de los problemas reproductivos masculinos si estas mujeres continúan fumando durante el embarazo.

El tabaquismo pasivo es factor de riesgo para la concentración espermática y el recuento total de espermatozoides (Wu et al., 2004). Fumar cigarrillos reduce la producción de esperma y aumenta el estrés oxidativo, el daño en el ADN y los niveles de peroxidación lipídica (Linschooten et al., 2011; Fariello et al., 2012). Los espermatozoides de los fumadores tienen reducida su capacidad de fecundación y sus embriones muestran tasas de implantación más bajas (Soares y Melo, 2008). El tabaquismo masculino se ha asociado con una disminución significativa de las tasas de nacidos vivos, incluso después de ajustar por factores de confusión (Fuentes et al., 2010). Estudios *in vitro* con extracto de humo de cigarrillo revelaron la supresión de la movilidad de los espermatozoides en una concentración y tiempo dependiente, así como un aumento del número de espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial (Calogero et al., 2009). Además, el extracto de humo de cigarrillo tiene efectos perjudiciales sobre la condensación de la cromatina y la

apoptosis, el aumento del número de espermatozoides con externalización fosfatidilserina (una señal apoptótica temprana) y ADN fragmentado (una señal apoptótica tardía) (Calogero et al., 2009).

También se han establecido los efectos adversos de la nicotina sobre la sexualidad. Puede causar disfunción sexual debido a los cambios de arteriosclerosis en los vasos del pene, y el consiguiente desarrollo de la disfunción eréctil. La nicotina también puede empeorar la infertilidad debido a otras causas (el llamado "efecto de co-factor") donde fumar puede exacerbar la acción de un varicocele (Peng et al., 1990).

**Alcohol:** Existen discrepancias en cuanto a los efectos del alcohol en la fertilidad masculina. Mientras que diferentes trabajos no han podido demostrar una reducción de la calidad seminal en varones en relación con un consumo moderado y excesivo de alcohol (Jensen et al., 1998; Li et al., 2009; Povey et al., 2012; Jensen et al., 2014), otros autores han identificado el consumo de alcohol como factor de riesgo significativo para la calidad seminal (Gaur et al., 2010; Li et al., 2011).

Además el efecto conjunto de la bebida y el tabaco tiene un efecto significativo sobre la calidad seminal, bebedores que también eran fumadores tuvieron una reducción significativa en la concentración espermática y la movilidad de los espermatozoides en comparación con los que sólo fumaban (Martini et al., 2004).

**Cafeína:** No se ha demostrado que el consumo de café tenga efectos significativos sobre la calidad seminal (Ramlau-Hansen, 2008; Li et al., 2011), ni parece afectar a la fertilización, embarazo y recién nacido vivo en lo que respecta al espermatozoide (Klonoff-Cohen et al., 2002). Los estudios publicados sobre el efecto de la cafeína en la fragmentación del DNA de los espermatozoides son limitados y contradictorios (Peck, 2010).

**Teína:** El consumo de té es factor protector para la movilidad espermática progresiva (Wu et al., 2004).

**Marihuana:** El uso de drogas ilícitas es una causa bien establecida de infertilidad masculina, la marihuana es una de las drogas más utilizadas (Fronczak et

al., 2012).  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol (THC), el cannabinoide psicoactivo en la marihuana, reduce la secreción de gonadotropinas, en particular de LH (Smith y Asche, 1987), deprime la secreción de testosterona por el testículo (Kolodny et al., 1974) y el recuento de espermatozoides disminuye como consecuencia. El THC reduce notablemente la movilidad progresiva en los espermatozoides humanos, así como su capacidad para someterse a la reacción acrosómica (Whan et al., 2006). En ratones, el THC atenúa la movilidad del esperma y la fecundidad masculina (Morgan et al., 2012). Recientemente se ha encontrado una asociación negativa entre el consumo de cannabis y la morfología espermática (Pacey et al., 2014).

**Opiáceos:** Los opiáceos, como la heroína y la morfina, son otra causa indirecta de la reducción de gonadotropinas. El consumo de opiáceos de forma legal es limitado en dosis y en duración, que se limita a un período post-operatorio o para pacientes terminales. El uso prolongado de opiáceos suele darse en adictos a la heroína. Se ha observado una alteración en el número, movilidad y morfología de los espermatozoides en adictos y ex adictos a heroína (Singer et al., 1986). Grandes dosis de opiáceos tienen un efecto anti-dopamina y elevan el nivel de prolactina en suero, que a su vez reduce la secreción de LH (Torre y Falorni, 2007) y por lo tanto el nivel de la secreción de testosterona; un efecto similar se puede observar en los usuarios de marihuana. Dado que el nivel de testosterona se puede normalizar mediante la administración de hCG se deduce que los opiáceos no tienen ningún efecto directo sobre el propio testículo.

**Cocaína:** La cocaína es un estimulante del sistema nervioso central y, en dosis moderadas, suprime tanto la LH como la prolactina sérica. No hay estudios importantes sobre los efectos de la cocaína sobre la reproducción humana, pero se ha sugerido que los recuentos de espermatozoides anormales son significativamente más comunes entre los consumidores de cocaína que entre los no usuarios (Bracken et al., 1990).

**Esteroides anabolizantes:** Los esteroides anabolizantes que suelen emplearse en culturismo para estimular el crecimiento de la masa muscular tienen graves efectos dañinos en la fertilidad masculina, ya que retroinhiben casi totalmente el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, reduciendo drásticamente la producción de FSH y LH. Este descenso hormonal acaba convirtiéndose en hipogonadismo,

disfunción eréctil por falta de Testosterona y descenso en la densidad espermática (Buffum, 1983).

La infertilidad después del abuso de esteroides anabolizantes se presenta comúnmente como oligozoospermia o azoospermia, asociada con anormalidades en la movilidad y morfología espermáticas (Dohle et al., 2003). Según la mayoría estudios, la producción espermática suele volver a la normalidad a los 3-4 meses después de interrumpirse el tratamiento con esteroides anabolizantes (Turek et al., 1995), aunque se han visto casos de azoospermia continuada durante casi un año después de suspender al tratamiento (Hirst, 1998; Monoski et al., 2002).

**Edad:** En la literatura, los estudios que evalúan la asociación de la edad con los distintos parámetros seminales presentan resultados controvertidos. Mientras que algunos autores asocian el aumento de la edad masculina con una disminución en el volumen de semen, pero no con el resto de parámetros seminales (Kidd et al., 2001; Balasch, 2010; Dain et al., 2011), otros autores encuentran esta asociación negativa de la edad sobre la movilidad espermática (Sloter et al., 2006) y la morfología (Gao et al., 2007; Cocuzza et al., 2008). Li et al. (2011) identifican la edad avanzada como factor de riesgo significativo para la calidad seminal.

**Estrés:** El estrés es uno de los problemas sanitarios y sociales más importantes. Es responsable de varias enfermedades y desempeña un papel perjudicial en la fertilidad. A menudo trastornos psicológicos se han sugerido como causa de infertilidad inexplicada (Hjollund et al., 1999; Sheiner et al., 2002). Greil (1997) informó acerca de la asociación entre los factores psicológicos y la infertilidad, lo que supuso el indicio de que el estrés puede ser un factor causal en la infertilidad. Algunos estudios indican que no existe una asociación significativa entre el estrés y la calidad del semen (Auger et al., 2001; Hjollund et al., 2004) en cambio otro estudio identifica el estrés psicológico como factor de riesgo significativo para la calidad seminal (Li et al., 2011).

**Calor:** Mientras que no hay efectos adversos establecidos de la exposición al frío sobre el testículo o el epidídimo hasta que se produce la congelación, hace tiempo que se sabe que el calor provoca efectos negativos sobre la espermatogénesis y la espermiogénesis de modo que la aplicación de calor al escroto

reduce la calidad seminal (Goldstein y Eid, 1989). Esta exposición se puede producir por el uso de mantas (Wu et al., 2004), pantalones ajustados (Zhu et al., 2005), calzoncillos ajustados (Parazzini et al., 1995) entre otros. El uso de los ordenadores portátiles produce un calentamiento escrotal con una consecuente reducción del recuento espermático, aunque parte del efecto se puede atribuir a periodos prolongados sentados con las piernas juntas, (Sheynkin et al., 2011) al haberse observado resultados similares en conductores de larga distancia (Bujan et al., 2000).

**Actividad física:** la actividad física influye en la calidad seminal de distinta forma según la intensidad y la duración de esta (Vaamonde et al., 2009). De modo que el sedentarismo es un factor de riesgo para la concentración espermática (Wu et al., 2004). Los hombres físicamente activos tienen mejor calidad seminal que los hombres sedentarios (Vaamonde et al., 2012) resultando la actividad física intensiva perjudicial para la calidad seminal (Jensen et al., 1995; Vaamonde et al., 2006) Otros autores sugieren que la actividad física no es perjudicial para la función testicular de los jóvenes del sur de España (Mínguez-Alarcón et al., 2014) siendo los jóvenes que realizan una actividad física moderada y que menos horas de televisión consumen al día, los que mejor calidad seminal tienen (Gaskins et al., 2013).

**Teléfono móvil y Wifi:** Las radiaciones emitidas por los teléfonos móviles y Wifi alteran la calidad seminal. Un metanálisis publicado recientemente encontró una asociación negativa entre el uso del móvil y la calidad seminal (Dama et al., 2013). Además el uso de portátiles con wifi se ha relacionado con una disminución de la calidad seminal (Avendaño et al., 2012).

**Dieta:** Los problemas de alimentación pueden deberse a desnutrición o déficit de alimentos, que no es lo habitual en nuestro entorno, o a sobrealimentación o dietas desequilibradas. Diversos estudios han evaluado el impacto de diferentes alimentos, cada vez más consumidos, en la calidad seminal. De este modo, el consumo de bebidas azucaradas en hombres jóvenes sanos se ha asociado con una disminución en la movilidad espermática (Chiu et al., 2014), el consumo de carne procesada se ha asociado con una disminución del recuento espermático (Afeiche et al., 2014), así como el consumo de grasa trans (Attaman et al., 2012; Chavarro et al., 2014). El consumo de lácteos se ha relacionado con una disminución en la calidad seminal (Mendiola et al., 2009; Eslamian et al., 2012) y en particular con el declive de

la movilidad progresiva y la morfología espermática (Afeiche et al., 2013). Por otro lado los antioxidantes pueden tener un impacto positivo en la calidad espermática (Keskes-Ammar et al., 2003; Omu et al., 2008). Por ejemplo, los carotenoides dietéticos se asocian con un aumento en la movilidad espermática y los licopenos con la morfología (Zareba et al., 2013). Por otro lado algunos estudios sugieren que la mala calidad seminal podría estar asociada con una menor ingesta de hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, vitamina C y licopeno y una mayor ingesta de proteínas y grasa total. En general, una baja ingesta de nutrientes antioxidantes parece tener un efecto negativo en la calidad del semen en hombres que acuden a clínicas de infertilidad (Mendiola et al., 2010).

El efecto conjunto de estos factores merece estudios adicionales. Por ejemplo, el estrés psicológico puede afectar la calidad del semen indirectamente mediante el aumento de la utilización de sustancias como el alcohol y el tabaco (Istvan et al., 1986).

## **1.6 Factores ambientales y calidad seminal**

Dentro de los factores medioambientales, deberíamos distinguir tres grupos: factores físicos (temperatura, luz, radiaciones ionizantes, campos electromagnéticos de alta frecuencia), características sociodemográficas y/o antropométricas (residencia, ocupación, hábitos) y factores medioambientales de naturaleza química (contaminantes químicos como pesticidas, componentes de cosméticos, disolventes, plásticos, metales pesados, etc).

### **1.6.1 Disruptores endocrinos**

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).

### **1.6.1.1 Historia y definición**

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, a determinadas sustancias químicas de síntesis, 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 del 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; OMS, 2013).

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). Por otra parte, la potencia hormonal 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).

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) ya advirtió que ciertos productos químicos de síntesis utilizados para el control de las plagas agrícolas se habían difundido de tal manera por todo el planeta que estaban afectando 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 han hecho más que incrementar la preocupación por estos hechos, lo que ha motivado la celebración de varias conferencias "*Estrogens in the Environment*" en el Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente americano (NIEHS, 1997), dónde se definió el término disruptor endocrino (Endocrine Disrupting Chemicals / EDCs). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud ha actualizado el conocimiento científico sobre los compuestos químicos-disruptores endocrinos (EDCs), definidos como sustancias capaces de alterar el equilibrio hormonal y el desarrollo embrionario y provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo vivo o de su descendencia (OMS, 2013). El término EDCs engloba un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen y estructura que se sintetizaron para cumplir funciones muy diversas (Olea et al., 2002). Algunos, una vez que son liberados al medioambiente, pueden acumularse en el organismo por ser lipofílicos y resistentes a la degradación, persistiendo en tejidos grasos; 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 se han establecido medidas de control adecuadas (Porta et al., 2002; 2006). Otros acceden al organismo de forma diaria y cotidiana, son rápidamente excretados (pseudo-persistentes), y contribuyen igualmente a la dosis interna (Olea et al., 2002). En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los test 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.

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; Olea et al., 2002).

#### **1.6.1.2 Características particulares**

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; Fernandez y Olea, 2014). Esta forma especial de toxicidad deriva de 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 de especial vulnerabilidad, como por ejemplo en los estadios tempranos de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen, generalmente, 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.

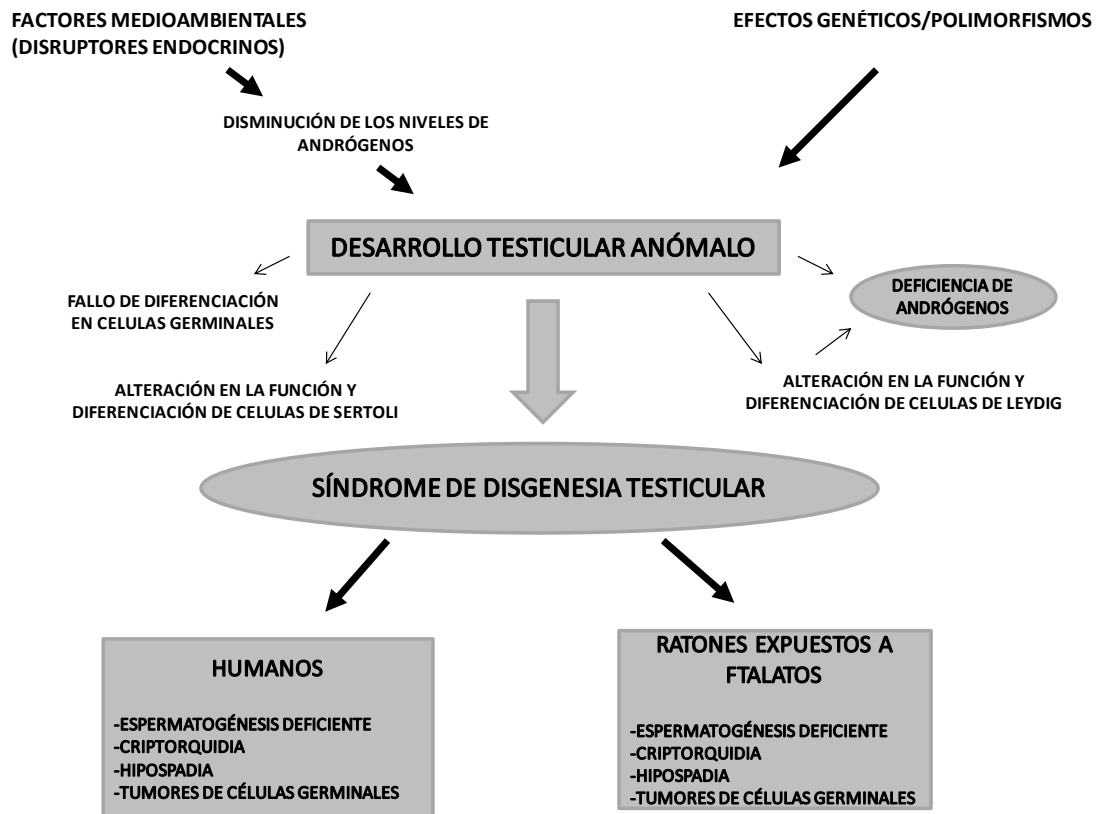
4. Es posible la acción combinada de los disruptores, produciendo efectos paradójicos, ya sean sinérgicos, antagónicos o simplemente aditivos al actuar conjuntamente. Así, en modelos experimentales de laboratorio, los efectos de los disruptores endocrinos ocurren tanto cuando los animales se exponen a concentraciones individuales, a veces muy por encima de las que generalmente el hombre está expuesto, como al exponerlos a mezclas de compuestos en los que la dosis individual de cada sustancia no produce ningún efecto (Christiansen et al., 2008; Sharpe, 2008). Este último modelo experimental es posiblemente el más apropiado, ya que el hombre está expuesto a una mezcla compleja de compuestos químicos contaminantes ambientales (Lopez-Espinosa et al., 2007; Carreño et al., 2007), pudiéndose asumir que los efectos combinados (aditivos, sinérgicos y/o antagónicos) pueden igualmente ocurrir en la vida real. Si este fuera el caso, la complejidad para identificar los agentes causantes o desencadenantes del efecto sería una tarea muy compleja.

#### **1.6.2. Síndrome de disgenesia gonadal**

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) (Figura 3).

**Figura 3. 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) (adaptado de Fisher et al., 2004):**



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 a la espermatogénesis, aparecerán alteraciones en el descenso testicular y una mayor probabilidad de cáncer de testículo.

En palabras de Skakkebaek (2001), 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; Walker 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 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 más 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

contaminación 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 más 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 más 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).

## 2. Plaguicidas

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.

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  $\gamma$  aminobutírico). El DDT y derivados actúan alterando el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  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; Mortimer et al., 2013).

#### 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 solo 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., 2006; de Jager et al., 2009).

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. 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.

#### 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.

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  $\beta$ , y los efectos a nivel de epitelio uterino o vaginal en hembras ooforectomizadas en ratas, ratones y carneros expuestos a lindano o a  $\beta$ -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). En varones produce un efecto negativo en los parámetros seminales (Khan et al., 2010).

### iii) Endosulfán y derivados

El insecticida endosulfán es un derivado del biciclohepteno que ha alcanzado gran importancia en la agricultura. 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).

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.

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.

El 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 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).

#### iv) 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. El HCB está presente en alimentos, por ejemplo, margarinas, leche humana (Campoy et al., 2001), leche esterilizada y alimentos grasos como el queso.

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 criptorquidia 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).

### 3. Exposición a disruptores endocrinos y calidad seminal

Como consecuencia del empleo extendido de compuestos químicos, prácticamente la totalidad de la población presenta concentraciones detectables de algunos contaminantes ambientales (Porta et al. 2006), y aunque la información sobre exposición humana es relativamente reciente, se demuestra que ésta es muy variable en su magnitud, con implicaciones conocidas sólo parcialmente. El elevado número de compuestos químicos, la variedad de sus posibles efectos y la incertidumbre sobre sus consecuencias sobre la salud, ha generado una preocupación razonable en científicos, médicos y ambientalistas, entre otros profesionales, así como en una parte no desdeñable de la sociedad (Toft et al. 2004; Hauser, 2006; Swan, 2008).

La hipótesis de causalidad de la implicación de los disruptores endocrinos en patología reproductiva humana es relevante y plausible. Se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES) o en las alteraciones observadas en trabajadores profesionalmente expuestos a algunos plaguicidas (Palmer et al. 2009). A este respecto se propone que la exposición humana a contaminantes medioambientales-disruptores endocrinos 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). Sin embargo 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 patogénica de uno o pocos contaminantes medioambientales, o de exposiciones químicas importantes ligadas a actividades profesionales concretas, dado que una de las grandes dificultades en este tipo de trabajos es la caracterización adecuada de la exposición (Olea y Fernandez, 2007).

De entre todos los contaminantes ambientales, los compuestos orgánicos persistentes, como algunos plaguicidas, son del mayor interés debido a los largos periodos de retención en el organismo y a sus propiedades como disruptores endocrinos. El listado es muy numeroso e incluye productos tales como  $\beta$ -HCH, carbaril, clordano, dicofol, dieldrín, DDT y sus metabolitos, endosulfán, lindano ( $\gamma$ -

HCH), malation, metomilo, metoxicloro, mirex, oxiclordano, paration, algunos piretroides sintéticos, toxafeno, y transnanoclor. Estos compuestos se bioacumulan preferentemente en el tejido adiposo, y algunos de ellos, como por ejemplo DDT y metabolitos,  $\gamma$ -HCH, PCBs y PCDDs, también lo hacen en los fluidos del tracto reproductivo masculino (Dallinga et al. 2002). De hecho, en el estudio de Rozati y colaboradores (Rozati et al. 2002) 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.

Es interesante pensar que las variaciones geográficas en calidad seminal descritas en los diferentes estudios revisados, pudieran asociarse con el efecto de los contaminantes ambientales sobre los niveles de diferentes hormonas sexuales. 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 y, así, acompañar esta medida al estudio convencional de los parámetros seminales en los estudios epidemiológicos de fertilidad (Andersson et al. 2004; Mabeck et al. 2005). Sin embargo esta opinión no es compartida por todos. Por ejemplo, Dhooge y colaboradores 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).

Varios trabajos 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. Así, 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 compuestos

orgánicos persistentes en la comida local, que en algunos casos está 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 de los resultados 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 estudiadas. Tanto en Groenlandia como en Ucrania la exposición se asoció con altos niveles de LH, pero si se consideraban todos los individuos, los niveles de *p,p'*-DDE se relacionaban positivamente con la hormona FSH, lo que se explicaría debido a las propiedades antiandrogénicas descritas para este contaminante. Giwercman y colaboradores analizaron también inhibina B, hormona indicadora de la funcionalidad de las células de Sertoli y del 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 PCB-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).

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 disruptores endocrinos 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 Letonia, 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 biodisponible, medida como la relación testosterona/SHBG, y la

exposición a compuestos organoclorados, cuantificada como la concentración de PCB-153 en suero (Richthoff et al. 2003). También se encontró una correlación inversamente proporcional entre movilidad espermática y concentración de PCB-153 (Richthoff et al. 2003).

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 (Hagmar et al. 2001).

Endosulfán que es un xenoestrógeno capaz de aumentar los niveles de prolactina y competir por el receptor nuclear estrogénico, puede retrasar la madurez sexual e interferir con la síntesis hormonal. De hecho esta observación no es nueva ya que en el estudio de Saiyed y colaboradores, sobre agricultores que manejan habitualmente plaguicidas, se ha visto que tras periodos de uso continuado de al menos 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 (Saiyed et al. 2003).

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).

Al igual que ocurre para el efecto de la exposición a disruptores endocrinos y hormonas sexuales, la acción de los disruptores endocrinos puede evidenciarse también sobre en los parámetros seminales: recuento, morfología o movilidad espermática. Así por ejemplo, un estudio realizado entre jóvenes reclutas militares suecos estableció una relación inversa entre niveles de bifenilos policlorados (PCBs) y movilidad espermática (Bonde et al. 1998). La relación entre exposición medioambiental a plaguicidas y calidad seminal también ha sido estudiada por el



grupo de trabajo liderado por Hauser y colaboradores entre población fértil e infértil (Hauser et al. 2003). 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. 2003). DDT también se ha asociado con una disminución de la fertilidad y cambios en el recuento espermático además de con retrasos en el inicio de la pubertad (Giwercman et al. 2006). Aunque en la mayoría de los países industrializados el uso de DDT está prohibido, su uso aun continúa en algunos países para permitir el control de la malaria. En estas regiones altas concentraciones de este pesticida son habitualmente cuantificadas en población ocupacionalmente expuesta (77900 ng/g en suero de aplicadores de DDT). En población general de estos países, y 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). Además, Ayotte y colaboradores encontraron una asociación negativa y estadísticamente significativa entre los niveles de DDE cuantificados y la concentración espermática, así como con el volumen seminal y los niveles de testosterona en sangre (Ayotte et al. 2001).

Algunos estudios epidemiológicos han investigado, también, la asociación entre actividad laboral y calidad seminal, analizando el papel de la exposición química en los lugares de trabajo sobre la función reproductiva masculina. De esta manera es conocido que el nematocida dibromocloropropano (DBCP) afecta de forma severa el proceso de la espermatogénesis aunque el mecanismo de acción no se ha aclarado todavía. 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 (Abell et al. 2000). De igual manera ocurre con los compuestos polifluorados que han sustituido en gran medida a los organoclorados y que forman parte de una gran cantidad de objetos de uso cotidiano. Un estudio reciente señala que altas exposiciones a estos compuestos se asocia a un menor porcentaje de espermatozoides normales entre población joven (Joensen et al. 2009).

Los estudios que relacionan la exposición a ftalatos con la calidad seminal no son tan concluyentes (Murature et al. 1987, Hauser 2006; Swan 2008, Sharpe 2008),

sin embargo la universalidad del fenómeno de exposición a estos aditivos del plástico es realmente preocupante.

Nuestro grupo de investigación se planteó, 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 afectaban a su salud reproductiva a través de la medida de los parámetros seminales y del estudio de la función testicular. Para ello, se determinó tanto la frecuencia de presentación del residuo como la concentración de cada uno de los 18 pesticidas persistentes seleccionados en el suero sanguíneo de los jóvenes participantes. Los resultados del estudio constataron que la exposición era importante ya que se alcanzó un valor medio de 11 residuos detectables por individuo. El compuesto organoclorado más frecuente fue 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. Hay que recordar que en el catálogo de compuestos investigados tan sólo el grupo del endosulfán, metoxicloro, vinclozolina y lindano tienen un uso reciente bien reconocido en España. El resto de los compuestos o bien están prohibidos o su empleo está muy restringido o limitado a aplicaciones muy concretas. Sin embargo, la presencia de compuestos de uso histórico en el suero de los jóvenes, demuestra, una vez más, que estos acceden al organismo del individuo expuesto, donde se acumulan y se transmiten a la descendencia, durante el embarazo y lactancia (Lopez-Espinosa et al, 2007; Carreño et al. 2007; Avivar et al. 2010). En nuestra población, 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. 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 ( $p=0,01$ ) (Avivar et al. 2010). En resumen, la exposición a pesticidas organoclorados con actividad disruptora endocrina se asocia con una peor calidad seminal y posiblemente tenga consecuencias negativas sobre la fecundidad de la población expuesta.

En los últimos años, la relación entre contaminantes medioambientales y calidad seminal ha ido más allá de la afectación de los parámetros habitualmente medidos en un eyaculado. Distintos estudios han relacionado a los disruptores endocrinos con un incremento de la fragmentación del DNA espermático (Spano et al. 2005; Bonde et al. 2008; Hauser, 2008), y aunque sus resultados no son concluyentes, abren un nuevo campo de insospechada potencia a la hora de poder explicar la relación de estas sustancias con la infertilidad de causa masculina. Así, Spanò y colaboradores estudiaron la relación entre el porcentaje de fragmentación de DNA y los niveles de contaminantes organoclorados en un grupo de 707 varones procedentes de cohortes incluidas en el proyecto europeo INUENDO (Spano et al. 2005). La hipótesis de los investigadores era encontrar una fuerte relación directa en la población Inuits de Groenlandia, que suponía el 60% del grupo de estudio y teóricamente la de mayor riesgo; sin embargo la correlación se estableció entre los varones europeos, pero no entre los Inuits. A las mismas conclusiones llegaron Bonde y colaboradores en el metaanálisis que incluía un total de 2269 parejas (Bonde et al. 2008). Por su parte, Hauser y colaboradores (Hauser, 2008; Meeker et al. 2010) relacionaron la presencia de metabolitos urinarios de ftalatos con un incremento del daño DNA espermático en un grupo de varones estériles. Todos los autores concluyen que la evaluación de las implicaciones de alteraciones del DNA espermático no siempre es fácil y añade mayor complejidad a la hora de determinar relaciones de tipo causa-efecto.

## **4. Guías para evaluar la calidad de artículos en el ámbito de la salud**

### **4.1 Justificación**

Una parte fundamental en la difusión de la investigación biomédica la constituye el proceso de publicación. En este proceso, los investigadores elaboran un manuscrito original en el que recogen las principales características y resultados del estudio realizado y lo presentan a una revista científica para que consideren su publicación. La revista somete el original a revisión por parte de expertos con el objetivo de identificar los puntos débiles del estudio tanto para mejorar su calidad como, si fuera preciso, recomendar que no se publique (Altman et al., 2005). La rigurosidad del contenido científico es un elemento crítico, ya que de ella depende que los resultados sean una aportación que contribuya al avance del conocimiento

(Ribera et al., 2005). Pero la revisión por expertos no es infalible y no garantiza que los estudios finalmente publicados estén libres de errores (Goodlee et al., 2003).

Por otra parte, la comunicación clara y transparente de una investigación es un elemento fundamental para facilitar su interpretación al permitir conocer qué se ha hecho y evaluar la fiabilidad y la relevancia de los resultados. Este principio genérico se aplica a todos los tipos de investigación. Si en un artículo se describe con detalle la metodología de cada fase, el lector tendrá información para decidir por sí mismo el valor que tienen los resultados. La idea de desarrollar un conjunto de directrices sobre la publicación de la metodología se fundamenta en este sencillo concepto. En aquellos casos en los que se omiten aspectos clave de la metodología del estudio, las valoraciones del lector tienen mayor incertidumbre.

Los lectores de las publicaciones de investigación (profesionales médicos, otros investigadores, políticos sanitarios y pacientes) no deberían tener que hacer suposiciones sobre la metodología: los investigadores deben proporcionar toda la información clave. El fundamento básico de la investigación queda debilitado de manera importante cuando su metodología es débil o su publicación es incompleta o deficiente. La realización de un estudio es a menudo un proyecto de elevado coste económico y posiblemente la inversión no esté justificada si la investigación no se traduce en un producto transparente que describa correctamente la investigación realizada.

A pesar de ello, se han detectado deficiencias en cómo se publica la investigación en todas las especialidades médicas y en todos los tipos de diseño (Altman et al., 2001; Bossuyt et al., 2003; Des Jarlais et al., 2004; Pocock et al., 2004). Es aparente que, sin unas directrices al respecto, muchos autores no saben qué detalles deben incluir en la publicación de su estudio.

## **4.2 Historia**

En los años 50 se publicó la que probablemente sería la primera iniciativa para estandarizar la calidad, estructura y el contenido de una publicación científica (Daniels, 1950) y dos décadas más tarde, en septiembre de 1973 the Journal of the American Dental Association publicó "Guidelines for reporting clinical trials". En 1978 el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (ICJME) se reunió informalmente en Vancouver para establecer las directrices que en cuanto a formato

debían contemplar los manuscritos enviados a sus revistas. El grupo llegó a ser conocido como Grupo Vancouver. El 5 de febrero 1979, en la segunda reunión con motivo de la Conferencia Internacional del ICMJE celebrada en Montreal se aprobó la propuesta para la estandarización del contenido de manuscritos mediante algunas modificaciones en el documento original de Vancouver (ISCME, 1978). Sus requisitos para manuscritos, que incluían formatos para las referencias bibliográficas desarrollados por la National Library of Medicine (NLM) de EEUU, se publicaron por primera vez en 1979 (International Steering Committee of Medical Editors, 1979), y muchas revistas comenzaron a introducir el sistema a finales de ese año. El Grupo Vancouver creció y se convirtió en el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas, que en la actualidad se reúne anualmente.

Las primeras directrices no distinguían entre los requisitos necesarios para el estudio y los correspondientes a su publicación. Por ejemplo, las detalladas directrices sobre metodología estadística (publicadas inicialmente en 1983) recogían numerosas recomendaciones sobre las formas correctas e incorrectas de analizar los datos. En cambio, las directrices del International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>), publicadas originalmente en 1979, prestaban mayor atención a aspectos como el formato de presentación, la autoría de los estudios y otras cuestiones similares.

Hasta la década de los años noventa fueron escasos los intentos de redactar directrices sobre el informe de los estudios de investigación (Squires et al., 1990a,b,c,d). De manera destacada, en dos documentos casi contemporáneos publicados entre 1994 y 1996 se presentaban directrices para la publicación de los ensayos clínicos aleatorizados (Andrew et al., 1994; TAWG, 1996). Ambos documentos se realizaron de manera independiente por grupos de investigadores y editores preocupados por la mejora de la publicación de los ensayos clínicos. La fusión de ambas iniciativas dio lugar a la Declaración CONSORT de 1996 (Begg et al., 1996), a la que tanto investigadores como editores prestaron una gran atención. Desde entonces, el apoyo y la difusión de las recomendaciones CONSORT han crecido de manera constante; la revisión de 2001 (Altman et al., 2001; Moher et al., 2001) y la publicación de una serie de artículos adicionales (MacPherson et al., 2001; Campbell et al., 2004; Ioannidis et al., 2004) dieron lugar a un conocimiento y seguimiento mayores de las recomendaciones CONSORT. Posteriormente,

comenzaron a aparecer recomendaciones de carácter similar sobre otros tipos de estudios.

Desde 1996 se han producido iniciativas de grupos similares que han dado lugar a la aparición de recomendaciones de publicación sobre estudios de precisión diagnóstica (STARD) (Bossuyt et al., 2003), estudios no aleatorizados de evaluación de intervenciones sobre hábitos y de salud pública (TREND) (Des Jarlais et al., 2004), revisiones sistemáticas (metaanálisis) de ensayos clínicos aleatorizados (QUOROM) (Moher et al., 1999) y de estudios de observación (MOOSE) (Stroup et al., 2000), así como sobre estudios de la capacidad pronóstica de los marcadores tumorales (REMARK) (McShane et al., 2005), entre otras. La guía STROBE (Von Elm et al., 2007) para la publicación de estudios observacionales fue desarrollada por un grupo de expertos con el objetivo de conseguir publicaciones claras y transparentes que faciliten la interpretación y eviten ofrecer resultados sesgados.

El servicio de Salud del Reino Unido (NHS NKS) fue la primera organización en fundar una iniciativa internacional para promover la transparencia y precisión de los trabajos de investigación biomédicos: la red EQUATOR acrónimo en inglés de “Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research”. De este modo en marzo de 2006 se constituyó esta red compuesta por expertos en metodología, comunicación y publicación, profesionales implicados en la calidad de todo el proceso de producción y difusión de los resultados de investigación. Entre otros muchos objetivos, está el de diseñar un conjunto de recomendaciones para la realización y publicación de los diferentes tipos de estudios, lo que da lugar a las diferentes listas de verificación o declaraciones.

La Red EQUATOR, se lanzó oficialmente en junio de 2008 y desde entonces colabora estrechamente con revistas, científicos que desarrollan directrices para evaluar estudios sanitarios, educadores y proveedores de fondos de investigación.

Los principales objetivos de EQUATOR son: a) proporcionar recursos e instrucciones para permitir la mejora de la presentación de informes de investigación sanitaria. A destacar, la guía REGECES, la cual ofrece recomendaciones para la elaboración de guías de evaluación de calidad de los estudios de salud; b) supervisar el progreso de las mejoras en la presentación de informes de investigación sanitaria.

La página web ECUATOR (<http://www.equator-network.org/>), lanzada en octubre de 2007, actualmente acoge a más de 200 guías. Los recursos disponibles se agrupan de acuerdo a la relevancia de los principales grupos de usuarios:

- a) Autores de artículos de investigación.
- b) Editores y revisores externos de publicaciones.
- c) Personas responsables de formular directrices para la presentación de informes.

Además la página web ECUATOR es un lugar para intercambiar experiencias y problemas con la implementación de las directrices de presentación de informes o para tratar todos los asuntos relativos a la presentación de informes de investigación.

### **4.3 Estado actual**

Actualmente, existen numerosas recomendaciones. Las directrices de consenso recogen información específica sobre la información que deben aportar los autores de sus estudios. Con el tiempo, el proceso de desarrollo de estas directrices se ha refinado de manera continua hasta un nivel que permite recomendarlas con la confianza de que mejoran eficientemente el proceso de publicación (Tabla 4).

**Tabla 4. Guías para evaluar la calidad de los estudios en el ámbito de la salud.**

GUÍA	DESCRIPCIÓN
AMA	Manual of Style. Guía para autores y editores.
ASSERT	A Standard for the Scientific and Ethical Review of Trials. Normas para la revisión y seguimiento de los ensayos clínicos aleatorios por comités éticos de investigación. El checklist incorpora ciertos elementos de CONSORT para asegurar el cumplimiento de los requisitos para la validez científica de la conducta ética de la investigación clínica. (18 ítems).
CDISC	Clinical Data Interchange Standards Consortium. Normas de apoyo a la adquisición, intercambio, comunicación y archivo de los datos y metadatos de investigación clínica. Desarrolla y apoya las normas mundiales de datos independientes de la plataforma que permite la interoperabilidad de sistemas de información para mejorar la investigación médica y áreas relacionadas de la salud.
COPE	Committee on Publication Ethics. Foro de editores de revistas para discutir cuestiones relacionadas con la integridad del registro científico. Apoya y alienta a los editores como informar, catalogar y abrir investigaciones en los problemas éticos en el proceso de publicación.
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials. Proporciona recomendaciones basadas en la evidencia para reportar ensayos clínicos controlados aleatoriamente. Ofrece estándares para que los autores que preparen informes de resultados de los ensayos presenten informes completos y transparentes, y ayuda a la valoración crítica y la interpretación de estos ensayos



Tabla 4. Continuación

GUÍA	DESCRIPCIÓN
CONSORT Plus	Extensión de los requisitos CONSORT que impone restricciones de integridad de datos que no son posibles en la información basada en texto.
COREQ	Consolidated criteria for reporting qualitative research. Proporciona un checklist para comunicar de forma explícita y exhaustiva los estudios cualitativos.
CSE	Council of Science Editors. Organización que promueve la excelencia en la comunicación de la información científica. Fomenta la creación de redes, la educación, el debate y el intercambio. Recurso de autoridad en temas actuales y emergentes en la comunicación de información científica.
EASE	European Association of Science Editors. Comunidad internacional orientada a personas que comparten un interés en la comunicación de la ciencia y la edición. Ofrece la oportunidad de estar al tanto de las tendencias en el entorno cambiante de la publicación científica, ya sea tradicional o electrónico.
EQUATOR	Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research. Organización que reúne a los desarrolladores de orientaciones, editores de revistas médicas y revisores, los organismos de financiación de investigación y otros colaboradores con el interés mutuo en la mejora de la calidad de las publicaciones de investigación y de la propia investigación.
FAME	Guía editorial: Foro de Editores Médicos Africanos .

Tabla 4. Continuación

GUÍA	DESCRIPCIÓN
GNOSIS	Guidelines for Neuro-Oncology: Standards for Investigational Studies. Directrices para estandarizar la comunicación de ensayos neuro-oncológicos quirúrgicos en Fase 1 y Fase 2. Las directrices se resumen en un formato de checklist que puede ser utilizado como un marco desde el cual construir un ensayo quirúrgico.
GPP2	Good Publication Practice. Recomendaciones que estimulen la publicación responsable y ética de los resultados de los ensayos clínicos patrocinados por las compañías farmacéuticas.
GLISC	Grey Literature International Steering Committee. Directrices para la elaboración de informes científicos y técnicos y la escritura / distribución de literatura gris.
IACS	Instrucciones a los autores de Ciencias de la Salud: Mulford Library de la Universidad de Toledo Títulos de revistas en orden alfabético. Contiene directrices editoriales de algunas revistas. Indica que revistas siguen CONSORT y / o otras directrices.
ICMJE	International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas del grupo Vancouver.
INANE	International Academy of Nursing Editors. Colaboración internacional, cuya misión principal es la de promover las mejores prácticas en el mundo editorial y un alto nivel en la literatura de enfermería.

Tabla 4. Continuación

GUÍA	DESCRIPCIÓN
Mayfield Handbook of Technical & Scientific Writing	Manual.
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment. Describe la información mínima sobre un experimento de microarrays que se necesita para permitir la interpretación de los resultados del experimento sin ambigüedad y, potencialmente, para reproducir el experimento.
MIBBI	Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations. Su objetivo es aumentar la visibilidad de los proyectos de desarrollo de directrices para la presentación de informes de los aspectos de las ciencias biológicas y biomédicas.
MOOSE	Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology. Propuesta para informar meta-análisis de estudios observacionales en epidemiología.
OSDW	Ophthalmology Study Design Worksheet. Checklist para estudios transversales presentados a la revista Ophthalmology.
ORION	Guidelines for Transparent Reporting of Outbreak Reports and Intervention studies Of Nosocomial infection. Puntos a incluir cuando se informa de un brote o de un estudio de intervención de un organismo nosocomial (22 ítems). Respaldado por una serie de grupos de interés especiales y sociedades profesionales como la Asociación de Microbiólogos Médicos (AMM), la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC) y la Asociación de Enfermeras de Control de Infecciones '(ICNA).

Tabla 4. Continuación.

GUÍA	DESCRIPCIÓN
Practihc	Pragmatic Randomized Control Trials in Healthcare. Financiado por la Unión Europea, proporciona herramientas de libre acceso, la capacitación y orientación a los investigadores de los países en desarrollo que estén interesados en el diseño y la realización de ensayos controlados aleatorios pragmáticos de las intervenciones sanitarias.
PRIMER Collaboration	PRESENTATION AND INTERPRETATION OF MEDICAL RESEARCH . Grupo que tiene como objetivo mejorar el diseño de los estudios, su presentación, interpretación de resultados y su traslado a la práctica.
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Conjunto mínimo de elementos, basados en la evidencia, para la presentación de informes en las revisiones sistemáticas y meta-análisis.
QAREL	Quality Appraisal of Reliability Studies. Herramienta para la evaluación de la fiabilidad de las pruebas de diagnóstico
QUADAS	Herramienta para la evaluación de la calidad de los estudios de diagnóstico
QUOROM	QUality Of Reporting Of Meta-analyses. Checklist que describe la mejor forma para presentar el resumen, introducción, métodos, resultados, y discusión de un meta-análisis.
RedHot	Datos de Información sobre Tratamientos Homeopáticos (Suplemento de CONSORT): Norma para los detalles de los informes sobre tratamientos homeopáticos. Checklist diseñado para ser utilizado por los autores y editores al publicar informes de los ensayos clínicos.

Tabla 4. Continuación

GUÍA	DESCRIPCIÓN
REFLECT	<p>The Statement:Reporting guidElines For randomized controlLed trials for livEstoCk and food safeTy .</p> <p>Conjunto mínimo de elementos basados en la evidencia para los ensayos que tratan sobre la producción, la salud y los resultados de seguridad alimentaria..</p>
REGECES	<p>Recomendaciones para la Elaboración de Guías de Evaluación de la Calidad de los Estudios de Salud.</p> <p>Recomendaciones para la elaboración de guías de evaluación de la calidad de los estudios de salud.</p>
REMARK	<p>REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies. Directrices para la presentación de estudios de marcadores tumorales.</p>
SMRS	<p>Standard Metabolic Reporting Structures. Resumen de las recomendaciones para la normalización y presentación de informes de análisis metabólicos.</p>
SQUIRE	<p>Standards for QUality Improvement Reporting Excellence.</p> <p>Estándares para la excelencia en las publicaciones sobre Mejora de la Calidad.</p>
STARD	<p>STAndards for the Reporting of Diagnostic accuracy.</p> <p>Tiene como objetivo mejorar la exactitud y la exhaustividad de los informes de los estudios de diagnóstico de la enfermedad, para que los lectores puedan evaluar la posibilidad de sesgo en el estudio (validez interna) y para evaluar su generalización.</p>

Tabla 4. Continuación

GUÍA	DESCRIPCIÓN
STREGA	STrengthening the REporting of Genetic Associations. Directrices basadas en la evidencia para promover la presentación de informes claros de los estudios de asociación genética y reducir las brechas en la evidencia con respecto a los posibles sesgos metodológicos en estos estudios.
STRICTA	STandards for Reporting Interventions in Controlled Trials of Acupuncture. Suplemento de CONSORT, que ha dado lugar a una mejor comunicación del diseño de los ensayos y la presentación en general. Los planes actuales son de revisar STRICTA en colaboración con el Grupo CONSORT, de tal manera que se convierta en una extensión "oficial" para CONSORT.
STROBE	STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology. La Declaración STROBE es mencionada en los Requisitos de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. <a href="http://www.strobe-statement.org/">http://www.strobe-statement.org/</a>
TREND	Non-randomized evaluation studies. Guía para comunicar con transparencia los resultados obtenidos en los estudios de intervención no aleatorizados.
Resúmenes Estructurados	National Library of Medicine (NLM) Descripción de resúmenes estructurados y cómo están formateados para MEDLINE.
Trial Bank Project	University of California, San Francisco. Explora nuevas vías de investigación

Tabla 4. Continuación

GUÍA	DESCRIPCIÓN
WAME	World Association of Medical Editors. Grupo que tiene como objetivo publicar artículos originales, revisados por expertos bien documentados en la investigación clínica y de laboratorio.

#### **4.4 Adherencia a las Guías para evaluar la calidad de artículos científicos en el ámbito de la salud.**

Un elevado porcentaje de los estudios de salud tiene niveles subóptimos de adherencia a las guías CONSORT, PRISMA, QUOROM y STROBE. Por lo tanto, es necesario actuar para mejorar la adherencia a estas normas (Samaan et al., 2013).

Los factores clave asociados con una mayor adhesión a las guías para evaluar la calidad de los artículos científicos en el ámbito de la salud se pueden agrupar en cuatro categorías:

##### i) Diseño del estudio

Los estudios con muestras de gran tamaño (Farrokhyar et al., 2007; Thabane et al., 2007; Rios et al., 2008); los estudios multicéntricos (Balasubramanian et al., 2006); los estudios que detallan el método de aleatorización o los efectos adversos (Plint et al., 2006); y por último los estudios de intervenciones farmacológicas (Thabane et al., 2007) se asociaron con una mayor calidad de la información.

##### ii) Momento de la publicación

Los estudios de más reciente publicación se asocian a una mayor calidad de la información (Bath et al., 1998; Moberg-Mogren et al., 2006; Farrokhyar et al., 2007; Al-Namankany et al., 2009; Chowers et al., 2009; Areia et al., 2010; Ladd BO et al., 2010; Herdan et al., 2011; Montgomery et al., 2011). Esto puede ser debido a tres factores (Bath et al., 1998): (1) los estudios son cada vez mayores e involucran a más autores, (2) los autores ganan experiencia y habilidades en escribir artículos y (3) los editores y revisores exigen cada año mayor calidad de los artículos.

##### iii) Patrocinador del estudio

Los estudios con un patrocinador industrial también se han asociado con una mejor calidad de la información (Rios et al., 2008; Chowers et al., 2009; de Vries et al., 2010).

##### iv) Revista

Las revistas con un factor de impacto alto (Ethgen et al., 2009; Ziogas et al., 2009; Montané et al., 2010) y las que respaldan la Declaración CONSORT y sus



extensiones (Zhong et al., 2011) tienden a publicar estudios con una mayor adherencia a las directrices de las guías. El único factor asociado con una disminución significativa de la adherencia y la calidad de los estudios es encontrar un resultado estadísticamente significativo (Bath et al., 1998).

v) Especificidad de la guía

Samaan et al. (2013) demostró que cuanto más específica es una guía, mayor es el grado de cumplimiento.

Actualmente no existe ninguna guía específica para trabajos sobre calidad seminal, y como hemos dejado patente, muchos de los resultados controvertidos en este campo son debidos a falta de estandarización de los estudios realizados.

## **OBJETIVOS**



En este estudio nos propusimos:

1) Desarrollar una guía para la elaboración y evaluación de estudios sobre calidad seminal.

2) Aplicar dicha guía a los estudios sobre calidad seminal y pesticidas persistentes.

3) Comparar nuestra guía con una guía de evaluación de la calidad de los estudios en el ámbito de la salud más general (STROBE).



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. Elaboración de una guía para la evaluación de estudios sobre calidad seminal (SEMQUA).**

Para la elaboración de SEMQUA seguimos las recomendaciones propuestas en "Guidance for developers of health research reporting guidelines" ( Moher et al., 2010) de la red EQUATOR. Esta estrategia supone la participación de un grupo de expertos y la realización de reuniones presenciales, como parte del desarrollo de la guía.

El primer paso fue una revisión sistemática de la bibliografía, utilizando la lista de verificación PRISMA ( [www.prisma-statement.org](http://www.prisma-statement.org) ; Moher et al., 2009 ). A su vez se identificaron diversos instrumentos utilizados para evaluar las diferentes propiedades de los estudios de salud (STARD, QUADAS, QAREL, COSMIN, STREGA, STROBE, SQUIRE, MOOSE, PRISMA, GNOSIS, TREND, ORION, COREQ, QUOROM, REMARK y CONSORT) pero ninguno de ellos resultó ser completamente adecuado para el campo del análisis de semen.

Teniendo en cuenta estos instrumentos se generó una lista en la que se incluyeron elementos esenciales para el éxito del desarrollo de un estudio de investigación sobre calidad seminal. Estos elementos se agruparon en cuatro bloques: participantes, métodos analíticos, métodos estadísticos y resultados dando lugar al primer borrador de SEMQUA.

Posteriormente, se invitó a un grupo de 18 expertos relacionados con el Grupo de Interés Especial de Andrología, dentro de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología, ESHRE, a participar en la evaluación y desarrollo de los contenidos de SEMQUA. Este grupo internacional multidisciplinario quedó compuesto por 12 autores de diferentes áreas de conocimiento, como la epidemiología, metodología científica, laboratorio de andrología y embriología, andrología clínica, clínica reproductiva, y por último en la edición de publicaciones científicas.

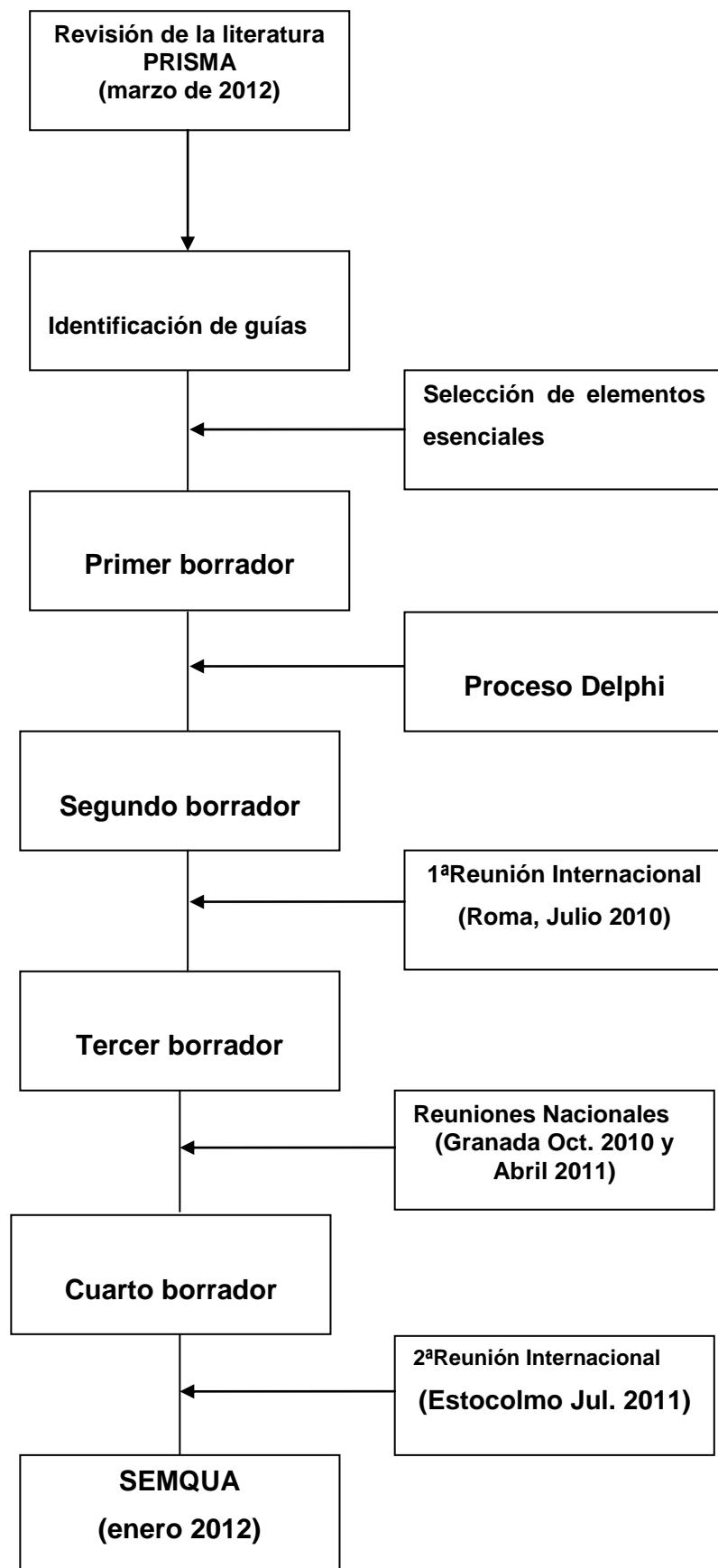
El proceso de elaboración de SEMQUA fue un proceso iterativo en el cual se celebraron varias reuniones de consenso, tanto nacionales como internacionales, en



las que se incluían, excluían o se conservaban distintos ítems de la lista de verificación, elaborándose así el cuarto borrador y la versión final de SEMQUA.

Para ayudar a desarrollar SEMQUA, utilizamos un proceso Delphi modificado de tres etapas. Los expertos fueron invitados por e-mail a valorar la importancia de los distintos puntos seleccionados de la investigación anterior. Durante tres rondas de encuesta, a los participantes se les preguntó sobre sus opiniones acerca de la importancia relativa de los posibles elementos de dicho protocolo. De esta forma se reduce la lista inicial de elementos a un número más manejable para el debate durante una reunión cara a cara. De este proceso se generó un segundo borrador, que recogía los ítems más importantes para su examen en la primera reunión de consenso celebrada con motivo del vigésimo sexto congreso anual de la ESHRE en Roma en julio de 2010, cuyo resultado fue el tercer borrador de SEMQUA. Posteriormente se realizaron dos reuniones de expertos nacionales en Granada (octubre 2010 y abril de 2011) de las cuales resultó el cuarto borrador que tras la segunda reunión internacional celebrada en Estocolmo en 2011 resultó la versión definitiva (Figura 4).

Figura 4. Proceso de elaboración de SEMQUA.



## 2. Aplicabilidad de SEMQUA y comparación con STROBE

Se aplicó SEMQUA a diversos estudios sobre la calidad seminal de varones expuestos a pesticidas persistentes. Los artículos incluidos en el estudio fueron seleccionados mediante la metodología propuesta para scoping review. Esta estrategia se recomienda en temas en los que existe una falta de uniformidad en la metodología (Arksey et al., 2005; Levac et al., 2010).

Se utilizó STROBE para establecer una comparación con una guía más general (Von Elm et al., 2007). Esta guía permite de una manera rápida evaluar cada uno de los aspectos que comprometen la calidad de un estudio observacional. Garantizando la presencia de elementos esenciales que ayudan a identificar trabajos de mayor y menor robustez desde el punto de vista metodológico. Esta guía está constituida por una lista de 22 puntos esenciales a tener en cuenta en la comunicación de los estudios realizados con los 3 diseños más importantes de la epidemiología analítica observacional: estudios de cohortes, estudios de casos y controles y estudios transversales. Estos puntos se refieren a diversos aspectos de los artículos, como el título y el resumen (punto 1), la introducción (puntos 2 y 3), la metodología (puntos 4-12), los resultados (puntos 13-17) y la discusión (puntos 18-21), así como a otros apartados relevantes (punto 22 relativo a la financiación). Los 3 diseños comentados tienen 18 puntos comunes, mientras que 4 puntos son específicos de cada diseño (puntos 6, 12, 14 y 15).

La Declaración STROBE fue desarrollada para ayudar a los autores a redactar sus estudios observacionales analíticos, para ayudar a los editores y los revisores que consideran la posible publicación de estos artículos, y para ayudar a los lectores que evalúan de forma crítica los artículos publicados. La lista de puntos se desarrolló a través de un proceso abierto, teniendo en cuenta la experiencia obtenida en iniciativas previas, en concreto en la Iniciativa CONSORT. Se revisaron la evidencia empírica y los estudios metodológicos relevantes, y se elaboraron versiones previas consecutivas que fueron sometidas a un intenso proceso iterativo de consulta. Por tanto, la lista que se recoge en este trabajo está basada en las aportaciones de un elevado número de personas con formación, experiencia y perspectivas profesionales muy diversas.

**2.1 Criterios de inclusión y exclusión de artículos:**

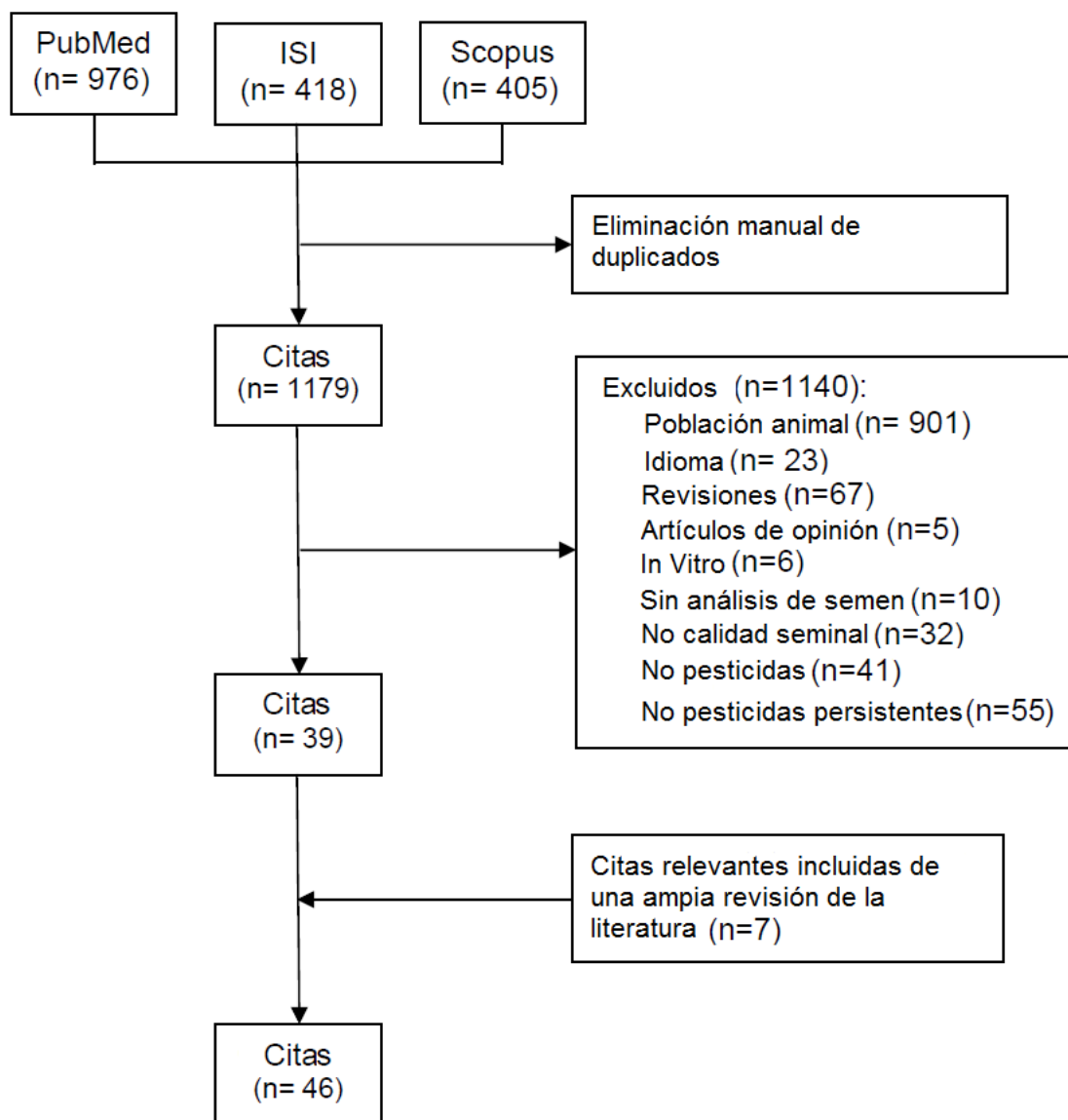
Los criterios de inclusión fueron: 1) lengua: Inglés, 2) artículos de investigación en población humana; 3) tipo de pesticida: solo pesticidas persistentes, 4) tipo de exposición: ocupacional y ambiental y 5) tipo de efecto sobre los parámetros seminales básicos. Se excluyen las revisiones sistemáticas y los artículos de opinión.

## 2.2 Búsqueda sistemática

EL 1 de septiembre de 2012 se realizó una búsqueda sistemática en diferentes bases de datos (PubMed, ISI, Scopus) combinando los términos “sperm” y “pesticide” de los últimos 40 años (enero de 1972 a septiembre de 2012). También se compararon los listados de referencias de los estudios incluidos y se revisaron los artículos relacionados para no excluir citas relevantes.

Tras consultar los títulos y analizar sus abstracts fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión 1140 trabajos, de los cuales 901 basaban sus estudios en una población animal, 23 no estaban escritos en inglés, 67 eran revisiones y 5 artículos de opinión. Un total de 183 posibles publicaciones relevantes fueron analizadas, de las cuales 55 fueron rechazadas por tratarse de una exposición a un pesticida no persistente, 41 trabajos no trataban sobre exposición a pesticidas, 32 estudios no analizaban parámetros básicos de calidad seminal, 10 no realizaban análisis de semen y 6 trabajos eran “*in vitro*”. Un total de 39 artículos fueron seleccionados. Con el fin de no excluir ningún artículo relevante y dado que la búsqueda sistemática produjo resultados limitados consultamos otras fuentes de información y realizamos una amplia revisión de la literatura de la cual seleccionamos 7 artículos más (Figura 5).

Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de selección



### 2.3 Explotación de datos

Los artículos fueron clasificados de acuerdo con: (i) año de publicación, (ii) tipo de exposición (ocupacional y ambiental), (iii) tipo de revista (clínica o investigación ambiental) según el ámbito de aplicación recogido en el Journal Citation Reports (andrología, reproducción, urología, genética, ciencias ambientales, salud ambiental y ocupacional, toxicología y salud pública), (iv) efecto observado (aumento, no variación, descenso) de la exposición a los pesticidas persistentes en los parámetros seminales (concentración, movilidad, morfología y volumen) (Tabla 5).

**Tabla 5. Variables analizadas en cada uno de los artículos**

<b>Variable</b>
Grado de cumplimiento global de SEMQUA
Grado de cumplimiento global de STROBE
Grado de cumplimiento ítems metodológicos de SEMQUA
Grado de cumplimiento ítems metodológicos de STROBE
Año de publicación del artículo
Tipo de exposición
Tipo de revista
Efecto del pesticida sobre la concentración espermática
Efecto del pesticida sobre la movilidad espermática
Efecto del pesticida sobre la morfología espermática
Efecto del pesticida sobre el volumen espermático

## 2.4 Evaluación de la calidad de los estudios

Todos los estudios incluidos fueron evaluados de manera independiente por dos investigadores aplicando la guía SEMQUA (Sánchez-Pozo et al., 2013) y la guía STROBE (Von Elm et al., 2007), valorando si “cumplían” o “no cumplían” cada uno de los ítem. Se realizaron reuniones periódicas de seguimiento en las que los investigadores ponían sus resultados en común y revisaban y discutían los casos en que la valoración no era coincidente. Las discrepancias entre evaluadores se resolvieron por consenso.

## 2.5 Análisis estadístico

Para analizar el grado de consenso entre los dos evaluadores que valoraron el grado de cumplimiento de las guías SEMQUA y STROBE se utilizó el índice Kappa, considerando según la clasificación de Landis y Koch un grado de acuerdo excelente para un índice Kappa mayor a 0.75, grado de acuerdo bueno para un índice Kappa 0.40-0.75 y un grado de acuerdo pobre para valores de Kappa menores a 0.40.

### 2.5.1 Análisis descriptivo

Las variables cualitativas se describen mediante valores absolutos y porcentajes (tipo de exposición, tipo de revista y efecto observado). Las variables cuantitativas se describen mediante la media y la desviación estándar (grado de adherencia a SEMQUA, grado de adherencia a STROBE, año de publicación del estudio). La normalidad de las variables cuantitativas se determinó por el test de Shapiro Wilk, resultando que la variable año de publicación no se ajustaba a una distribución normal.

### 2.5.2 Análisis univariante

Para la comparación del grado de cumplimiento entre SEMQUA y STROBE (global o de ítems exclusivamente metodológicos) se realizó el “test de Student” para muestras apareadas. El mismo test para muestras independientes se utilizó para la comparación entre el grado de cumplimiento de SEMQUA y STROBE según tipo de estudio, tipo de revista o el efecto observado. Para comparar el año de publicación de artículos de exposición ocupacional a pesticidas frente al año de publicación de los estudios de exposición ambiental se utilizó el test U de Mann-Whitney. Para analizar



la relación entre grado de cumplimiento de STROBE o SEMQUA y año de publicación se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

### ***2.5.3 Análisis multivariante***

Para identificar los factores que se asocian a la adherencia a SEMQUA se realizó un modelo de regresión lineal múltiple paso a paso tomando como variable dependiente el grado de adherencia a SEMQUA. Las variables candidatas fueron aquellas que en el análisis univariante tuvieron un valor de  $p < 0.20$ . La variable “año de publicación” no sigue una distribución normal por lo que se transformó en una variable Dummy estableciéndose dos categorías, publicaciones hasta el año 2001 y, publicaciones posteriores al año 2001.

## **RESULTADOS**



## **1. Resultados del proceso de elaboración de SEMQUA**

La lista de verificación final de SEMQUA se obtuvo de la siguiente manera:

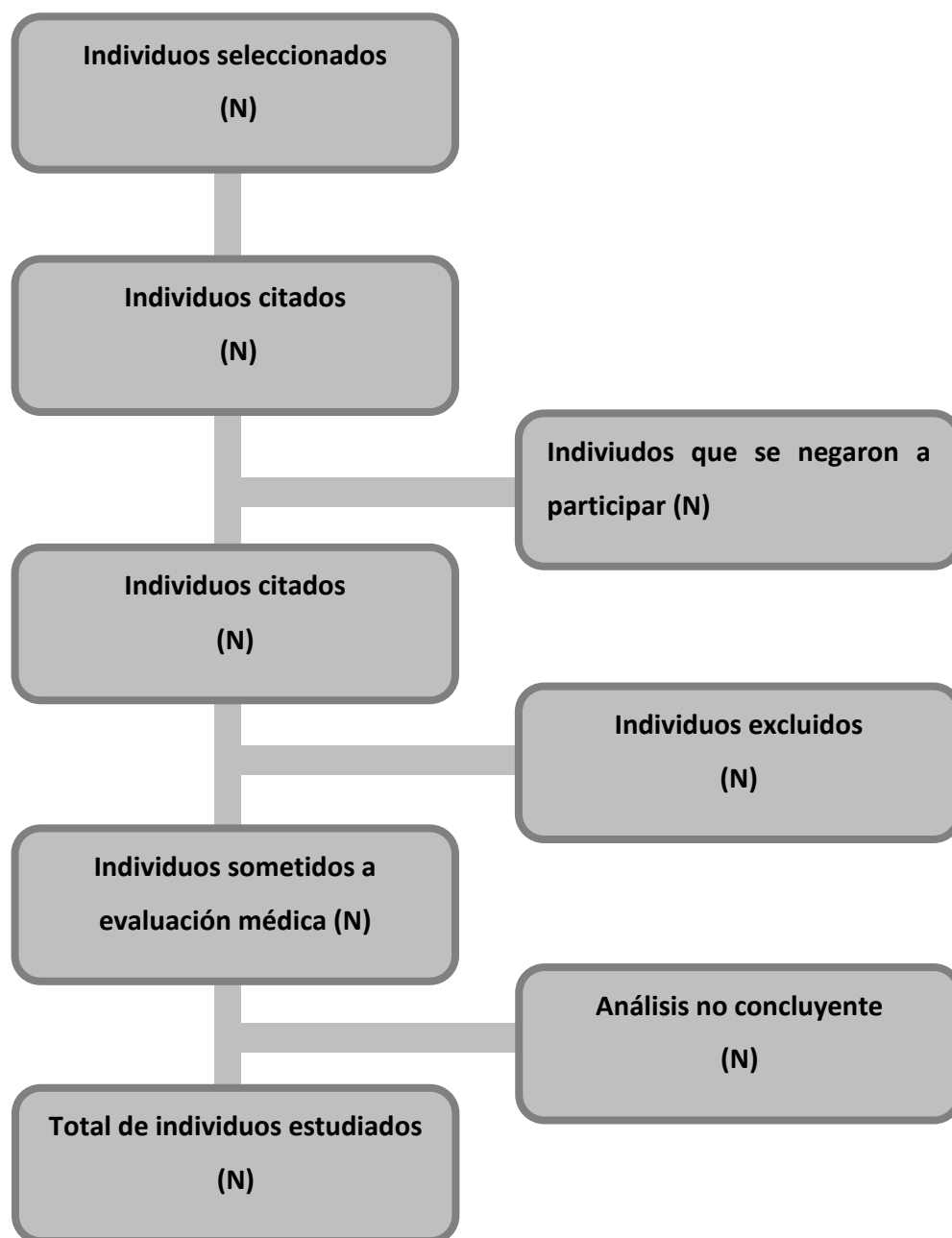
La lista generada a raíz de varias herramientas como STARD, QUADAS o COSMIN constó de 75 ítems (primer borrador), los cuales fueron agrupados en 4 bloques (participantes, métodos analíticos, métodos estadísticos y resultados). Una vez finalizadas las tres rondas de encuestas vía email, el número de elementos potenciales que deben estar presentes en un estudio sobre calidad seminal se redujo a 50 (segundo borrador). En el tercer borrador, resultado de la primera reunión de consenso, se incluyeron 35 ítems, los cuales estuvieron sujetos a la crítica constructiva y el debate incluyendo, excluyendo o manteniendo ítems en los siguientes dos borradores mediante rondas de encuestas y reuniones de consenso hasta obtener el documento definitivo que consta de 18 ítems que agrupan a 28 cuestiones (Tabla 6).

Tabla 6. SEMQUA

ITEM
<b>PARTICIPANTES</b>
1. ¿Se describen claramente los criterios de selección?
2.1 ¿Los individuos seleccionados para participar en el estudio son representativos de la población objetivo?
2.2 ¿Se tuvieron en cuenta los abandonos?
3. ¿Se tiene en cuenta el lugar de la inscripción para el estudio (por ejemplo, clínica de fertilidad, maternidad, lugar de trabajo, banco de esperma de un donante)?
4. ¿Ha sido considerada la heterogeneidad geográfica?
5.1 ¿Se han considerado variables explicativas y / o factores de confusión?
5.2 ¿Se ha llevado a cabo un estudio de antecedentes clínicos y examen físico adecuado por personal médico calificado?
6. ¿Se han considerado factores relacionados con la capacidad reproductiva?
7.1 ¿Han sido caracterizados factores de confusión preanalíticos?
7.2 ¿Es conocido el período de abstinencia sexual?
7.3 ¿Se ha tenido en cuenta el lugar donde se obtuvo la muestra de semen?
7.4 ¿Se han seguido las instrucciones pre-analíticas?
<b>MÉTODOS ANALÍTICOS</b>
8. ¿Es el número de muestras adecuado para el tipo de estudio?
9. ¿El laboratorio lleva a cabo pruebas internas de control de calidad?
9.2 ¿Forma parte el laboratorio de un programa de control de calidad externo basado en los métodos recomendados?
10. ¿Las personas que llevan a cabo las pruebas y su interpretación están cualificadas (acreditadas)?
11. ¿Están estandarizados los valores de referencia y los métodos utilizados?
11.2 ¿Se proporciona información acerca de cuándo y dónde se obtuvieron las mediciones?
11.3 ¿Se especifican suficientes especificaciones técnicas relativas a los materiales y métodos utilizados?
<b>MÉTODOS ESTADÍSTICOS</b>
12. ¿Se ha especificado el diseño del estudio?
13. ¿Se han utilizado las pruebas estadísticas adecuadas?
14. ¿Se ha ajustado por factores de confusión? ¿Se llevan a cabo test con los factores de confusión?
15. ¿Han sido identificados los valores outliers?
16. ¿Ha sido cuantificada la incertidumbre de medición?
<b>RESULTADOS</b>
17. ¿Están los resultados expresados en relación a los participantes, métodos de prueba y tratamiento estadístico de los datos obtenidos?
17.2 ¿Las conclusiones y los valores se generalizan más allá de los datos reales generados?
17.3 ¿Pueden los resultados ser generalizados?
18. ¿Se ha logrado alguna aplicabilidad de los hallazgos del estudio?

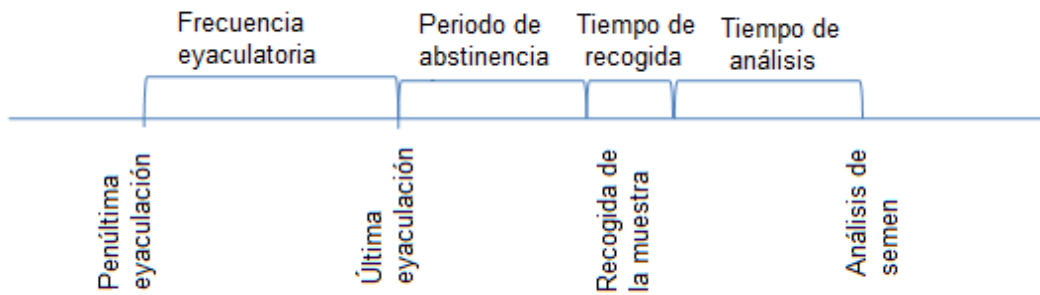
Además se diseñaron tres herramientas gráficas para ayudar a futuros usuarios de SEMQUA. En primer lugar se hizo un diagrama de flujo que permitiera identificar claramente las inclusiones y exclusiones de pacientes en el estudio (Figura 6).

**Figura 6. Prototipo de diagrama de flujo para la descripción de la muestra en sujetos en estudios de calidad seminal.**



Y en segundo lugar se realiza un gráfico para describir los diversos tiempos implicados en el análisis de semen (Figura 7).

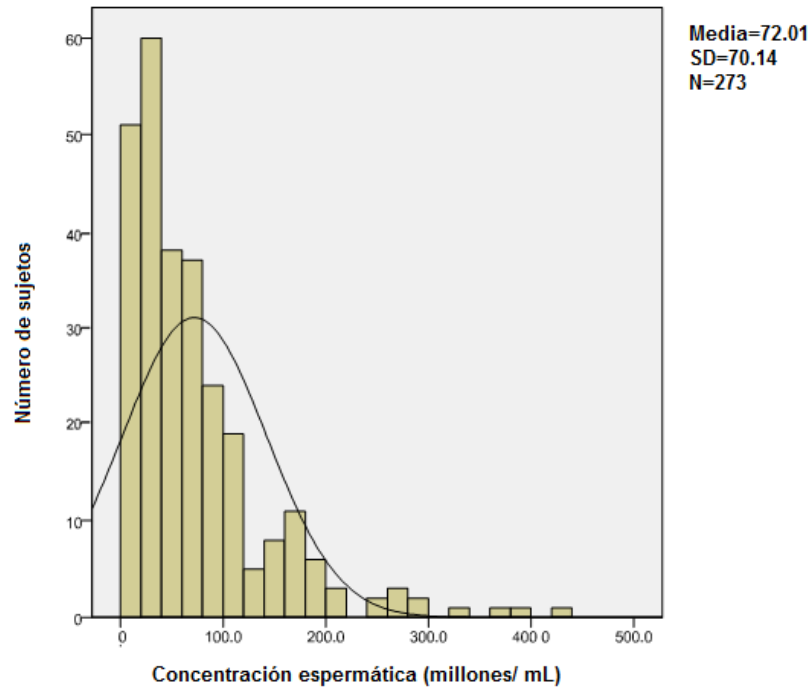
**Figura 7. Tiempos implicados en el análisis de semen**



Y en tercer lugar, el efecto de las transformaciones sobre la distribución estadística de la concentración espermática (Figura 8).

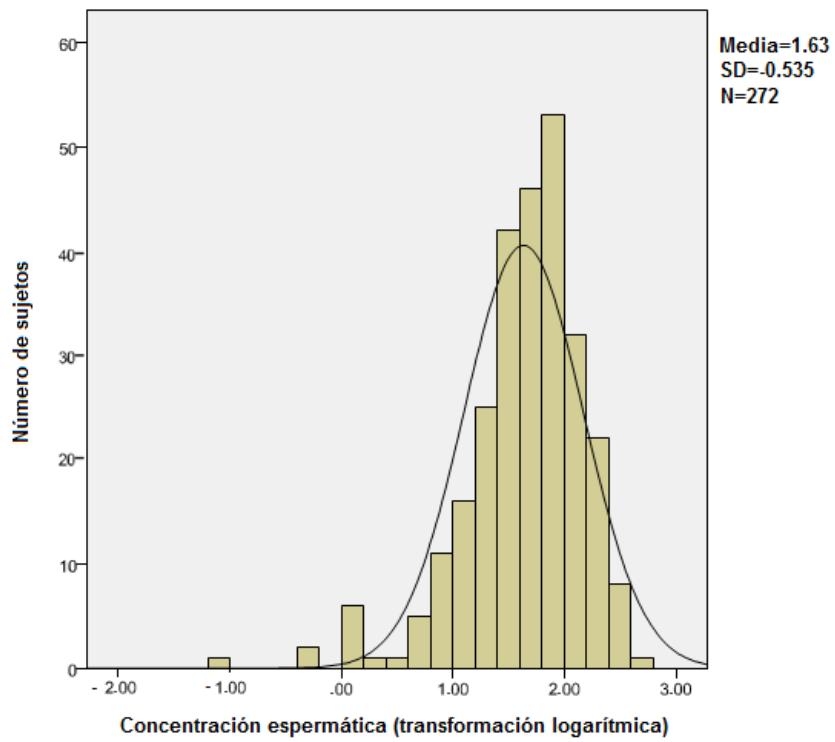
**Figura 8. Distribución de la concentración espermática (Millones / mL) en estudiantes universitarios de un estudio de calidad seminal (n = 273) en el sur de España. (a) datos en bruto, (b) transformación logarítmica, (c) raíz cuadrada, y (d) raíz cúbica (Fernández et al., 2012).**

a)

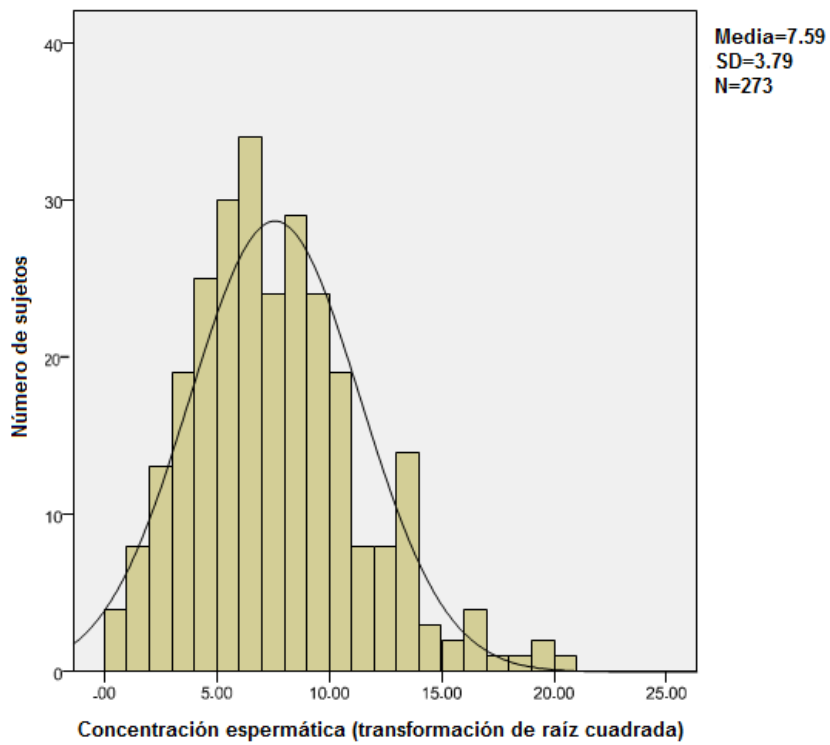




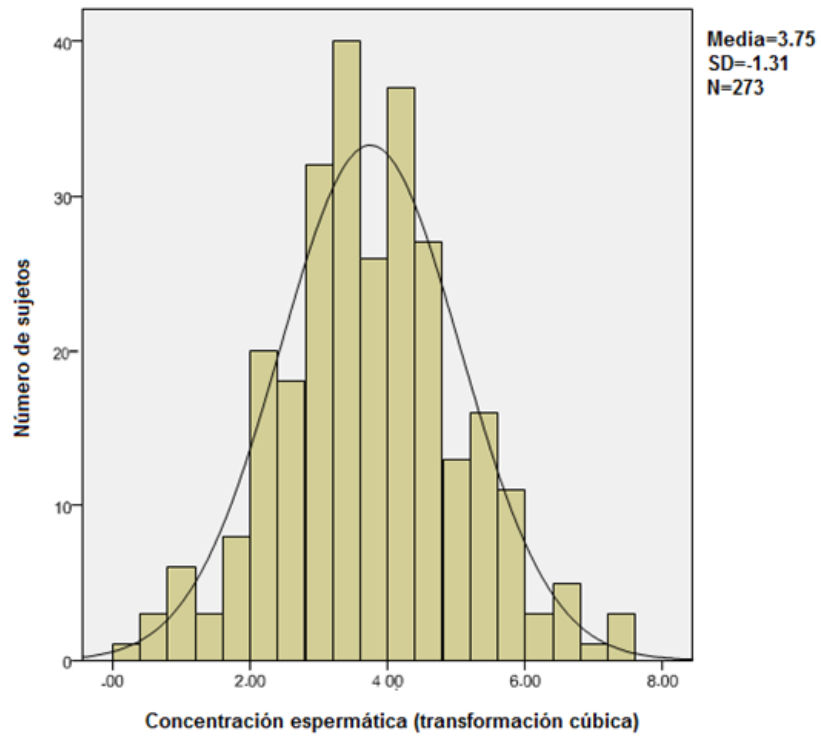
b)



c)



d)



## **2. Resultados tras aplicar SEMQUA**

### **2.1 Selección de artículos en la búsqueda bibliográfica**

En la Tabla 7 se presentan las variables analizadas en cada uno de los 46 artículos incluidos.

Tabla 7. Explotación de datos

Referencia	Tipo de exposición	Tipo de revista	Efecto sobre parámetros seminales				Grado de cumplimiento (%)	
			Concentración	Movilidad	Morfología	Volumen	SEMQUA	STROBE
Abell et al. (2000)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin cambios	Disminución	Sin cambios	54	53
Aneck-Hahn et al. (2007)	Ambiental	Clínica	Disminución	Disminución	Sin cambios	Disminución	68	53
Bonde et al. (2008)	Ambiental	Ambiental	Disminución	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	61	56
Bush et al. (1986)	Ambiental	Ambiental	Disminución	Disminución	Sin datos	Sin datos	46	50
Celik-Ozenci et al. (2012)	Ocupacional	Clínica	Sin cambios	Disminución	Sin datos	Disminución	54	28
Charlier et al. (2005)	Ambiental	Clínica	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin datos	50	53
Dallinga et al. (2002)	Ambiental	Clínica	Disminución	Disminución	Disminución	Sin cambios	32	38
Dalvie et al. (2004)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	54	28
De Flerurian et al. (2009)	Ocupacional	Clínica	Sin cambios	Sin datos	Sin datos	Sin datos	64	50
De Jager et al. (2006)	Ambiental	Clínica	Sin cambios	Disminución	Disminución	Sin cambios	64	47
De Jager et al. (2009)	Ambiental	Clínica	Disminución	Disminución	Disminución	Sin cambios	75	44
Duty et al. (2003)	Ambiental	Ambiental	Disminución	Disminución	Sin cambios	Sin datos	61	47
Eaton et al. (1986)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	Sin datos	29	41
Egnatz et al. (1980)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin cambios	Sin cambios	25	38
Emmett et al. (1988)	Ocupacional	Ambiental	Sin cambios	Sin datos	Sin datos	Sin datos	43	53
Giwerzman et al. (2007)	Ambiental	Clínica	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	75	56
Glass et al. (1979)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	43	44
Hauser et al. (2002)	Ambiental	Ambiental	Disminución	Disminución	Disminución	Sin datos	29	38
Hauser et al. (2003)	Ambiental	Ambiental	Sin cambios	Disminución	Disminución	Sin datos	57	56
Kamijima et al. (2004)	Ocupacional	Ambiental	Sin cambios	Disminución	Disminución	Sin cambios	54	44
Khan et al. (2010)	Ambiental	Ambiental	Disminución	Disminución	Sin datos	Sin cambios	46	41

Tabla 7. Continuación

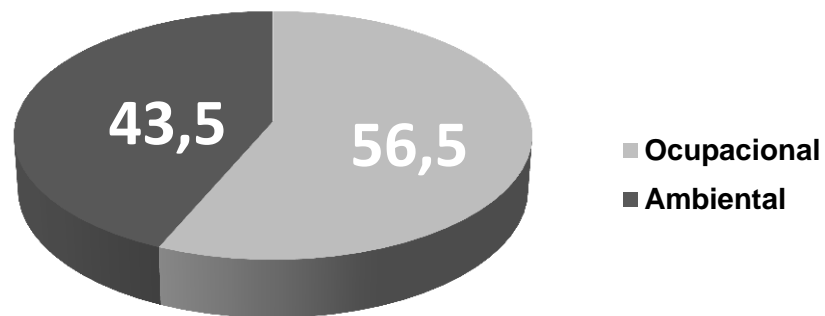
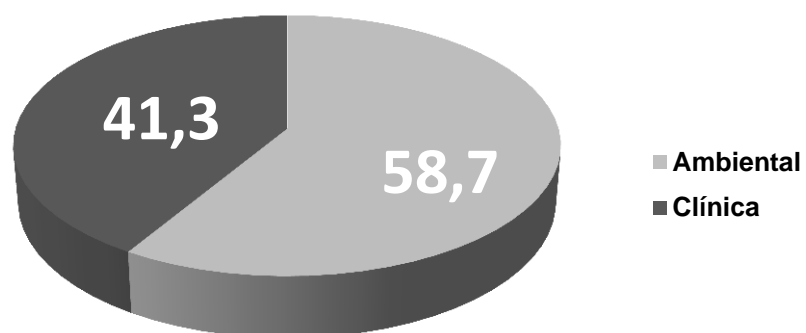
Referencia	Tipo de exposición	Tipo de revista	Efecto sobre parámetros seminales				Grado de cumplimiento (%)	
			Concentración	Movilidad	Morfología	Volumen	SEMQUA	STROBE
Lantz et al. (1981)	Ocupacional	Clínica	Disminución	Disminución	Sin datos	Sin cambios	32	38
Larsen et al. (1999)	Ocupacional	Ambiental	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	71	53
Lerda et al. (1991)	Ocupacional	Clínica	Disminución	Disminución	Disminución	Sin cambios	29	34
Lipshultz et al. (1980)	Ocupacional	Clínica	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	29	38
Messaros et al. (2009)	Ambiental	Ambiental	Disminución	Disminución	Disminución	Sin datos	43	47
Milby et al. (1980)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	43	41
Multigner et al. (2008)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	68	53
Oliva et al. (2001)	Ambiental	Clínica	Disminución	Disminución	Sin cambios	Disminución	75	59
Olsen et al. (1990)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	36	41
Pant et al. (2007)	Ambiental	Clínica	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	39	38
Potashnik et al. (1983)	Ocupacional	Clínica	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	11	25
Potashnik et al. (1987)	Ocupacional	Clínica	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	25	25
Potashnik et al. (1995)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	14	25
Rignell-Hydbom et al. (2004)	Ambiental	Ambiental	Sin cambios	Sin cambios	Sin datos	Sin cambios	61	50
Ritchthoff et al. (2003)	Ambiental	Clínica	Sin cambios	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	64	59
Rozati et al. (2002)	Ambiental	Clínica	Disminución	Disminución	Disminución	Disminución	46	47
Sandifer et al. (1979)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin cambios	Sin datos	36	32
Schenker et al. (1988)	Ocupacional	Ambiental	Sin cambios	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	75	63
Slutsky et al. (1999)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	18	22
Spano et al. (2005)	Ambiental	Clínica	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	68	59
Takahashi et al. (1981)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	54	41

Tabla 7. Continuación

Referencia	Tipo de exposición	Tipo de revista	Efecto sobre parámetros seminales				Grado de cumplimiento (%)	
			Concentración	Movilidad	Morfología	Volumen	SEMQUA	STROBE
Toft et al. (2006)	Ambiental	Ambiental	Sin cambios	Disminución	Sin cambios	Sin cambios	71	62
Whorton et al. (1977)	Ocupacional	Clínica	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	29	28
Whorton et al. (1979)	Ocupacional	Ambiental	Disminución	Sin datos	Sin datos	Sin datos	21	25
Whorton et al. (1980)	Ocupacional	Ambiental	Sin cambios	Sin datos	Sin datos	Sin datos	21	25

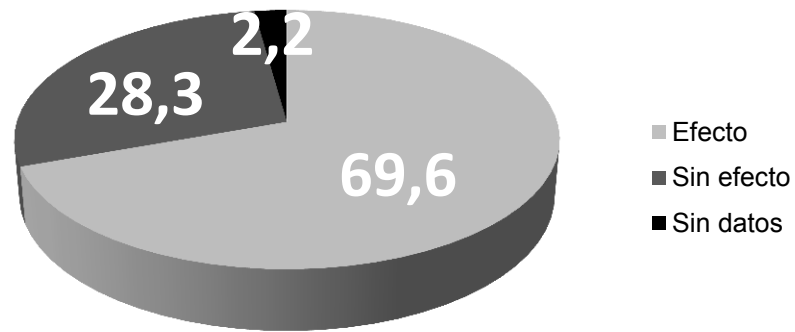
## 2.2 Explotación de datos y descripción de artículos

De los 46 artículos incluidos que evaluaban la relación entre exposición a pesticidas persistentes y calidad seminal, 56.5% (26) de ellos se clasificaron como exposición ocupacional y 43.5% (20) como exposición ambiental (Figura 8); 58,7% (27) se publicaron en una revista de investigación ambiental frente al 41,3 % (19) que se publicaron en una revista clínica (Figura 9); el 69,6% (32) de los estudios mostraba un efecto significativo de la exposición al pesticida en la concentración espermática frente a un 28.3% (13) que no lo mostraba, un 2,2 % (1) no recogía este dato (Figura 10).

**Figura 8. Porcentaje de estudios según tipo de exposición****Figura 9. Porcentaje de estudios según tipo de revista**



**Figura 10. Porcentaje de estudios según el efecto el pesticida en la concentración espermática**



### 2.3 Evaluación del grado de acuerdo

El grado de acuerdo entre los dos evaluadores se midió mediante el índice kappa alcanzándose un valor de 0.79 (IC 95%; 0.72 - 0.85) en el grado de acuerdo para STROBE y de 0.83 (IC 95%; 0.77 - 0.88) en SEMQUA.

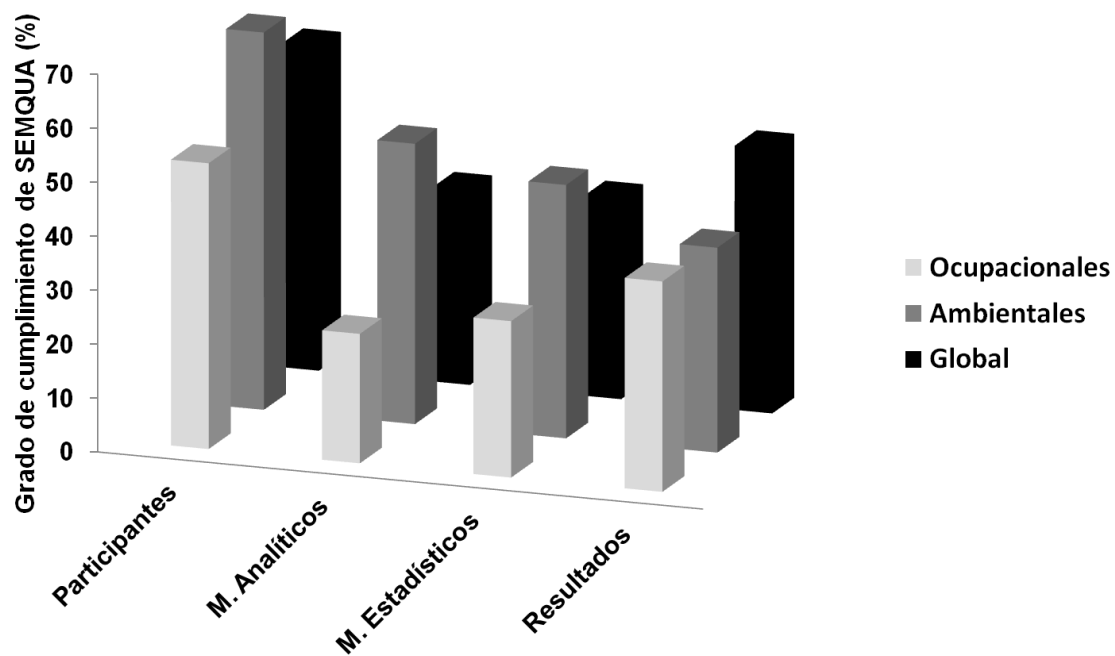
#### 2.3.1 SEMQUA

La media del grado de cumplimiento de los 28 estándares incluidos en el checklist SEMQUA fue de 47.0%  $\pm$  18.5% oscilando entre el 97.8% de cumplimiento del estándar 17.1 y el 0% del estándar 18. El apartado con mayor grado de cumplimiento correspondió al bloque "Participantes" (60.1%). Las mayores deficiencias se advirtieron en los apartados de "Análisis estadístico" y "Resultados". Tan sólo dos estudios identificaban entre sus métodos estadísticos los outliers (4.3%). Sólo 6 de 46 estudios (13.0%) especificaban la incertidumbre de medición. En el apartado de resultados, únicamente un estudio obtuvo una puntuación favorable con respecto a la posibilidad de extrapolar los resultados a población general (2.2%). Ningún estudio cumplía el ítem 18 relacionado con la aplicabilidad de los resultados obtenidos. También fue baja la frecuencia de la participación en controles de calidad tanto internos (26.1%) como externos (17.4%), la adecuación del tamaño muestral (10.9%) y si se tuvieron en cuenta los abandonos (21.7%) (Tabla 8, Figura 11).

Tabla 8. Grado de cumplimiento por ítem según SEMQUA.

SEMQUA CHECKLIST	GRADO DE CUMPLIMIENTO (%)		
	OCUPACIONAL (n=26)	AMBIENTAL (n=20)	TOTAL (n=46)
<b>ITEM</b>			
<b>PARTICIPANTES</b>	<b>53</b>	<b>70</b>	<b>60</b>
1. ¿Se describen claramente los criterios de selección?	46	65	54
2.1 ¿Los individuos seleccionados para participar en el estudio son representativos de la población objetivo?	38	45	41
2.2 ¿Se tuvieron en cuenta los abandonos?	15	30	22
3. ¿Se tiene en cuenta el lugar de la inscripción para el estudio (por ejemplo, clínica de fertilidad, maternidad, lugar de trabajo, banco de esperma de un donante)?	62	90	74
4. ¿Ha sido considerada la heterogeneidad geográfica?	46	90	64
5.1 ¿Se han considerado variables explicativas y / o factores de confusión?	54	90	70
5.2 ¿Se ha llevado a cabo un estudio de antecedentes clínicos y examen físico adecuado por personal médico calificado?	81	60	72
6. ¿Se han considerado factores relacionados con la capacidad reproductiva?	77	90	83
7.1 ¿Han sido caracterizados factores de confusión preanalíticos?	50	75	61
7.2 ¿Es conocido el período de abstinencia sexual?	77	85	80
7.3 ¿Se ha tenido en cuenta el lugar donde se obtuvo la muestra de semen?	46	60	52
7.4 ¿Se han seguido las instrucciones pre-analíticas?	42	55	48
<b>MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>24</b>	<b>52</b>	<b>36</b>
8. ¿Es el número de muestras adecuado para el tipo de estudio?	4	20	11
9. ¿El laboratorio lleva a cabo pruebas internas de control de calidad?	12	45	26
9.2 ¿Forma parte el laboratorio de un programa de control de calidad externo basado en los métodos recomendados?	4	35	17
10. ¿Las personas que llevan a cabo las pruebas y su interpretación están cualificadas (acreditadas)?	23	50	35
11. ¿Están estandarizados los valores de referencia y los métodos utilizados?	35	90	59
11.2 ¿Se proporciona información acerca de cuándo y dónde se obtuvieron las mediciones?	38	35	34
11.3 ¿Se especifican suficientes especificaciones técnicas relativas a los materiales y métodos utilizados?	54	90	70
<b>MÉTODOS ESTADÍSTICOS</b>	<b>29</b>	<b>47</b>	<b>37</b>
12. ¿Se ha especificado el diseño del estudio?	15	55	33
13. ¿Se han utilizado las pruebas estadísticas adecuadas?	85	95	90
14. ¿Se ha ajustado por factores de confusión? ¿Se llevan a cabo test con los factores de confusión?	35	60	46
15. ¿Han sido identificados los valores outliers?	4	5	4
16. ¿Ha sido cuantificada la incertidumbre de medición?	8	20	13
<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>	<b>38</b>	<b>39</b>
17. ¿Están los resultados expresados en relación a los participantes, métodos de prueba y tratamiento estadístico de los datos obtenidos?	96	100	98
17.2 ¿Las conclusiones y los valores se generalizan más allá de los datos reales generados?	62	45	54
17.3 ¿Pueden los resultados ser generalizados?	0	5	2
18. ¿Se ha logrado alguna aplicabilidad de los hallazgos del estudio?	0	0	0

Figura 11. Grado de cumplimiento de SEMQUA según grupo de ítems



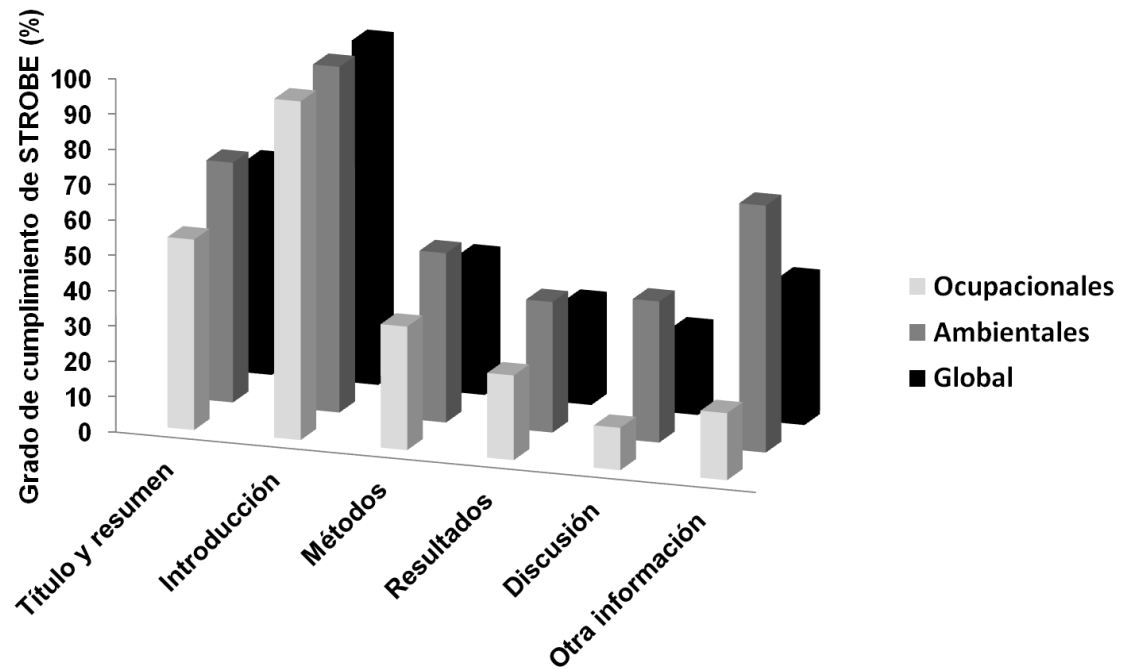
### 2.3.2 STROBE

Para STROBE la media del grado de cumplimiento de los 32 estándares incluidos en el checklist fue de  $43.1\% \pm 11.6\%$ , oscilando entre el 100% de cumplimiento de los estándares 1b y 3 y el 0% de los estándares 12c, 12d, 12e y 13c. El apartado con mayor grado de cumplimiento corresponde al bloque Introducción (96.7%). Las mayores deficiencias se advirtieron en los apartados de Métodos y Resultados donde el ítem 9 obtuvo un grado de cumplimiento del 8.7%, el ítem 10 del 13,0%, los ítem 13b y 16c obtuvieron un grado de cumplimiento del 4.3% cumpliéndose tan solo en dos estudios. Tan sólo el 19.6% de los estudios cumplía el ítem 13a y el ítem 14b se cumplió en el 13% de los casos. Con respecto a otros apartados, tan sólo el 19.6% de los estudios indicó el diseño del estudio con un término de uso común en el título o en el abstract (Tabla 9, Figura 12).

Tabla 9: Grado de cumplimiento por ítem según STROBE.

ÍTEM	STROBE CHECKLIST			GRADO DE CUMPLIMIENTO (%)		
		OCUPACIONAL	AMBIENTAL	TOTAL		
		(n=26)	(n=20)	(n=46)		
<b>TÍTULO Y RESUMEN</b>		<b>54</b>	<b>68</b>	<b>60</b>		
1.1 Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio con un término habitual		8	35	20		
1.2 Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado		100	100	100		
<b>INTRODUCCIÓN</b>		<b>96</b>	<b>98</b>	<b>97</b>		
2. Explique las razones y el fundamento científicos de la investigación que se comunica		92	95	93		
3. Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada		100	100	100		
<b>MÉTODOS</b>		<b>35</b>	<b>48</b>	<b>39</b>		
4. Presente al principio del documento los elementos clave del diseño del estudio		77	85	80		
5. Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluido los periodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos		38	35	40		
6. (a) Estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento. Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles. Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes.		35	65	48		
7. Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos		50	80	63		
8. Para cada variable de interés proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida). Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad		54	70	61		
9. Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales		4	15	9		
10. Explique cómo se determinó el tamaño muestral		12	15	13		
11. Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique qué grupos de definieron y por qué		85	95	89		
12.1 Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión		38	55	46		
12.2 Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones		58	80	67		
12.3 Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data)		0	0	0		
12.4 Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento. Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento. Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo.		0	0	0		
12.5 Describa los análisis de sensibilidad		0	0	0		
<b>RESULTADOS</b>		<b>24</b>	<b>37</b>	<b>29</b>		
13.1 Describa el número de participantes en cada fase del estudio: por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el		12	10	11		
13.2 Describa las razones de la pérdida de participantes en cada fase		4	5	4		
13.3 Considere el uso de un diagrama de flujo		0	0	0		
14.1 Describa las características de los participantes en el estudio (p.ej., demográficas, clínicas, sociales) y la información sobre las exposiciones y los posibles factores de confusión		38	90	61		
14.2 Indique el número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés		12	15	13		
15. Estudios de cohortes; describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medias resumen a lo largo del tiempo. Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporciones medias resumen de exposición.		92	95	93		
16.1 Proporciones estimaciones no ajustadas y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej. Intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y		54	95	72		
16.2 Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos		4	5	4		
16.3 Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un periodo de tiempo relevante		0	15	7		
17. Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad)		49	69	58		
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>12</b>	<b>40</b>	<b>24</b>		
18. Resuma los resultados principales de los objetivos del estudio		96	100	98		
19. Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo		27	70	46		
20. Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes		92	100	97		
21. Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa)		19	35	26		
<b>OTRA INFORMACIÓN</b>		<b>19</b>	<b>70</b>	<b>41</b>		
22. Especifique la financiación el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que basa el presente artículo		19	70	41		

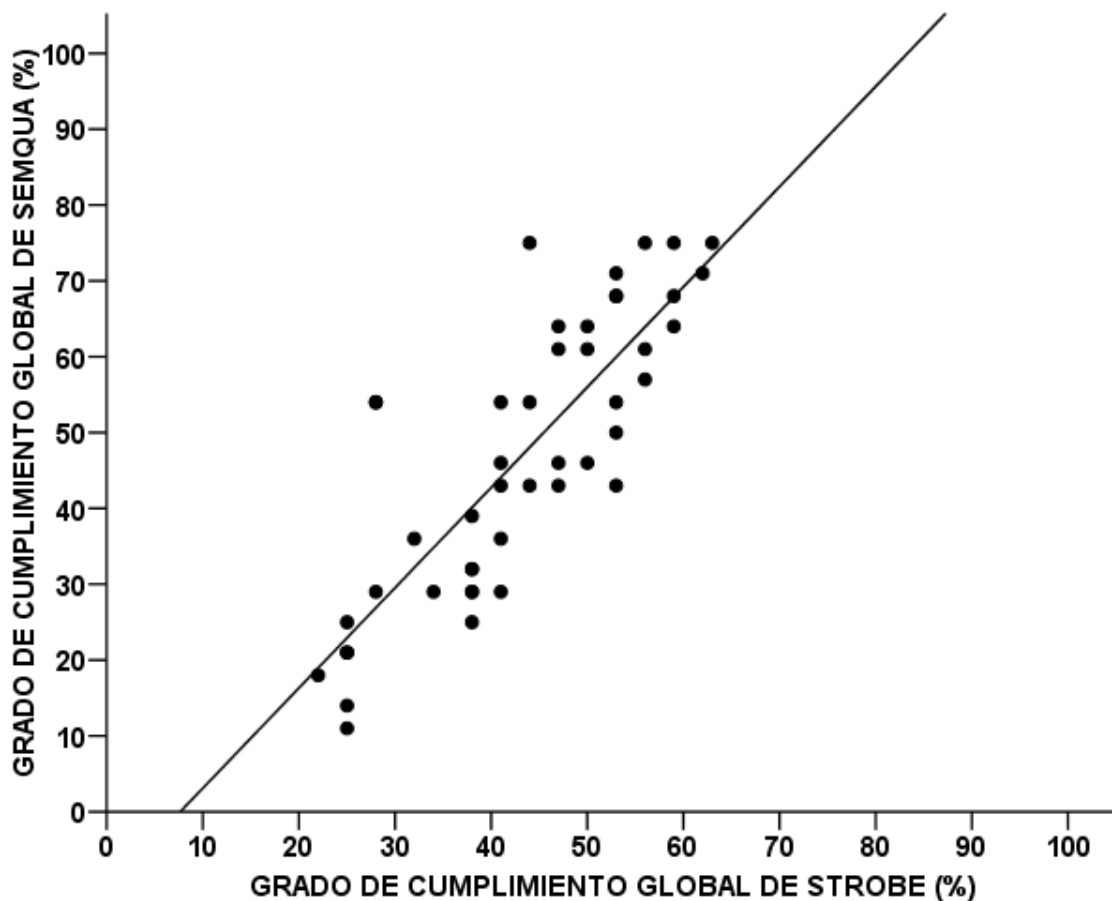
Figura 12: Grado de cumplimiento de STROBE según grupo de ítems



### 2.3.3 Comparación SEMQUA y STROBE

El grado de cumplimiento de SEMQUA y STROBE fue similar en los estudios analizados ( $47.0\% \pm 18.5\%$  vs  $43.1\% \pm 11.6\%$ ). Se observa una correlación lineal significativa entre el grado de cumplimiento global de SEMQUA y STROBE ( $r= 0.82$ ;  $p<0.001$ ) (Figura 13).

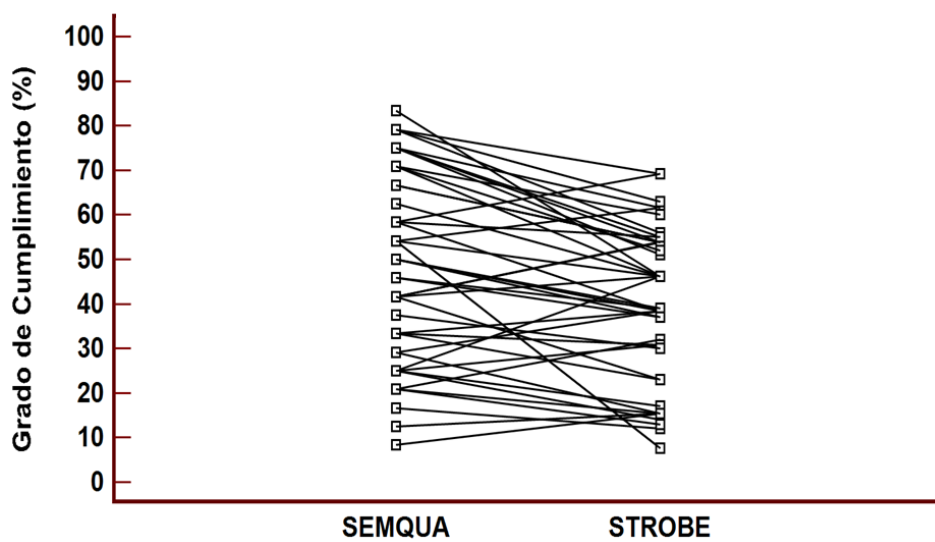
**Figura 13. Comparación del grado de cumplimiento de SEMQUA frente a STROBE.**





Sin embargo cuando se consideran sólo ítems de aspectos metodológicos, se obtuvo un mayor grado de cumplimiento utilizando SEMQUA que STROBE ( $48.4\% \pm 21.0\%$  vs.  $39.5\% \pm 17.4\%$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 14). En la Tabla 10 se presenta, ordenados por año el grado de cumplimiento de ítems de aspectos metodológicos de SEMQUA y STROBE de cada artículo analizado.

**Figura 14: Grado de cumplimiento de los ítems metodológicos de SEMQUA y STROBE.**



**Tabla 10. Grado de cumplimiento de ítems metodológicos de los artículos evaluados.**

<b>REFERENCIA</b>	<b>% SEMQUA</b>	<b>% STROBE</b>
Celik-Ozenci et al. (2012)	54	8
Khan et al. (2010)	50	38
De Jager et al. (2009)	67	54
Messaros et al. (2009)	83	46
De Flerurian et al. (2009)	46	38
Bonde et al. (2008)	75	54
Multigner et al. (2008)	58	69
Giwerzman et al. (2007)	79	54
Aneck-Hahn et al. (2007)	75	54
Pant et al. (2007)	42	23
Toft et al. (2006)	75	62
De Jager et al. (2006)	71	46
Spano et al. (2005)	71	62
Charlier et al. (2005)	50	38
Rignell-Hydbom et al. (2004)	54	8
Dalvie et al. (2004)	58	38
Kamijima et al. (2004)	67	54
Hauser et al. (2003)	58	54
Ritchthoff et al. (2003)	71	54
Duty et al. (2003)	63	46
Dallinga et al. (2002)	33	23
Rozati et al. (2002)	46	38
Hauser et al. (2002)	29	15
Oliva et al. (2001)	79	62
Abell et al. (2000)	54	62
Slutsky et al. (1999)	21	15
Larsen et al. (1999)	75	54
Potashnik et al. (1999)	13	15
Lerda et al. (1991)	29	38
Olsen et al. (1990)	33	31
Emmett et al. (1988)	42	54
Potashnik et al. (1988)	79	69
Potashnik et al. (1987)	25	15
Bush et al. (1986)	25	46
Eaton et al. (1986)	50	38
Potashnik et al. (1983)	8	15
Lantz et al. (1981)	33	38
Takahashi et al. (1981)	42	54
Egnatz et al. (1980)	54	46
Lipshultz et al. (1980)	21	31
Whorton et al. (1980)	25	31
Milby et al. (1980)	17	15
Glass et al. (1979)	42	46
Sandifer et al. (1979)	38	31
Whorton et al. (1979)	21	15
Whorton et al. (1977)	25	15

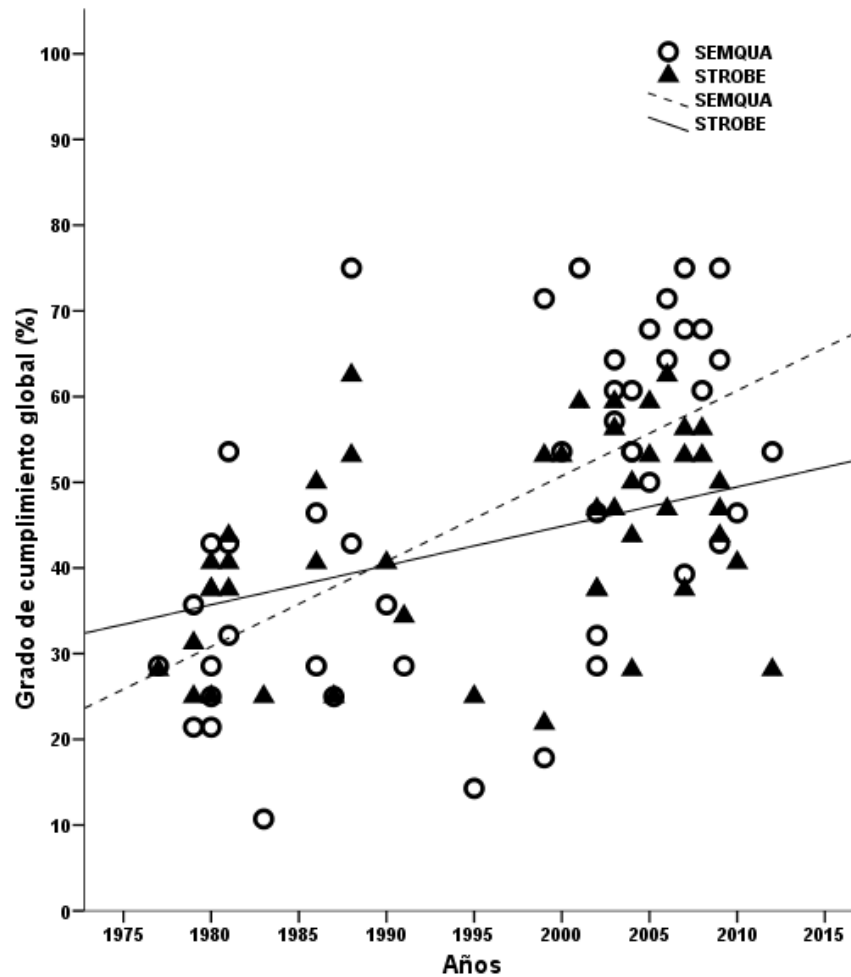
### **2.3.4 Grado de cumplimiento y características del artículo**

#### **2.3.4.1 Análisis Univariante**

Se observó un mayor grado de cumplimiento de SEMQUA frente STROBE de ítems metodológicos especialmente para estudios de exposición ambiental ( $57.8\% \pm 16.0\%$  vs.  $45.8\% \pm 14.2\%$ ;  $p < 0.001$ ) pero no para estudios de exposición ocupacional ( $39.6\% \pm 20.4\%$  vs  $34.6\% \pm 18.2\%$ ).

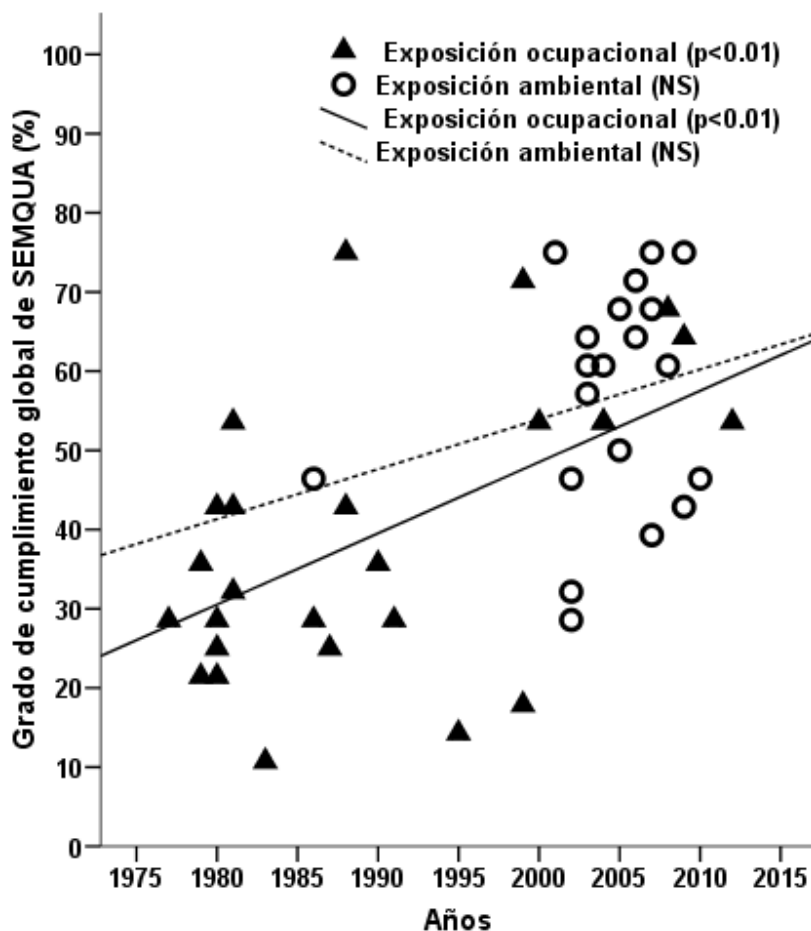
Tras establecer comparaciones mediante el test de Mann-Whitney, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los años de publicación de los artículos de exposición ambiental y los de exposición ocupacional. Hemos observado un aumento en el grado de cumplimiento general de SEMQUA ( $r = 0.61$  y  $p < 0.001$ ) y STROBE ( $r = 0.45$  y  $p < 0.01$ ) a lo largo de los años (Figura 15).

Figura 15: Grado de cumplimiento global de SEMQUA y STROBE con los años.



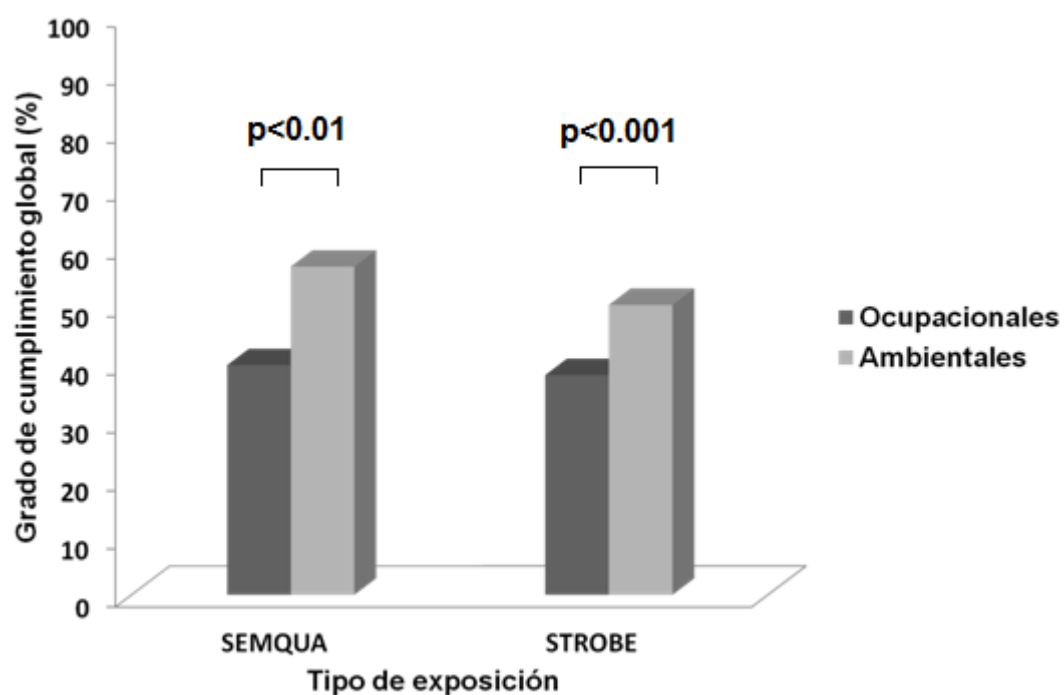
El aumento en el grado de cumplimiento global con el tiempo fue tan sólo estadísticamente significativo para estudios de exposición ocupacional ( $r = 0.54$  y  $p < 0.01$ ; Figura 16).

**Figura 16: Grado de cumplimiento global de SEMQUA en función del tipo de exposición a pesticidas persistentes.**



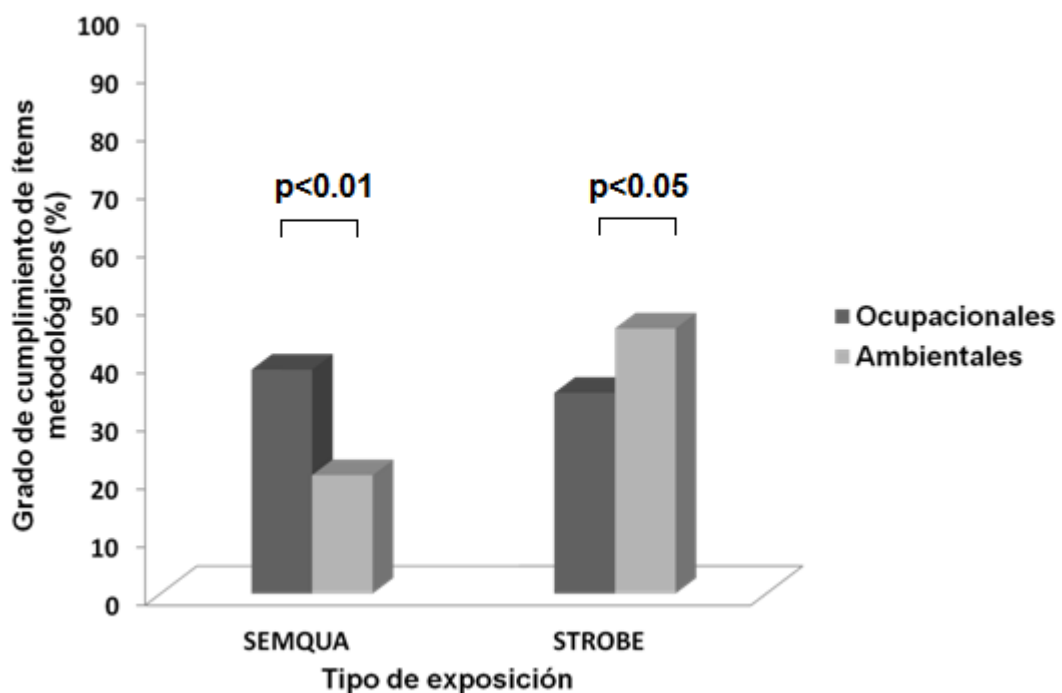
La calidad de los trabajos que estudian exposición ocupacional fue significativamente menor que el obtenido para estudios de exposición ambiental tanto usando SEMQUA ( $39.6\% \pm 18.2\%$  vs  $56.6\% \pm 14.3\%$ ;  $p < 0.01$ ) como STROBE ( $37.9\% \pm 11.3\%$  vs  $50.0\% \pm 7.0\%$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 17).

**Figura 17. Grado de cumplimiento global de SEMQUA y STROBE en función del tipo de exposición.**



También se observan diferencias significativas entre estudios ocupacionales y ambientales al comparar exclusivamente los ítem metodológicos, tanto en SEMQUA ( $39.6\% \pm 20.4\%$  vs  $59.8\% \pm 16.0\%$ ;  $p < 0.01$ ) como en STROBE ( $34.6\% \pm 18.2\%$  vs  $45.7\% \pm 14.2\%$ ;  $p < 0.05$ ). (Figura 18).

**Figura 18. Grado de cumplimiento de ítems metodológicos de SEMQUA y STROBE en función del tipo de exposición.**

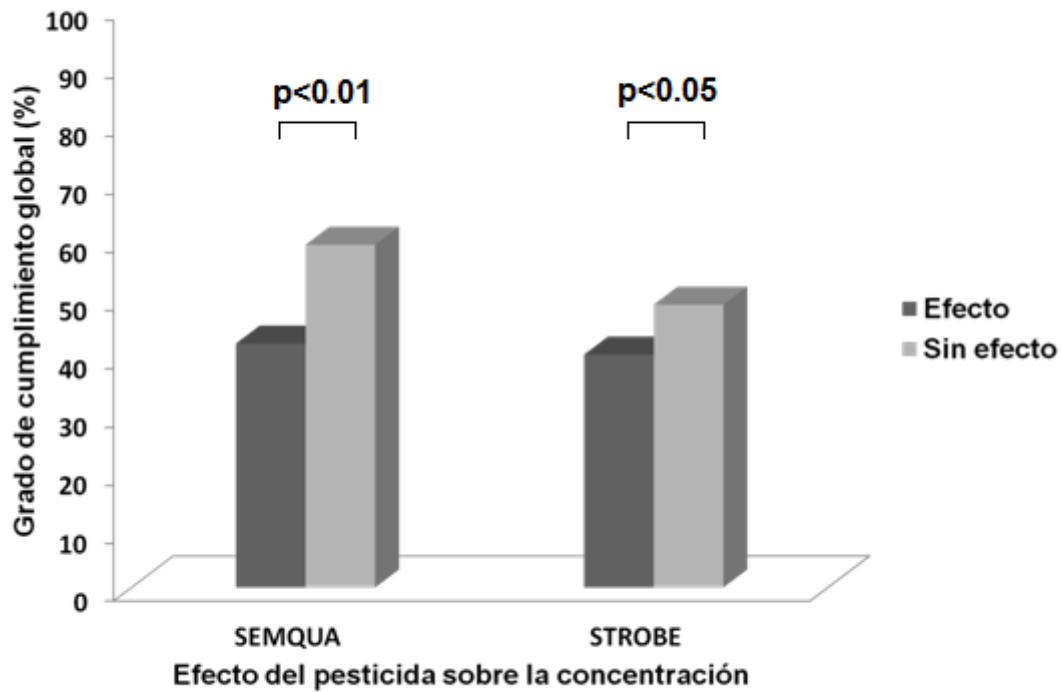


El 58.7% (27/46) de los estudios fueron publicados en revistas clínicas frente al 41.3% (19/46) que lo hicieron en revistas de investigación ambiental. No se observó ninguna diferencia significativa en el grado de cumplimiento global entre ambos tipos de revistas; así de acuerdo a SEMQUA se obtuvo ( $48.7\% \pm 20.1\%$  vs  $45.8\% \pm 17.6\%$ ) y para STROBE ( $42.6\% \pm 11.3\%$  vs  $43.6\% \pm 11.9\%$ ), para revistas clínicas y de investigación ambiental, respectivamente. No se observaron tampoco diferencias significativas al considerar únicamente los ítems metodológicos.

Los estudios que mostraban un efecto negativo de la exposición a pesticidas persistentes en la concentración espermática, presentaron un grado de cumplimiento menor que los que no observaron ninguna influencia, tanto aplicando SEMQUA ( $42.1\% \pm 18.3\%$  vs  $57.6\% \pm 14.2\%$ ;  $p < 0.01$ ) como STROBE ( $40.2\% \pm 10.3\%$  vs  $49.5\% \pm 11.6\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 19). No se observaron diferencias para otros parámetros seminales.



Figura 19. Grado de cumplimiento global de SEMQUA y STROBE según el efecto del pesticida en la concentración espermática.



### 2.3.4.2 Análisis Multivariante

Las variables candidatas a los modelos de regresión múltiple paso a paso como variable dependiente el grado de cumplimiento global según SEMQUA fueron tipo de estudio, año de publicación, y efecto observado sobre la concentración espermática. Estas dos últimas fueron las únicas variables incluidas en dicho modelo (Tabla 11).

**Tabla 11. Modelo de regresión lineal múltiple del grado de cumplimiento de SEMQUA.**

	BETA	IC (95%)	P
SEMQUA			
Año de publicación	16.3	6.8-25.7	<0.001
Efecto sobre concentración espermática	-10.1	-19.4-(-0.9)	<0.05



## **DISCUSIÓN**



Una idea del interés que despiertan los temas relacionados con la calidad seminal nos la da el hecho de que una simple búsqueda en Google utilizando los términos “human sperm quality” genera 1.590.000 resultados. El 50% de las parejas estériles utilizan este medio para buscar información sobre su enfermedad (Weissman et al., 2000; Huang et al., 2003). Pero a pesar de esta amplia información, gran parte de las parejas con deseos reproductivos no tiene clara la relación entre estilo de vida y calidad seminal (Callaway et al., 2009; Daniluk et al., 2012; Hammarberg et al., 2013).

De igual modo que sucede con el público general, en el mundo científico existe una gran controversia sobre qué factores del estilo de vida y en qué grado influyen en la calidad seminal (Li et al., 2011; Mortimer et al., 2013). Esta incertidumbre se traduce en una alta variabilidad entre profesionales en la interpretación de los resultados de un análisis de semen (Aguilar et al., 2008). Diversos autores han sugerido que esto es debido en parte a la falta de estandarización de los estudios sobre calidad seminal (Merzenich et al., 2010; Mortimer et al., 2013), a pesar de existir recomendaciones internacionales sobre aspectos técnicos del análisis de semen (Bjorndahl et al., 2010; WHO 2010).

En los últimos años, en el ámbito de la publicación científica se han desarrollado herramientas para mejorar esta falta de uniformidad, la cual no sólo afecta al área de la salud reproductiva (Johnson et al., 2007; Shikata et al., 2008; Süt et al., 2008). Estas herramientas permiten de una manera rápida evaluar cada uno de los ítems que comprometen la calidad de un estudio, garantizando la presencia de elementos esenciales que ayudan a identificar trabajos de mayor y menor robustez desde el punto de vista metodológico. Es de destacar el trabajo realizado en este sentido por la red EQUATOR (Simera et al., 2009), una iniciativa internacional cuyo objetivo es mejorar la validez y fiabilidad de la bibliografía de investigación médica por medio de la publicación de buenas prácticas, claras y precisas para la presentación de informes de estudios de investigación.

EQUATOR se desarrolló a partir del trabajo de CONSORT y otros grupos encargados de formular directrices. El proyecto comenzó en marzo de 2006. Financiado al principio por el servicio educativo National Knowledge Service del NHS. Actualmente la organización EQUATOR Network está dirigida por un grupo ejecutivo

internacional que reúne a destacados expertos en metodología de investigación sanitaria, estadística, presentación de informes y trabajo editorial.

Entre las guías publicadas por esta red destacan las recomendaciones para la elaboración de guías de evaluación de la calidad de los estudios de salud (REGECES) (Moher *et al.*, 2010).

Samaan *et al.* (2013) tras realizar una revisión sistemática en la que incluyeron 50 revisiones sistemáticas sobre la adherencia a las guías de evaluación de la calidad de los estudios de salud, concluyen que una estrategia para aumentar la calidad de la información sería desarrollar nuevas guías sobre áreas clínicas específicas, ya que la adherencia a las recomendaciones y guías es mayor cuanto más específica es esta.

Por todo lo anterior, nos propusimos constituir un grupo de expertos internacionales para, aplicando la guía REGECES (Moher *et al.*, 2010), elaborar una guía para abordar los aspectos más relevantes que deben incluirse en cualquier estudio sobre calidad seminal.

El desarrollo de nuevas directrices partiendo de cero no es sencillo. Es poco probable que este tipo de iniciativas tenga éxito si antes de la reunión presencial del grupo no ha tenido lugar una buena preparación del proyecto. El punto de inicio es una revisión de la bibliografía, no sólo de guías similares a la que se pretende desarrollar, sino también de publicaciones científicas de carácter experimental u observacional. Después, conviene elaborar una larga lista de puntos estructurados bajo epígrafes para, más adelante, ser depurada, por un grupo de expertos en las reuniones posteriores.

Por este motivo antes de la organización de nuestras reuniones presenciales se realizó una búsqueda bibliográfica electrónica, complementada por el contacto con expertos adicionales, algunos de los cuales fueron invitados a participar en la reunión presencial, en la que todos los participantes dispusieron con tiempo de esta información. Las reuniones para revisar SEMQUA consistieron en discusiones estructuradas dirigidas por distintos coordinadores. La idoneidad de la inclusión de un elemento en la lista fue comentada a la luz de la evidencia actual, analizando, en este orden, los puntos originales y aquellos susceptibles de ser añadidos. Para incorporar,

eliminar o mantener cada punto se utilizó un enfoque de consenso basado en el método Delphi modificado. Se consideró prioritario, siempre que fuera posible, mantener en la lista aquellos elementos basados en la evidencia. Aunque bien intencionadas, muchas de las primeras directrices de publicación se podían considerar del tipo «experiencia personal», dado que cada experto sugería la importancia que podía tener un elemento concreto, con independencia de si este punto estaba fundamentado o no en la evidencia. La razón principal para incluir un punto en la lista es la evidencia de que su omisión se asocia a sesgos. Lo más habitual es que los puntos se incluyan en la lista por el conocimiento previo de que la información sobre éstos es clave para evaluar la fiabilidad de un estudio, quizá en combinación con la evidencia de que esta información clave se omite frecuentemente. Al debatir la lista de elementos se insistió más en su contenido que en el término utilizado para su expresión.

Para que un grupo de desarrollo de directrices tenga éxito según Moher et al. (2010), este debe estar constituido por una amplia gama de participantes que representen diferentes perspectivas y experiencias. El Grupo SEMQUA incluyó especialistas de diferentes áreas de conocimiento, como la epidemiología, metodología científica, laboratorio de andrología y embriología, andrología clínica, clínica reproductiva, y por último la edición de publicaciones científicas.

Al igual que en la mayoría (73%) de Grupos de trabajo de la red EQUATOR (Simera et al., 2008), y siguiendo las REGECEs, nuestro grupo multidisciplinar de expertos se constituyó con profesionales de 6 países diferentes (Canadá, Dinamarca, España, Reino Unido, Sudáfrica y Suecia). De igual modo el número de expertos de nuestro grupo (12) se aproximó al valor central del rango de la mayoría de grupos que elaboran guías para la red EQUATOR (3-24).

El tiempo empleado en el desarrollo de SEMQUA (22 meses) y su publicación (12 meses) fue similar al tiempo medio empleado en la elaboración (20 meses) y publicación (11 meses) de 37 guías de evaluación de la calidad de los estudios de salud de la red EQUATOR (Simera et al., 2008).



Los siguientes ítems agrupados en 4 grupos fueron incluidos en la versión final de SEMQUA. Discutiremos a continuación cada ítem y los elementos que llevaron a su inclusión:

## 1. PARTICIPANTES

ITEM 1: Selección de los participantes: criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de selección de los estudios observacionales y experimentales deben ser descritos. El tipo de estudio en cuestión determinará la selección de los participantes (Röhrig et al., 2009; Schulz et al., 2010; Sheynkin et al., 2011). Para los estudios observacionales, la selección de participantes debe realizarse de acuerdo con el contenido de la declaración STROBE: a) Los estudios de cohorte deben especificar la fuente de los participantes, los medios por los que se seleccionan, y los métodos de seguimiento que se aplican; b) Los estudios de casos y controles además de exponer los criterios de inclusión aplicados al grupo de casos, y cómo han sido seleccionados los controles, deben incluir una especificación del número de controles por caso; c) Los estudios de dosis-respuesta también deben indicar si la exposición a la sustitución del agente del estudio se lleva a cabo de forma gradual (Soares y Melo, 2008); d) Los estudios transversales deben describir la fuente de los participantes y los métodos de selección ([www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org)) (von Elm et al., 2007).

ITEM 2: El sesgo de selección: acuerdo / rechazo de los participantes.

Algunos estudios se basan en poblaciones con escasa participación (por ejemplo, voluntarios de la población general), lo que lleva a una baja validez interna y otros se basan en muestras muy seleccionadas, tales como donantes de semen o varones de parejas infértiles, de escasa validez externa (Xie et al., 2011; Dissanayake et al., 2010; Lazaros et al., 2011).

Hay que tener en cuenta que, por pura probabilidad matemática, el grupo de individuos seleccionados para el estudio puede no ser representativo de la población objetivo. Por lo tanto, debemos tener en cuenta los factores que influyen en la

predisposición de los sujetos a participar en un estudio de calidad seminal, ya que esto podría influir en los resultados obtenidos. Se ha demostrado en diversos estudios que los participantes pueden ofrecerse como voluntarios debido a una preocupación subyacente acerca de su fertilidad, lo que, obviamente, puede distorsionar los resultados (Cohn et al., 2002; Olshan et al., 2007; Stewart et al., 2009). De hecho, el reclutamiento de un grupo de voluntarios que realmente constituya una muestra aleatoria y no sesgada de la población de interés implica una dificultad considerable (Handelsman, 1997). Un análisis de semen es una prueba muy impopular para los participantes potenciales y por lo tanto los estudios de semen se ven limitados por la estrategia de diseño y reclutamiento (sobre todo la representatividad). Esta es una limitación importante para la interpretación de estudios observacionales.

Los incentivos para aumentar la tasa de participación podrían sesgar la población de estudio y esto se debe registrar. Por lo tanto, los incentivos deben constar de forma expresa (económico, por ejemplo), de modo que los lectores posteriores puedan establecer su valor (Ravnborg et al., 2011).

Se consideró oportuno recomendar la realización de un diagrama de flujo (Figura 6) para describir los pacientes que rechazan participar en el estudio y los excluidos de este. Además también se creyó necesario discutir las razones de la no participación en una o más de las fases (Davidoff et al., 2008; Von Elm et al., 2007).

### ITEM 3: Lugar de realización del estudio

La mayoría de modelos pronósticos de fertilidad masculina han sido realizados en centros de atención especializada, sin tener en cuenta las parejas sub-fértiles tratadas en los centros de atención primaria. Por otra parte, sólo un subconjunto de las personas sub-fértiles buscan atención médica en primaria. Como vemos, el sesgo de reclutamiento está presente en todos los niveles de la asistencia sanitaria. Los estudios de los centros de atención especializada pueden representar en exclusiva a determinadas poblaciones de pacientes, cuya composición se inclina a favor de las personas con factores persistentes, a menudo sesgada por el interés académico del centro (Snick et al., 1997).

#### ITEM 4: Características demográficas de la población de estudio

La probabilidad de que las diferencias regionales, más allá de las influencias étnicas (Johnson et al., 1998), influyan en los resultados de análisis de semen no se debe ignorar. Diversos estudios han reportado evidencias de variaciones geográficas en la calidad seminal (Auger y Jouannet, 1997; Gao et al., 2007; Jørgensen et al., 2002; Swan et al., 2000; Fernández et al., 2012).

#### ITEM 5: Variables explicativas y factores de confusión

Diferentes variables explicativas o independientes han demostrado influir en la calidad seminal. Los factores de confusión son variables explicativas que pueden producir un sesgo, cuyo tipo dependerá del diseño de la investigación.

Entre estas variables se encuentran edad (Kidd et al., 2001; Frattarelli et al., 2009; Kühnert y Nieschlag, 2004), índice de masa corporal (Cabler et al., 2010.), dieta (Mendiola et al., 2010), actividad física (Vaamonde et al., 2006), consumo de tabaco (Ravnborg et al., 2011), consumo de alcohol (Gaur et al., 2010), consumo de cafeína (Jensen et al., 2010) y la estacionalidad (Chen et al., 2004 ). Además, a todos los sujetos que participan en un estudio se les debe realizar un examen médico para revelar las patologías subyacentes, concomitantes o incidentales en su historia clínica que pueda ser relevante a la calidad seminal (por ejemplo, varicocele, criptorquidia, etc) (Ramlau-Hansen et al., 2007c; Boyd, 2010). La importancia de esta información incorporada coincide con lo sugerido recientemente por Legro et al. (2014) en la adaptación de CONSORT a ensayos clínicos sobre tratamientos de esterilidad.

La evidencia de efectos adversos sobre la reproducción masculina por la exposición ambiental y ocupacional a tóxicos ha sido fuertemente apoyada en varios estudios epidemiológicos (Jensen et al., 2006a, b; Li et al., 2011; Mendiola et al., 2011b). La exposición a los disruptores endocrinos, tales como los ftalatos (Mendiola et al., 2011a), retardantes de llama bromados, compuestos de bisfenol A (BPA) y perfluoroalquilo también tienen un impacto negativo sobre la fertilidad masculina (Aitken et al., 2006; Andersson et al., 2008, Desai et al., 2009; Joensen et al., 2009). De igual modo deben considerarse factores ocupacionales como calor (Sheynkin et

al, 2011), la radiación ionizante (De Luliis et al, 2009), trabajar en soldadura, la exposición a plomo inorgánico y diferentes compuestos orgánicos (Jensen et al., 2006a; Mortimer et al., 2013).

#### ITEM 6: Fecundidad

Aunque el estado de la fecundidad de los individuos en sí mismo puede constituir un factor de confusión es esencial incluir esto como un tema aparte.

En los estudios de calidad seminal, es una práctica habitual clasificar la población de estudio como fértil, excluyendo por tanto probablemente a varones fértiles de la población en general que no han intentado tener un hijo, o infértiles.

En los estudios con varones de las parejas fértiles, es necesario tener en cuenta factores como el uso de anticonceptivos, la posibilidad de la paternidad atribuida por error (Skakkebaek, 2010), embarazos accidentales (no planificado), el deseo sexual y la oportunidad de tener relaciones sexuales sin el uso de métodos anticonceptivos (Joffe, 2010b).

La tasa de fecundidad se ha utilizado tradicionalmente como una medida de los cambios en las tasas de natalidad, aunque se ha demostrado que este es un mal indicador para los varones (Guzick et al., 2001). En la actualidad, muchas parejas desean tener una familia pequeña, y este factor puede ocultar una alteración espermática. Así parejas con bajos niveles de fertilidad, pueden alcanzar el tamaño de familia deseado (Joffe et al., 2009; Pascualotto et al., 2003).

La medición del tiempo requerido para lograr el embarazo (time to pregnancy, TTP) es un método de valoración de la fecundidad biológica. En este sentido, debe tenerse en cuenta que los embarazos no deseados son excluidos de los estudios de TTP, lo que genera datos no aleatorios (Joffe et al., 2008), ya que estas parejas tienden a ser más fértil que la población general (Key et al., 2009). Por lo tanto, la estimación de TTP puede subestimar la verdadera fertilidad. Por otra parte, uno de los principales problemas en los estudios de TTP es el de medir adecuadamente el punto inicial del plan de embarazo (Pasqualotto et al., 2003).

Factores femeninos como la edad de la mujer al inicio de intentar la gestación, regularidad del ciclo menstrual, trastornos urogenitales anteriores, consumo de tabaco, índice de masa corporal y el uso previo de anticonceptivos orales, también pueden producir sesgos en los resultados obtenidos de los estudios de calidad seminal entre la población fértil (Slama et al., 2002; Jensen et al., 2006b; Jedrzejczak et al., 2007). Tampoco se deben olvidar los abortos en general, y en especial, los voluntarios pues también podrían actuar como factores de confusión.

Además de los elementos antes mencionados con respecto a la población fértil, en los estudios de la población infértil es necesario tener en cuenta la duración de la infertilidad y otros factores de confusión (ver ítem 5), tales como exposición a drogas u otros tratamientos médicos (Kehl y cols., 2011). No debemos olvidar, tampoco las evidencias de calidad que avalan un efecto negativo de la edad del varón no sólo en las tasas de éxito de los tratamientos de esterilidad, sino también en los casos de concepción natural (Sartorius y Nieschlag, 2010; Dain et al., 2011). A mayor edad menos tasas de embarazo y menores tasas de nacidos vivos.

Muestra de la relevancia clínica de este ítem es que ha sido tenido en cuenta en la reciente adaptación de CONSORT a los ensayos clínicos sobre tratamientos de esterilidad (Legro et al., 2014).

#### ITEM 7: Factores de confusión preanalíticos

Dada la trascendencia de los aspectos técnicos de un estudio sobre calidad seminal, los factores de confusión preanalíticos, en este área de la medicina reproductiva juegan un papel muy importante:

##### i) Periodo de abstinencia sexual

La OMS, en su quinta edición del Manual de Laboratorio para el análisis de semen humano, pone de relieve importantes variaciones en la concentración de espermatozoides de acuerdo con el período de abstinencia sexual en un mismo individuo (OMS, 2010). Por otro lado, se han descrito diferencias significativas en la calidad seminal en cuanto al número de eyaculaciones (1,2 ó >2) en los 7 días previos al período de abstinencia sexual antes del análisis de semen (Tyler *et al.*, 1982a,b, 1985; Carlsen et al., 2004). Además, es conocida la influencia de este factor

en la fragmentación del ADN espermático (Marshburn et al., 2014). Por estos motivos, el período de abstinencia sexual debe considerarse como una variable clave de cualquier estudio sobre calidad seminal.

ii) Estacionalidad

La época del año se asocia a variaciones en la calidad seminal (Jørgensen et al., 2001). Además, la época del año también puede influir en la frecuencia de la eyaculación (Carlsen et al., 2004). Por lo que este factor debe ser registrado.

iii) Tiempo hasta el análisis

El tiempo transcurrido entre la obtención de una muestra de semen y su procesamiento inicial puede afectar a la movilidad espermática (Amann, 2010), y por lo tanto se debe considerar la duración de este intervalo (Appell et al., 1977).

iv) Lugar de recogida

Varios estudios han analizado las diferencias en la calidad seminal entre la obtención de muestras en la sala proporcionada por el laboratorio y el domicilio del varón, encontrando valores de los parámetros seminales significativamente más altos en varias muestras obtenidas en el hogar (Elzanaty y Malm, 2008). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias en la calidad seminal con respecto a la obtención en distintos sitios (Jørgensen et al., 2001; Licht et al., 2008; Fernández et al., 2012). Aunque la bibliografía con respecto a este factor no es concluyente, creemos que este dato debe recogerse.

v) Otros factores preanalíticos

La duración del estímulo pre-eyaculatorio (tiempo de eyaculación) ha sido asociada negativamente con los parámetros seminales (Elzanaty., 2008). Por otro lado, las muestras para las que faltan datos y las muestras incompletas, deben ser excluidas del análisis (Bonde et al., 1998).

## 2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

### ITEM 8: Número de muestras analizadas

Varios autores han sugerido que para obtener una determinación fiable de la calidad seminal de un individuo es necesario el análisis de varias muestras, fundamentalmente debido a la variabilidad en los parámetros seminales (Jeyendran, 2000; Carlsen et al., 2004; Castilla et al., 2006). Los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) tienen una alta variabilidad intra-individual tanto en varones sanos (Álvarez et al., 2003) como en hombres subfértiles (Leushuis et al., 2010). Este aspecto metodológico es, por tanto clave y su ausencia limita la aplicabilidad de los resultados obtenidos.

Sin embargo, debido a que las características específicas de los estudios de calidad seminal condicionan que la mayoría de los estudios solo incluyan una muestra por individuo, lo que hace aún más necesario controlar por diferentes variables, ya concretadas en el ítem anterior, para minimizar al máximo la variabilidad biológica y analítica (Stokes-Riner et al., 2007).

#### ITEM 9: Participación en controles de calidad

Detectar errores inaceptables durante el análisis, de modo que se puedan realizar correcciones evitando de este modo llegar a unos resultados erróneos, es fundamental en cualquier estudio científico. Esto se consigue mediante la realización de controles de calidad internos y externos (ver apartado 1.2 de la introducción).

ITEM 10: Número, formación y experiencia de los profesionales que llevan a cabo el análisis de semen y su interpretación.

En el análisis de semen existe una alta variabilidad entre observadores. Determinar el número, la formación y la experiencia de las personas que llevan a cabo el análisis es imprescindible (Björndahl et al., 2002; Franken y Kruger, 2006).

Los métodos manuales están basados en valoraciones subjetivas, por lo que es esencial para el personal estar formado en métodos estandarizados (Barratt et al., 2011; Björndahl et al., 2010). Entre los cursos de formación normalizados se encuentran los desarrollados por el Grupo de Interés Especial de Andrología (SIGA) de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), basados en los desarrollados originalmente por la Sociedad Británica de Andrología

(Björndahl, et al., 2002). Estos cursos ESHRE-SIGA se han impartido desde 1994 en muchos países (Björndahl y Kvist, 1998; Punjabi y Spiessens, 1998; Vreeburg y Weber, 1998). El Curso Básico de Análisis de Semen de la ESHRE-SIGA ofrece la base teórica así como la formación práctica necesaria en la evaluación de la concentración, motilidad, vitalidad y morfología espermática. Varios autores han puesto de relieve la importancia de la formación unificada de los investigadores en proyectos científicos específicos sobre calidad seminal (Jørgensen et al., 1997; Auger et al., 2000; Brasil et al., 2004a, b; Franken et al., 2003; Franken and Dada, 2005; 2007).

#### ITEM 11: Uso de métodos normalizados

El uso de métodos de trabajo reconocidos y estandarizados debe estar bien referenciado en la publicación (WHO 2010; Björndahl et al., 2010; Kvist y Björndahl, 2002). Un ejemplo de un método estandarizado es el manual de laboratorio de la Asociación Nórdica de Andrología (NAFA), desarrollado en colaboración con la ESHRE-SIGA (Barratt et al., 2011; Kvist y Björndahl, 2002) basado en los estándares mínimos recomendados por la OMS (OMS 2010). Es importante considerar que este último contiene errores e inconsistencias que cualquier organización que utilice estas normas debe tener en cuenta (Barratt et al 2011). La metodología aplicada debe incluir determinaciones por duplicado, la evaluación de un número suficiente de células y la utilización del equipo adecuado.

### 3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

#### ITEM 12: Diseño del estudio

El diseño del estudio debe quedar claro en el texto (Lenzi et al., 2003) de modo que los lectores puedan identificarlo fácilmente. Un término explícito utilizado habitualmente para el diseño del estudio, ayuda también a asegurar la correcta indexación del artículo en bases de datos electrónicas (Benson y Hartz, 2000; Gøtzsche y Harden, 2002).

Existen, principalmente, dos grupos de diseño de estudios: observacionales (en los que no se produce la manipulación por parte del investigador) y



experimentales. Ambos tipos se aplican en estudios de calidad seminal humana. Sin embargo, la gran mayoría son estudios observacionales transversales (no tienen una continuidad en el tiempo) (Jorgensen et al., 2002; Vujkovic et al., 2009; Meeker et al., 2010) y estudios de caso-control (Mendiola et al., 2010). Otros diseños observacionales utilizados son los estudios prospectivos (Wise et al., 2011) y los estudios de cohortes (Bonde et al., 1998; Ramlau-Hansen et al., 2010).

El diseño experimental para un estudio en humanos se centra básicamente en los ensayos clínicos aleatorios (ECA), que describen con mayor rigor científico el principio de causalidad, es decir, la secuencia de causa (la exposición o evento a medir) y efecto (por ejemplo, impacto en la calidad seminal). Un ECA proporciona más información que cualquier estudio observacional (Abdel-Meguid et al., 2011), pero no siempre puede llevarse a cabo.

El diseño del estudio depende del aspecto que quiere estudiarse y del presupuesto disponible para el proyecto.

#### ITEM 13: Métodos estadísticos

La distribución estadística de las principales variables incluidas en un seminograma debe ser evaluada (Handelsman 2002). Tanto el test de Shapiro-Wilk como el test de Kolmogorov-Smirnov son adecuados para evaluar la normalidad de las variables. Esta distribución suele ser normal (o gaussiana) para los principales parámetros seminales, a excepción de la concentración espermática que normalmente muestra algunos valores atípicos (Figura 8a; Berman et al., 1996). Este sesgo tiene gran influencia en la media aritmética y crea una desviación estándar excesivamente alta, por lo que es recomendable expresar la concentración espermática a través de la mediana.

Cuando una variable no sigue una distribución normal podemos utilizar métodos estadísticos no paramétricos, pero éstos impiden posteriores ajustes por variables de confusión, por lo tanto los datos deben ser normalizados (Eisenberg et al., 2011), mediante la aplicación de transformaciones, como la raíz cuadrada y la transformación logarítmica (Mortimer y Lenton, 1983; Berman et al., 1996; Handelsman 2002) (Figuras 8B, 8C, respectivamente), lo que facilita el acceso a

métodos estadísticos paramétricos como la regresión lineal (Joensen et al., 2009) y permite ajustar por factores de confusión (Handelsman, 2002; Boyd, 2010).

Con el fin de aumentar la interpretabilidad de los resultados obtenidos, los datos transformados se deberán volver a transformar en su escala natural a pesar de su asimetría.

En general no hay un único análisis estadístico correcto, sino que existen varias posibilidades que pueden atender a la misma cuestión haciendo diferentes suposiciones. Al comunicar un estudio, los autores deben mencionar los métodos estadísticos utilizados, describir las transformaciones realizadas, indicar las referencias de procedimientos novedosos o poco comunes, así como el software estadístico utilizado. Recomendamos que los métodos estadísticos se describan con suficiente detalle para permitir al lector con conocimientos y acceso a los datos originales verificar los resultados comunicados.

#### ITEM 14: Ajuste por factores de confusión

Muchas de las variables más relevantes como edad, índice de masa corporal (IMC), etnia, tabaquismo, estación del año, periodo de abstinencia, tiempo desde la recogida de la muestra hasta su procesamiento inicial, volumen testicular, presencia de varicocele, etc. así como exposiciones prenatales (Jensen et al., 2004a) deben tenerse en cuenta en estudios de calidad seminal humana. Estas covariables pueden influir en los parámetros de calidad seminal y por lo tanto, deben ser controladas con el fin de lograr resultados fiables (Jørgensen et al., 2001; Jensen et al., 2004b; Stewart et al, 2009; Zou et al, 2011).

Existen varios métodos de ajuste por factores de confusión. Los más utilizados son la regresión lineal múltiple (variable dependiente continua y gaussiana) y la regresión logística (variable dependiente dicotómica o policotómica) (Vujkovic et al., 2009; Meeker et al., 2010; Mendiola et al., 2010; Ramlau-Hansen et al., 2010; Ravnborg et al., 2011).

Por lo tanto, la ausencia de un análisis multivariante en un estudio sobre parámetros seminales es un indicador de baja calidad metodológica.

#### ITEM 15: Valores atípicos

Se deben examinar todos los valores atípicos de las variables seminales incluidas en el estudio. La detección de estos valores se puede realizar mediante el gráfico de cajas o calculando las puntuaciones tipificadas o puntuaciones Z. (Fenster et al., 1997). Tras el análisis estadístico de los resultados, se debe analizar la existencia de situaciones atípicas similares y podrían añadirse criterios de exclusión a la selección de los pacientes (Lenzi et al. 2003).

#### ÍTEM 16: Incertidumbre de la medida

Las mediciones, incluso bajo condiciones de repetitividad, incluyen variabilidad y un error asociado. Sin la adecuada cuantificación de estas variaciones, la medición es de escaso valor y tiene muy poca credibilidad (Björndahl et al., 2010). La reproducibilidad se cuantifica por medio del coeficiente de variación. Por lo tanto, para cada técnica aplicada se debe indicar el coeficiente de variación intra e inter-observador.

En un estudio sobre calidad seminal, es importante, indicar la variabilidad analítica relacionada con cada uno de los parámetros analizados. Por lo que la incertidumbre debe estar asociada con un intervalo de confianza, normalmente el 95%. En nuestro caso, la variabilidad de los resultados de laboratorio depende, entre diversos factores, del número total de espermatozoides evaluados.

## 4. RESULTADOS

#### ÍTEM 17: Presentación de los resultados

La sección de resultados debe hacer un claro recuento de lo que se encontró, del reclutamiento de los participantes, de la descripción de la población del estudio y de los principales resultados del análisis. Ha de estar libre de interpretaciones e ideas que reflejen las opiniones y los puntos de vista de los autores (Vandenbroucke et al., 2009). Además, los resultados, deben ser expresados distinguiendo entre los que se refieren a las características de la población de estudio, a la prueba en sí y al análisis estadístico aplicado.

La precisión de los resultados determinará su validez interna y permitirá la generalización al menos a parte de la población (validez externa) (Tooth et al., 2005). La validez interna es el grado en que un estudio está libre de sesgos o errores sistemáticos. Depende de los métodos utilizados para seleccionar a los sujetos de estudio, recoger información, y realizar el análisis (Porta, 2008).

La validez interna es un requisito previo para la validez externa, ésta se refiere a la capacidad de extrapolar los resultados de un estudio a otros contextos o pacientes. Un estudio externo es válido si permite inferencias imparciales con respecto a algunas otras poblaciones más allá de los sujetos objeto del estudio específico. Por lo tanto se refiere a la capacidad de hacer inferencias razonables a una población externa que no participa en el estudio (Porta, 2008).

Por ejemplo, Meeker et al. (2010), Vujkovic et al. (2009) y Xie et al. (2011) estudiaron la calidad seminal de las parejas masculinas que asistieron a clínicas de infertilidad en relación con la exposición al BPA (disruptor endocrino), ciertos hábitos alimenticios y el ácido tricloroacético, respectivamente. La posible generalización de los resultados se centra en poblaciones similares, las parejas masculinas en parejas sub-fértiles, y no, por ejemplo, en los varones fértiles, los donantes u otro grupo de población.

Ravnborg et al. (2011) estudiaron si la exposición prenatal (en útero) al tabaco en una población danesa joven podría afectar a su reproducción (calidad seminal y hormonas reproductivas) y los parámetros fisiológicos (desarrollo de la pubertad, altura e índice de masa corporal). En este caso, además del tamaño de la muestra analizada ( $n = 3,486$ ), uno de los puntos más fuertes del estudio es que las asociaciones se ajustaron bajo el control de los efectos actuales de la exposición, es decir, de si estos jóvenes son fumadores en la actualidad. Por lo tanto, se puede determinar "sin interferencias" las asociaciones entre la exposición prenatal al tabaco y los parámetros reproductivos y fisiológicos en la edad adulta. Por otra parte, la generalización del estudio en términos globales es posible, porque este grupo de hombres puede ser considerado representativo de la población general de varones jóvenes en Dinamarca.

## ÍTEM 18: APLICABILIDAD

Como hemos comentado anteriormente, la mayoría de los diseños de los estudios de calidad seminal en seres humanos son observacionales (Bonde et al., 1998; Vujkovic et al., 2009; Meeker et al., 2010; Mendiola et al., 2010; Ramlau-Hansen et al., 2010; Wise et al., 2011) y tal vez este tipo de estudio limita la aplicabilidad de los resultados obtenidos. No obstante, con un diseño adecuado, se puede obtener información muy útil. Por ejemplo, Meeker et al. (2010) reportaron la relación entre las concentraciones urinarias de BPA y la calidad seminal de los pacientes que asistieron a una clínica de fertilidad. En este caso, un aumento de la concentración urinaria de BPA se asoció con una disminución significativa de concentración, movilidad y morfología espermáticas, junto con un significativo aumento en el daño del ADN espermático. Este es un ejemplo de cómo la exposición a compuestos químicos puede afectar el sistema reproductivo masculino, y muestra la importancia de determinar su contribución como un factor relevante a la infertilidad masculina (Toppari et al., 1996).

Otros ejemplos de alta aplicabilidad pero con diseños no observacionales son los estudios aleatorizados de Balercia et al. (2005) y Abdel-Meguid et al. (2011), que, como se comentó anteriormente, contribuyen con mayor evidencia científica y rigor metodológico a la pregunta del estudio. Por ejemplo, con respecto a los ensayos clínicos, un tema bastante controvertido es si la cirugía del varicocele mejora la fertilidad masculina. En un estudio randomizado reciente, Abdel-Meguid et al. (2011) demostraron la superioridad de la varicocelectomía sobre la observación en hombres infértiles con varicocele palpable y calidad deficiente del semen, con mayores probabilidades de embarazo espontáneo y mejoras en las características del semen en un año de seguimiento.

## APLICACIÓN DE SEMQUA A ESTUDIOS SOBRE CALIDAD SEMINAL Y PESTICIDAS PERSISTENTES

Los resultados de este estudio indican que la calidad de los artículos sobre calidad seminal y exposición a pesticidas persistentes es baja, especialmente en las características metodológicas. Además, nuestros resultados, al igual que han descrito otros autores (Bath et al., 1998), han demostrado que la baja calidad de los estudios

científicos se asocia a la obtención de efectos significativos en estos. Los bajos niveles de calidad de la información observados coinciden con estudios similares de la literatura médica (Galera et al., 2011; Samaan et al., 2013) o en el área de la medicina reproductiva en particular (Coppus et al., 2009). Esta falta de rigor en la investigación reproductiva está en el origen probablemente de las controversias existentes sobre el aumento o descenso actual de la calidad seminal y de la fertilidad (Joffe, 2010). Una colaboración real interdisciplinaria (básicos, clínicos y epidemiólogos) facilitaría el desarrollo riguroso de estudios de calidad seminal y evitaría mucha investigación de baja calidad. Además, el cumplimiento con los estándares metodológicos permitiría que el análisis de la calidad seminal se convirtiese en un marcador muy útil en la investigación clínica y de servicios sanitarios tanto de salud general (Jensen et al., 2009) como reproductivas (Guzick et al., 2006).

Nuestros resultados, sobre el cumplimiento de ítems metodológicos demuestran que la adherencia a las recomendaciones y guías es mayor cuanto más específica es la guía. Estos hallazgos coinciden con lo observado por Samaan et al. (2013). Estos autores después de revisar 50 revisiones sistemáticas sobre la adherencia a las guías concluyen que una estrategia para aumentar la calidad de la información sería desarrollar nuevas guías sobre áreas clínicas específicas, como hemos hecho recientemente desarrollando y publicando SEMQUA (Sánchez-Pozo et al., 2013). El hecho de que SEMQUA haya sido publicado recientemente no explica la baja calidad observada en los trabajos, ya que muchos de sus criterios son requisitos imprescindibles en la mayoría de estudios observacionales ya recogidos parcialmente –los más relevantes– en otras guías y publicaciones anteriores como la guía STROBE, incluida en este estudio.

Nuestro estudio tampoco ha demostrado una mejora significativa de la calidad de la información "antes y después de STROBE", lo que podría justificarse por la falta de adherencia de la guía STROBE al ámbito de la calidad seminal comentada anteriormente. La mayor adherencia a las guías observada en los estudios ambientales se debe a que estos han sido publicados más recientemente, ya que, como demuestran nuestros resultados y los de otros autores (Ziogas, 2009; Montgomery et al., 2011), la fecha de publicación es un factor asociado con una mayor calidad de la información. Esto puede ser debido a tres factores (Bath et al.,

1998): (1) los estudios son cada vez mayores e involucran a más autores, (2) los autores ganan experiencia y habilidades en escribir artículos y (3) los editores y revisores exigen cada año mayor calidad de los artículos.

No todos los requisitos tienen, lógicamente, la misma importancia en cuanto a sus efectos en la validez de los estudios evaluados. Teniendo en cuenta las principales características que debe reunir un estudio de calidad seminal, es importante que resaltemos los aspectos clave para la validez que se han mostrado como más deficientes. En primer lugar, se encuentran las características de la población, la descripción de la población de estudio fue descrita en el 60% de los artículos aunque esto puede parecer una calificación razonable, en nuestra opinión, este porcentaje es preocupante. Una descripción ausente o incompleta de la población de estudio (con ítems de inclusión y exclusión) afecta a la generalización del estudio. Existen evidencias de que esto puede ir acompañado de una sobreestimación del efecto (Sackett et al., 1979, Grimes et al., 2002, Dawson et al., 2004).

En segundo lugar, otra deficiencia metodológica clave y que limita la aplicabilidad de los resultados es la escasa descripción del número de muestras evaluadas ya que la mayoría de los estudios evaluados (89%) no informan acerca del número de muestras de semen analizadas por individuo o sólo analizan una muestra sin justificar que esto sea apropiado para su estudio. Los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) tienen una alta variabilidad biológica (Álvarez et al., 2003; Leushuis et al., 2010). Esto ha hecho que varios autores hayan sugerido que para obtener una determinación fiable de la calidad del semen de un individuo sean necesarias varias muestras (Jeyendran, 2000; Carlsen et al., 2004).

En los estudios de calidad que solo se analiza una muestra por individuo, es necesario controlar por diferentes variables ya comentadas (Stokes-Riner et al., 2007). La no inclusión de esta información en el estudio impide diferenciar en detalle el efecto real de una exposición, de la variación biológica o fisiológica de los parámetros seminales. Prueba de la importancia de estos factores estaría en el hecho de que el único parámetro seminal cuya disminución se ha asociado con una baja adherencia a las guías es la concentración, el parámetro seminal más afectado por la variabilidad biológica (Álvarez et al., 2003; Carlsen et al., 2004).

En tercer lugar, la participación en controles de calidad tanto internos como externos, la identificación de valores atípicos y la cuantificación de la incertidumbre de los valores observados, han sido otro de los puntos débiles de los estudios evaluados. Estos resultados coinciden con la pobre implementación de los principios de los controles de calidad en los laboratorios de andrología descritos por dos estudios (Keel et al., 2002; Ridell et al., 2005). Puede ser debido a que los profesionales del laboratorio no entienden las bases estadísticas sobre las que se realizan las mediciones (Pacey, 2010). Sin la cuantificación adecuada de la variabilidad de cada medida y de su error asociado la medición es poco fiable (Björndahl et al., 2010). El cálculo de la incertidumbre y la precisión de las medidas realizadas en los análisis de semen empezó a recomendarse a partir de 1999 (WHO 1999). El 45,7% de los trabajos seleccionados para este estudio fueron publicados con anterioridad, sin embargo si analizamos el grado de cumplimiento en este aspecto concreto en el 54.3% de los trabajos posteriores, comprobamos que apenas se observa un descenso en el porcentaje de estudios que incumplen este ítem (95.2% vs 80.0%) a partir del año 2000. Hay que destacar, que los métodos para el cálculo de la precisión de los parámetros seminales se encuentran fácilmente disponibles en la literatura y son esenciales para la detección y corrección de errores sistemáticos y aleatorios garantizando así la fiabilidad de los resultados (Castilla et al., 2006, WHO, 2010).

Nuestro estudio pone de relieve la necesidad de unificar la indexación de los artículos sobre calidad seminal, ya que el 15% (7 artículos) de los artículos incluidos no fue localizado en la primera estrategia de búsqueda sino a través de una revisión extensa de la bibliografía de los resultados obtenidos. De los 7 artículos no identificados con las palabras clave “sperm and pesticides”, dos más se habrían encontrado con el término “sperm quality”. SEMQUA, al contrario que otras guías específicas como STARD, no incluye ninguna recomendación en el uso de términos de indexación. Para facilitar la recuperación de estudios sobre calidad seminal los autores deben usar el término semen o calidad seminal en el título o en el resumen.

Entre las limitaciones del estudio tenemos que se evaluó la calidad de la información, analizando aspectos metodológicos y de diseño, sin embargo no consideramos en este estudio características adicionales tales como la claridad del lenguaje utilizado para la información (legibilidad), coherencia y la ausencia de



ambigüedad (González et al., 2004). Además, tenemos que tener en cuenta el riesgo de sesgo de publicación, que podría significar que sólo se han publicado los estudios sobre pesticidas persistentes que muestran un efecto significativo sobre los parámetros.

Otra limitación es que no se ha podido evaluar si el alto incumplimiento observado en SEMQUA y en la guía STROBE es debido a un descuido en la preparación de los artículos por los autores o en su proceso editorial, o de ambas cosas. El hecho de no haber observado relación entre el ámbito de la revista (clínica vs investigación ambiental) y la calidad de la información sugiere que los bajos niveles observados en la calidad de la información de los estudios están más relacionados con la autoría de los trabajos que con el proceso editorial. En otros ámbitos de salud (Balasubramanian et al., 2006, Lumbreras et al., 2006) si han observado relación entre la calidad de la información y el ámbito de la revista, sugiriendo que sería necesario estandarizar el proceso editorial. Por otro lado, una opción no evaluada en nuestro estudio y que podría relacionarse con los bajos niveles de calidad de la información observados es que autores, revisores y editores están menos familiarizados con la guía STROBE que con otras guías similares como CONSORT (Samaan et al., 2013). Al igual que en otras áreas la mejoría debe fundamentarse en un esfuerzo realizado por autores y grupos editoriales al seguir estas guías (Lumbreras-Lacarra et al., 2004). En el futuro, debe haber un seguimiento de la mejoría en la calidad de la metodología de los estudios para confirmar posibles efectos beneficiosos.

Creemos firmemente que las recomendaciones SEMQUA podrían incrementar sustancialmente la calidad en la presentación de estudios sobre parámetros seminales que pueden conducir a una mayor tasa de publicaciones en el futuro. Tal y como ha ocurrido tras la publicación de guías similares en otros ámbitos de investigación sanitaria (Begg et al., 1996, Areia et al., 2010, Capili et al., 2010). Sin embargo los aspectos valorados no deben ser interpretados como un intento de describir la información de la investigación observacional en un formato rígido. Los ítems de la lista deberían abordarse con suficiente detalle y con claridad en algún momento en un artículo, pero el orden y el formato para la presentación de información depende de las preferencias de autor, estilo revista, y las tradiciones del campo de la investigación.

## **CONCLUSIONES**



1. La guía REGECES se ha mostrado como un instrumento útil para elaborar guías de evaluación de estudios en salud reproductiva. Su aplicación al ámbito de la calidad seminal ha permitido la elaboración de la guía SEMQUA para diseñar estudios sobre calidad seminal o para evaluarlos.

2. SEMQUA ha demostrado ser una herramienta más específica para el campo de la calidad seminal que STROBE.

3. Aunque actualmente la calidad de las publicaciones sobre calidad seminal y pesticidas parece haber mejorado, esta sigue siendo baja.

4. El bajo grado de cumplimiento observado en los estudios de calidad seminal y pesticidas es coincidente con lo observado en otros trabajos sobre medicina reproductiva y pone de relieve la necesidad de mejorar el diseño de los estudios sobre calidad seminal.

5. La relación directa observada entre baja calidad del estudio y un efecto negativo de los pesticidas sobre la calidad seminal, no permitiría determinar si las alteraciones seminales observadas en estos estudios son debidas a variaciones fisiológicas o patológicas.

6. Es fundamental que editores, revisores y autores conozcan y apliquen SEMQUA a la hora de evaluar o diseñar artículos sobre calidad seminal.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abell A, Ernst E, Bonde JP. Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* 2000;26:492-500.
- Abdel-Meguid TA, Al-Sayyad A, Tayib A, Farsi HM. Does varicocele repair improve male infertility? An evidence-based perspective from a randomized, controlled trial. *Eur Urol* 2011;59:455-461.
- Adami HO, Bergstrom R, Mohner M, et al. Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 1994;59:333-338.
- Afeiche MC, Williams PL, Gaskins AJ, Mendiola J, Jørgensen N, Swan SH, Chavarro JE. Meat intake and reproductive parameters among young men. *Epidemiology* 2014;25:323-330.
- Afeiche M, Williams PL, Mendiola J, Gaskins AJ, Jørgensen N, Swan SH, Chavarro JE. Dairy food intake in relation to semen quality and reproductive hormone levels among physically active young men. *Hum Reprod* 2013;28:2265-2275.
- Aguilar J, Álvarez C, Morancho-Zaragoza J, Prats-Gimenez R, Ramírez JP, Fernández-Pardo E, et al. Quality specifications for seminal parameters based on clinicians' opinions. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68:68-76.
- Aitken RJ, Skakkebaek NE, Roman SD. Male reproductive health and the environment. *MJA* 2006; 185(8):414-415.
- Al-Namankany AA, Ashley P, Moles DR, Parekh S. Assessment of the quality of reporting of randomized clinical trials in paediatric dentistry journals. *Int J Paediatr Dent* 2009;19:318-324.
- Altman DG, Moher D. Elaboración de directrices para la publicación de investigación biomédica: proceso y fundamento crítico. *Med Clin* 2005;125:8-13.
- Altman DG, Schulz KF, Moher D, Egger M, Davidoff F, Elbourne D et al; CONSORT GROUP (Consolidated Standards of Reporting Trials). The revised CONSORT



- statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med* 2001;134:663-694.
- Álvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Rep* 2003;18:1-7.
- Alvarez C, Castilla JA, Ramírez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernández A, Gaforio JJ. External quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:379-387.
- Álvarez V, Maciá M, Perich C, Ribera C, Ricós C. Los programas de control de calidad entre laboratorios como base para la transferibilidad de los resultados. *Quim Clin* 1989;8:323-327.
- Amann RP. Evaluating testis function non-invasively: how epidemiologist-andrologist teams might better approach this task. *Human Reprod* 2010;25:22-28.
- American Fertility Society. Guidelines for human andrology laboratories. *Fertil Steril* 1992;58:11-16.
- 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.
- Andersson AM, Jørgensen N, Main KM, Toppari J, Raipert-De Meyts E, Leffers H, Juul A, Jensen TK, Skakkebaek NE. Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial 'tipping point'. *Int J Androl* 2008;31:74-80.
- Andersson AM, Petersen JH, Jørgensen N, Jensen TK, Skakkebaek NE. Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of

- infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2873-2879.
- Andrew E, Anis A, Chamers T, Cho M, Clarke M, Felson D, Gotzsche P, Greene R, Jadad A et al. A proposal for structured reporting of randomized controlled trials. The Standards of Reporting Trials Group. *JAMA* 1994;272:1926-1931.
- Aneck-Hahn NH, Schulenburg GW, Bornman MS, Farias P, de Jager C. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *J Androl* 2007;28:423-434.
- Appell RA, Evans PR, Blandy JP. The effect of temperature on the motility and viability of sperm. *Br J Urol* 1977;49:751-756.
- Areia M, Soares M, Dinis-Ribeiro M. Quality reporting of endoscopic diagnostic studies in gastrointestinal journals: where do we stand on the use of the STARD and CONSORT statements? *Endoscopy* 2010;42:138-147.
- Arksey H, O'Malley L. Scoping studies: Towards a methodological framework. *Int J Soc Res Methodol* 2005;8:19-32.
- Attaman JA, Toth TL, Furtado J, Campos H, Hauser R, Chavarro JE. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Hum Reprod* 2012;27:1466-1474.
- Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2710-17.
- Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, et al. Intra- and inter-individuality variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000;15:2360-2368.

- Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. *Fédération Française des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. Hum Reprod* 1997;12:740-745.
- Avendaño C, Mata A, Sanchez Sarmiento CA, Doncel GF. Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2012;97:39-45.
- Avivar C, Duran C, Molina MA, Castilla JA, Olea N, Fernandez MF. La exposición a plaguicidas se asocia con la disminución del recuento espermático. *Rev Lab Clin* 2010;3(1):4-11.
- Ayotte P, Giroux S, Dewailly E, Hernández Avila M, Farias P, Danis R. DDT spraying for malaria control and reproductive function in Mexican men. *Epidemiol* 2001;12(3):366-367.
- Balasz J. Ageing and infertility: an overview. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(12):855-860.
- Balasubramanian SP, Wiener M, Alshameeri Z, Tiruvoipati R, Elbourne D, Reed MW. Standard of reporting of randomized controlled trials in general surgery: can we do better? *Annals of surgery* 2006;244:663-667.
- Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2005;84:662-671.
- Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod* 2011;26:3207-3212.
- Barroso G, Mercan R, Ozgur K. Intra- and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen

- preparation, staining techniques and manual versus computerized analysis. *Hum Reprod* 1999;14:2036-2040.
- Bath FJ, Owen VE, Bath PM. Quality of full and final publications reporting acute stroke trials: a systematic review. *Stroke* 1998;29:2203-2210.
- Begg C, Cho M, Eastwood S, Horton R, Moher D, Olkin I, et al. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *JAMA* 1996;276:637-639.
- Benson K, Hartz AJ. A comparison of observational studies and randomized, controlled trials. *N Engl J Med* 2000;342:1878-1886.
- 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.
- Björndahl L, Barratt CL, Fraser LR, Kvist U, Mortimer D. ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. *Hum Reprod* 2002;17:1299-1305.
- Björndahl L, Kvist U. Basic semen analysis courses: experience in Scandinavia. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E (eds). *Modern ART in the 2000s-Andrology in the Nineties*. London, UK: The Parthenon Publishing Group, 1998,91-102.
- Björndahl L, Mortimer D, Barratt, C. L. R, Castilla, J. A, Menkveld R, Kvist U et al. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*. Cambridge University Press; 2010.
- 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;352:1172-1177.

- Bonde JP, Toft G, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Giwercman A, Spano M, et al. Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect* 2008;116:269-277.
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwing LM et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem* 2003;49:7-18.
- Botella B, Crespo J, Rivas A, et al. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 2004;96:34-40.
- Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl* 2010;12:83-90.
- Bracken MB, Eskenazi B, Sachse K, McSharry JE, Hellenbrand K, Leo-Summers L. Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. *Fertil Steril* 1990;53:315-322.
- Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004a;25:635-644.
- Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004b;25:645-656.
- Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeny LA, de Gier RP, Roeleveld N. Risk factors for hypospadias. *Eur J Pediatr* 2007;166:671-678.
- Buffum J. Pharmacosexology: the effects of drugs on sexual function a review. *J Psychoactive Drugs* 1982;14:5-44.
- Bujan L, Daudin M, Charlet JP, Thonneau P, Mieusset R. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum Reprod* 2000;15:1355-1357.

- Burnett D. Understanding accreditation in laboratory medicine. London: ACB Venture publications; 1998.
- Burnett L, Mackay M, Costaganna G, Shaw W. A model quality system for total quality management in the pathology laboratory. Clin Biochem Revs 1993;14 47-51.
- Bush B, Bennett AH, Snow JT. Polychlorobiphenyl congeners, p,p'-DDE, and sperm function in humans. Arch Environ Contam Toxicol 1986;15:333-341.
- Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. Epidemiol Rev 2007;29:1-5.
- Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. Asian J Androl 2010;12(4):480-489.
- Calogero A, Polosa R, Perdichizzi A, Guarino F, La Vignera S, Scarfia A, et al. Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. Reprod Biomed Online 2009;19:564-571.
- Callaway LK, O'Callaghan MJ, McIntyre HD. Barriers to addressing overweight and obesity before conception. Med J Aust. 2009;191:425-428.
- Campbell MK, Elbourne DR, Altman DG; CONSORT group. CONSORT statement: extension to cluster randomised trials. BMJ. 2004;328:702-708.
- Campoy C, Jimenez M, Olea-Serrano MF, Moreno Frías M, Cañabate F, Olea N, et al. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. Early Hum Dev 2001;65:183-90.
- Capili B, Anastasi JK, Geiger JN. Adverse event reporting in acupuncture clinical trials focusing on pain. Clin J Pain 2010;26:43-48.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ 1992;305:609-613.

- Carlsen E, Holm-Petersen J, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004;82:358-366.
- Carreño J, Rivas A, Granada A, et al. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 2007;103:55-61.
- Carson, R. *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin Company; 1962.
- Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, González-Varea C, Gonzalvo MC, Martínez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod* 2006;21:847-851.
- Castilla JA, Morancho-Zaragoza J, Aguilar J, Prats-Gimenez R, Gonzalvo MC, Fernández-Pardo E, et al. Quality specifications for seminal parameters based on the state of the art. *Hum Reprod* 2005;20:2573-2578.
- Celik-Ozenci C, Tasatargil A, Tekcan M, Sati L, Gungor E, Isbir M, et al. Effect of abamectin exposure on semen parameters indicative of reduced sperm maturity: a study on farmworkers in Antalya (Turkey). *Andrologia* 2012;44:388-395.
- Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Ibarluzea J, et al. Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 2006;62:1917-1924.
- Charlier CJ, Foidart JM. Comparative study of dichlorodiphenyldichloroethylene in blood and semen of two young male populations: lack of relationship to infertility, but evidence of high exposure of the mothers. *Reprod Toxicol* 2005;20:215-220.
- Chavarro JE, Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, Cutillas-Tolín A, López-Espín JJ, Torres-Cantero AM. Trans fatty acid intake is inversely related to total sperm count in young healthy men. *Hum Reprod* 2014;29:429-440.

- Chen Z, Godfrey-Bailey L, Schiff I, Hauser R. Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: the Massachusetts General Hospital experience. *J Exp Clin Assist Reprod* 2004;1:2.
- Chiu YH, Afeiche MC, Gaskins AJ, Williams PL, Mendiola J, Jørgensen N, et al. Sugar-sweetened beverage intake in relation to semen quality and reproductive hormone levels in young men. *Hum Reprod* 2014;29:1575-1584.
- Chowers MY, Gottesman BS, Leibovici L, Pielmeier U, Andreassen S, Paul M. Reporting of adverse events in randomized controlled trials of highly active antiretroviral therapy: systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:239-250.
- Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U. Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl* 2008;31(2):241-248.
- Clavero A, Gonzalvo MC, Serrano M, Orozco I, Mantilla A, Rosales A, et al. "Control de calidad en el análisis de semen" en *Manual para el análisis básico de semen: Una guía práctica*. México: editorial Prado; 2014. p. 99-118.
- Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, et al. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology*. 2008 Mar;71(3):490-4.
- Cohn BA, Overstreet JW, Fogel RJ, Brazil CK, Baird DD, Cirillo PM. Epidemiologic studies of human semen quality: considerations for study design. *Am J Epidemiol* 2002; 155(7):664-671.
- 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.



- Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod* 1999;14:765-769.
- Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod* 1993;8:1251-1258.
- Coppus SF, van der Veen F, Bossuyt PM, Mol BW. Quality of reporting of test accuracy studies in reproductive medicine: impact of the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) initiative. *Am J Epidemiol* 2009;170:559-565.
- Correa-Pérez JR, Fernández-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrostermia. *Fertil Steril* 2004;81:1148-1150.
- Dain L, Auslander R, Dirnfeld M. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2011;95:1-8.
- Dallinga JW, Moonen EJ, Dumoulin JC, Evers JL, Geraedts JP, Kleijnans JC. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Hum Reprod* 2002;17:1973-1979.
- Dalvie MA, Myers JE, Thompson ML, Robins TG, Dyer S, Riebow J, 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;96:1-8.
- Dama MS, Bhat MN. Mobile phones affect multiple sperm quality traits: a meta-analysis. *F1000Res* 2013;12;2:40.
- Daniels M. Scientific appraisal of new drugs in tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 1950;61:751-756.

- Daniluk JC, Koert E, Cheung A. Childless women's knowledge of fertility and assisted human reproduction: identifying the gaps. *Fertil Steril* 2012;97:420-426.
- Davidoff F, Batalden P, Stevens D, Ogrinc G, Mooney S. Publication guidelines for quality improvement in health care: evolution of the SQUIRE project. *Qual Saf Health Care* 2008;17(1):3-9.
- Dawson B, Trapp RG. *Basic Clinical Biostatistics*. Lange Medical Books/Mc/McGraw-Hill; 2004.
- De Fleurian G, Perrin J, Ecochard R, Dantony E, Lanteaume A, Achard V et al. Occupational exposures obtained by questionnaire in clinical practice and their association with semen quality. *J Androl* 2009;30:566-579.
- De Jager C, Aneck-Hahn NH, Bornman MS, Farias P, Leter G, Eleuteri P, et al. Sperm chromatin integrity in DDT-exposed young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *Hum Reprod* 2009;24:2429-2438.
- De Jager C, Farias P, Barraza-Villarreal A, Avila MH, Ayotte P, Dewailly E, et al. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study. *J Androl* 2006;27:16-27.
- De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004;82:57-65.
- De los Santos MJ, Ruiz A. Protocols for tracking and witnessing samples and patients in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2013;100:1499-1502.
- De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS ONE* 2009;4:e6446.
- De Vries TW, van Roon EN. Low quality of reporting adverse drug reactions in paediatric randomised controlled trials. *Arch Dis Child*. 2010;95:1023-1026.

- Des Jarlais DC, Lyles C, Crepaz N; TREND Group. Improving the reporting quality of nonrandomized evaluations of behavioral and public health interventions: the TREND statement. *Am J Public Health* 2004;94:361-366.
- Desai NR, Kesari KK, Agarwal A. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:114.
- Dhooge W, van Larebeke N, Comhaire F, Kaufman JM. 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):435-443.
- Dissanayake D, Wijesinghe P, Ratnasooriya W, Wimalasena S. Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. *J Hum Reprod Sci* 2010;3:124-128.
- Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. *World J Urol.* 2003;21:341-345.
- Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, et al. Leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl* 2013;15:622-625.
- Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, et al. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 2003;14:269-277.
- Eaton M, Schenker M, Whorton MD, Samuels S, Perkins C, Overstreet J. Seven-year follow-up of workers exposed to 1,2-dibromo-3-chloropropane. *J Occup Med* 1986;28:1145-1150.
- Egeland GM, Sweeney MH, Fingerhut MA, Wille KK, Schnorr TM, Halperin WE. Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin. *Am J Epidemiol* 1994;139:272-281.

- Egnatz DG, Ott MG, Townsend JC, Olson RD, Johns DB. DBCP and testicular effects in chemical workers: an epidemiological survey in Midland, Michigan. *J Occup Med* 1980;22:727-732.
- Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Buck Louis GM. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod* 2014;29:193-200.
- Elzanaty S. Time-to-ejaculation and the quality of semen produced by masturbation at a clinic. *J Urol* 2008;71:883-888.
- Elzanaty S, Malm J. Comparison of semen parameters in samples collected by masturbation at a clinic and at home. *Fertil Steril* 2008;89:1718-1722.
- Emmett EA, Maroni M, Jefferys J, Schmith J, Levin BK, Alvares A. Studies of transformer repair workers exposed to PCBs: II. Results of clinical laboratory investigations. *Am J Ind Med* 1988;14:47-62.
- Eslamian G, Amirjannati N, Rashidkhani B, Sadeghi MR, Hekmatdoost A. Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: a case-control study. *Hum Reprod* 2012;27:3328-3336.
- Ethgen M, Boutron L, Steg PG, Roy C, Ravaud P. Quality of reporting internal and external validity data from randomized controlled trials evaluating stents for percutaneous coronary intervention. *BMC Med Res Methodol* 2009;9:24.
- European Union 2004 Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, L 102/48.
- Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R et al. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. *Hum Reprod* 2012;27:3140-3149.

- Farrokhyar F, Chu R, Whitlock R, Thabane L. A systematic review of the quality of publications reporting coronary artery bypass grafting trials. *Can J Surg.* 2007;50:266-277.
- Fenster L, Katz DF, Wyrobek AJ, Pieper C, Rempel DM, Oman D, Swan SH. Effects of psychological stress on human semen quality. *J Androl* 1997;18:194-202.
- Fernandez MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, Toppari J, et al. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl* 2012;35:1-10.
- Fernández MF, Olea N. Endocrine disruptors. Is there sufficient evidence to act?. *Gac Sanit* 2014;28(2):93-95.
- Fernández MF, Pedraza V, Olea N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer J* 1998;11:11-17.
- Fisch H, Braun SR. Trends in global semen parameter values. *Asian J Androl* 2013;15:169-173.
- Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 2004;127:305-315.
- Foster WG, Jarrell JF, Younglai EV, Wade MG, Arnold DL, Jordan S. An overview of some reproductive toxicology studies conducted at Health Canada. *Toxicol Ind Health* 1996;12(3-4):447-459.
- Franken DR, Dada OA. The establishment of sperm morphology satellite training laboratories in Africa. *Andrologia* 2005;37:57-60.
- Franken DR, Dada OA. Does training assist medical laboratory scientists with better evaluation of sperm morphology? *Afr J Reprod Health* 2007;11:107-112.

Franken DR, Kruger TF. Lessons learned from a sperm morphology quality control programme. *Andrologia* 2006;38:225-229.

Franken DR, Menkveld R, Kruger TF, Sekadde-Kigonde C, Lombard C. Monitoring technologist reading skills in a sperm morphology quality control program. *Fertil Steril* 2003;79:1637-1643.

Franken DR, Smith M, Menkveld R, Kruger TF, Sekadde-Kigonde C, Mbizvo M and Akande EO. The development of a continuous quality control (CQS) program for strict sperm morphology among sub-Sahara African laboratories. *Hum Reprod* 2000;5:667-671.

Fraser CG. *Biological Variation: From Principles to Practice*. 1.<sup>a</sup> ed. AACC Press, Washington (USA). 2001.

Fraser CG, Hyltoft-Petersen P, Ricós C, Haeckel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems in clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:311-317.

Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2009;90(1):97-103.

Fronczak CM, Kim ED, Barqawi AB. The insults of illicit drug use on male fertility. *J Androl* 2012;33:515-528.

Fuentes A, Muñoz A, Barnhart K, Argüello B, Díaz M, Pommer R. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 2010;93:89-95.

Fuentes X, Panadero MT. Control interno de la calidad. En: Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. *Bioquímica clínica y patología molecular*. Volumen I. 2<sup>a</sup> ed. Barcelona: Editorial Reverte; 1998;p.515-525.

- Galera J, Lahoz R, Roig F. The Reporting of Observational Studies: Analysis using the STROBE Statement. *Rev Esp Salud Pública* 2011;85:583-591.
- Gao J, Gao ES, Yang Q, Walker M, Wu JQ, Zhou WJ, Wen SW. Semen quality in a residential, geographic and age representative sample of healthy Chinese men. *Hum Reprod* 2007; 22:477-484.
- Gaskins AJ, Mendiola J, Afeiche M, Jørgensen N, Swan SH, Chavarro JE. Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men. *Br J Sports Med* 2013. Published Online.
- Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53:35-40.
- Geoffroy-Siraudin C, Loundou AD, Romain F, Achard V, Courbière B, Perrard MH, et al. Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. *Asian J Androl* 2012;14:584-590.
- 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;114:1348-1353.
- Giwercman A, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Jönsson BA, Pedersen HS, Ludwicki, et al; INUENDO. Androgen receptor gene CAG repeat length as a modifier of the association between persistent organohalogen pollutant exposure markers and semen characteristics. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:391-401.
- Glass RI, Lyness RN, Mengle DC, Powell KE, Kahn E. Sperm count depression in pesticide applicators exposed to dibromochloropropane. *Am J Epidemiol* 1979;109:346-351.
- Godlee F, Jefferson T. Peer review in health sciences. London: BMJ Books; 2003.

- Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol* 1989;142:743-745.
- González E, Castilla JA, Magán R, Ortiz A, Ortiz-Galisteo JR, Aguilar J, Peralta L, Maldonado V, Mendoza N, Fontes J et al. Assisted reproduction consent forms and linguistic readability. *Rev. Iberoam. Fert Rep Hum* 2004;21:69-74.
- Gormley KL, Teather KL. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;54:330-338.
- Gotzsche PC, Harden A. Searching for non-randomized studies. Draft chapter 3. Cochrane Non-Randomized Studies Methods Group, 2002. Disponible en: <http://www.cochrane.dk/nrsmg>.
- Greil AL. Infertility and psychological distress: a critical review of the literature. *Soc Sci Med* 1997;45:1679-1704.
- Grimes a, Schulz F. Bias and causal associations in observational research. *THE LANCET* 2002;359:248-252.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-1393.
- Guzick DS, Swan S. The decline of infertility: apparent or real? *Fertil Steril* 2006;86:524-527.
- Haeckel R. Evaluation methods in laboratory medicine. Weinheim, Germany: VCH, 1993.
- Hagmar L, Björk J, Sjödin A, Bergman A, Erfurth EM. Plasma levels of persistent organohalogenes and hormone levels in adult male humans. *Arch Environ Health* 2001;56:138-143.



- Hammarberg K, Setter T, Norman RJ, Holden CA, Michelmore J, Johnson L. Knowledge about factors that influence fertility among Australians of reproductive age: a population-based survey. *Fertil Steril* 2013;99:502-507.
- Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008;90:2222-2225.
- Handelsman DJ. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. *Hum Reprod* 1997;12:2701-2705.
- Handelsman DJ. Optimal power transformations for analysis of sperm concentration and other semen variables. *J Androl* 2002;23:629-634.
- Hauser R. The environment and male fertility: recent research on emerging chemicals and semen quality. *Semin Reprod Med* 2006;24:156-167.
- Hauser R. Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility. *Int J Androl* 2008; 31:112-117.
- Hauser R, Altshul L, Chen Z, Ryan L, Overstreet J, Schiff I et al. Environmental organochlorines and semen quality: results of a pilot study. *Environ Health Perspect* 2002;110:229-233.
- Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect* 2003;111:1505-1511.
- Hawcroft D, Hector T. *Clinical specimens (Analytical chemistry by open learning)*. Chichester, UK: John Wiley y Sons; 1987.
- Henriksen GL, Michalek JE, Swaby JA, Rahe AJ. Serum dioxin, testosterone, and gonadotropins in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiol* 1996;7:352-357.

- Herdan A, Roth R, Grass D, Klimek M, Will S, Schauf B, Rossaint R, Heesen M. Improvement of quality of reporting in randomised controlled trials to prevent hypotension after spinal anaesthesia for caesarean section. *Gynecol Surg* 2011;8:121-127.
- Hirst RA, Lambert DG, Notcutt WG. Pharmacology and potential therapeutic uses of cannabis. *Br J Anaesth* 1998;81:77-84.
- Hjollund NH, Bonde JP, Henriksen TB, Giwercman A, Olsen J; Danish First Pregnancy Planner Study Team. Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiology* 2004;15:21-27.
- Hjollund NH, Jensen TK, Bonde JP, Henriksen TB, Andersson AM, Kolstad HA et al. Distress and reduced fertility: a follow-up study of first-pregnancy planners. *Fertil Steril* 1999;72:47-53.
- Hosie S, Loff S, Witt K, Niessen K, Waag KL. Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes? *Eur J Pediatr Surg* 2000;10:304-309.
- Huang JY, Al-Fozan H, Tan SL, Tulandi T. Internet use by patients seeking infertility treatment. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83:75-76.
- Ioannidis JP, Evans SJ, Gøtzsche PC, O'Neill RT, Altman DG, Schulz K, et al; CONSORT Group. Better reporting of harms in randomized trials: an extension of the CONSORT statement. *Ann Intern Med* 2004;141:781-788.
- International Standards Organization. ISO-15189. Medical laboratories: particular requirements for quality and competence. Geneva: International Organization for Standardization; 2003.
- ISCME. International Steering Committee of Medical Editors, *British Medical Journal*, 1978;1:1134.

- ISCME. International Steering Committee of Medical Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. International Steering Committee of Medical Editors. *Br Med J* 1979;1: 532-535.
- Sheynkin Y, Welliver R, Winer A, Hajimirzaee F, Ahn H, Lee K. Protection from scrotal hyperthermia in laptop computer users. *Fertil Steril* 2011;95:647–651.
- 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; 15:1958-1961.
- Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl* 2007;31:499-507.
- Jequier AM, Ukombe EB: Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 1983;55:434-436.
- Jensen CE, Wiswedel K, McLoughlin J, van der Spuy Z. Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertil Steril* 1995;64:1189-1196.
- Jensen TK, Bonde JP, Joffe M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med (Lond)* 2006a;5688:544-553.
- Jensen TK, Joffe M, Scheike T, Skytthe A, Gaist D, Petersen I, et al. Early exposure to smoking and future fecundity among Danish twins. *Int J Androl* 2006b;29:603-613.
- 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* 2004a; 82:863-870.
- 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* 2004b;159:49-58.

Jensen TK, Hjollund NH, Henriksen TB, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A et al. Does moderate alcohol consumption affect fertility? Follow up study among couples planning first pregnancy. *BMJ* 1998;317:505-510.

Jensen TK, Jacobsen R, Christensen K, Nielsen NC, Bostofte E. Good semen quality and life expectancy: a cohort study of 43,277 men. *Am J Epidemiol* 2009;170:559-565.

Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jørgensen N. Caffeine intake and semen quality in a population of 2554 young Danish men. *Am J Epidemiol* 2010;171:883-891.

Jensen TK, Swan S, Jørgensen N, Toppari J, Redmon B, Punab M et al. Alcohol and male reproductive health: a cross-sectional study of 8344 healthy men from Europe and the USA. *Hum Reprod* 2014;29:1801-1809.

Jensen MS, Toft G, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J. Cryptorchidism according to maternal gestational smoking. *Epidemiology* 2007;18:220-225.

Jeyendran RS. *Interpretation of Semen Analysis Results*, 1st edn, 2000. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Joensen UN, Bossi R, Leffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect* 2009;117:923-927.

Joffe M. Semen quality analysis and the idea of normal fertility. *Asian J Androl* 2010a;12:79-82.

Joffe M. What has happened to human fertility? *Hum Reprod* 2010b;25:295-307.

- Joffe M, Key J, Best N, Jensen TK, Keiding N. The role of biological fertility in predicting family size. *Hum Reprod* 2009;24:199-2006.
- Joffe M, Paranjothy S, Fielder H, Lyons R, Palmer S. Use of time to pregnancy in environmental epidemiology and surveillance. *J Public Health* 2008;30:178-185.
- Johnson L, Barnard JJ, Rodriguez L, Smith EC, Swerdloff RS, Wang XH, Wang C. Ethnic differences in testicular structure and spermatogenic potential may predispose testes of Asian men to a heightened sensitivity to steroidal contraceptives. *J Androl* 1998;19:348-357.
- Johnson ZK, Siddiqui MA, Azuara-Blanco A. The quality of reporting of diagnostic accuracy studies of optical coherence tomography in glaucoma. *Ophthalmology* 2007;114:1607-1612.
- Jonsson BA, Rylander L, Lindh C, Rignell-Hydbom A, Giwercman A, Toft G, 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, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001;16:1012-1019.
- Jørgensen N, Auger J, Giwercman A, Irvine DS, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Le Bon C, MacDonald E, Pekuri AM et al. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int J Androl* 1997;20:201-208.
- Jørgensen N, Carlsen E, Neramo I, Punab M, Souminen J, Andersen AG, et al. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002;17:2199-2208.

- Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, et al. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl* 2011;34:37-48.
- Juul A, Almstrup K, Andersson AM, Jensen TK, Jørgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. Possible fetal determinants of male infertility. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:553-562.
- Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, Taki K, Saito I, Wang H et al. A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J Occup Health* 2004;46:109-118.
- Keel BA, Quinn P, Schmidt CF Jr, Serafy NT Jr, Serafy NT, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Hum Reprod* 2000;15:680-686.
- Keel BA, Sternbridge TW, Pidenda G, Serafy NT. Lack of standardisation in performance of the semen analysis among laboratories in the United States. *Fertil Steril* 2002;78:603-608.
- Kehl S, Weigel M, Müller D, Gentili M, Hornemann A, Sütterlin M. HIV-infection and modern antiretroviral therapy impair sperm quality. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284:229-233.
- 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.
- Kenny DJ, Conway RM, Johnston DH. The development of ISO 9002 quality management standards for Canadian dental practices. *J Can Dent Assoc* 1999;65:105-108.
- Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003;49:83-94.

- Key J, Best N, Joffe M, Jensen TK, Keiding N. Methodological issues in analyzing time trends in biologic fertility: protection bias. *Am J Epidemiol* 2009;169:285-293.
- Khan FH, Ganesan P, Kumar S. Y Chromosome microdeletion and altered sperm quality in human males with high concentration of seminal hexachlorocyclohexane (HCH). *Chemosphere* 2010;80:972-977.
- Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001;75:237-248.
- Klonoff-Cohen H, Bleha J, Lam-Kruglick P. A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum Reprod* 2002;17:1746-1754.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. *N Engl J Med* 1974;290:872-874.
- Koloszár S, Fejes I, Závaczki Z, Daru J, Szöllosi J, Pál A. Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males. *Arch Androl* 2005;51:299-304.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006;27:450-452.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-117.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, et al. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118-1123.

- Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod update* 2004;10(4):327-339.
- Kvist U and Bjorndahl L. *ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis*. Oxford (UK): Oxford University Press; 2002.
- Ladd BO, McCrady BS, Manuel JK, Campbell W. Improving the quality of reporting alcohol outcome studies: effects of the CONSORT statement. *Addict Behav*. 2010;35:660-666.
- Lantz GD, Cunningham GR, Huckins C, Lipshultz LI. Recovery from severe oligospermia after exposure to dibromochloropropane. *Fertil Steril* 1981;35:46-53.
- Larsen SB, Spanò M, Giwercman A, Bonde JP. Semen quality and sex hormones among organic and traditional Danish farmers. *Occup Environ Med* 1999;56:139-144.
- Laven JS, Haverkorn MJ, Bots RS. Influence of occupation and living habits on semen quality in men (scrotal insulation and semen quality). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988;29:137-141.
- Lazaros L, Xita N, Kaponis A, Hatzi E, Plachouras N, Sofikitis N, et al. The association of aromatase (CYP19) gene variants with sperm concentration and motility. *Asian J Androl* 2011;13:292-297.
- Legro RS, Wu X, Barnhart KT, Farquhar C, Fauser BC, Mol B; Harbin Consensus Conference Workshop Group. Improving the Reporting of Clinical Trials of Infertility Treatments (IMPRINT): modifying the CONSORT statement. *Hum Reprod* 2014;29(10):2075-2082.
- Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003;79:292-300.



- Lerda D, Rizzi R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat Res* 1991;262:47-50.
- Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Bossuyt PMM, Blankenstein MA, et al. Reproducibility and reliability of repeated semen analyses in male partners of subfertile couples. *Fertil Steril* 2010;94:2631-2635.
- Levac D, Colquoun H, O'Brien KK. Scoping studies: advancing the methodology. *Implement Sci* 2010;5:69-77.
- Li Y, Lin H, Ma M, Li L, Cai M, Zhou N et al. Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China. *Hum Reprod* 2009;24:459-469.
- Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011;95:116-123.
- Li YF, Cal DJ, Singh A. Technical hexachlorocyclohexane use trends in China and their impact on the environment. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998; 35:688-697.
- Licht RS, Handel L, Sigman M. Site of semen collection and its effect on semen analysis parameters. *Fertil Steril* 2008;89:395-397.
- Linschooten JO, Laubenthal J, Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D, Sipinen VE et al. Incomplete protection of genetic integrity of mature spermatozoa against oxidative stress. *Reprod Toxicol*. 2011;32:106-111.
- Lipshultz LI, Ross CE, Whorton D, Milby T, Smith R, Joyner RE.. Dibromochloropropane and its effect on testicular function in man. *J Urol* 1980;124:464-468.

- Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, et al. Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit Contam* 2007;24:95-102.
- Lumbreras B, Jarrín I, Hernández I. Evaluation of the research methodology in genetic, molecular and proteomic tests. *Gac Sanit* 2006;20:368-374.
- Lumbreras-Lacarra B, Ramos-Rincón JM, Hernández-Aguado I. Methodology in diagnostic laboratory test reserach in clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin Chem* 2004;50:530-536.
- Mabeck LM, Jensen MS, Toft G, Thulstrup M, Andersson M, Jensen TK, et al. Fecundability according to male serum inhibin B, a prospective study among first pregnancy planners. *Hum Reprod* 2005;20:2909-2915.
- MacPherson H, White A, Cummings M, Jobst K, Rose K, Niemtzw R. Standards for reporting interventions in controlled trials of acupuncture: the STRICTA recommendations. *Complement Ther Med* 2001;9:246-249.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005;20:208-215.
- Martini AC, Molina RI, Estofán D, Senestrari D, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil Steril* 2004;82:374-377.
- Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, Ruiz RD. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertil Steril* 2010;94:1739-1743.
- Marshburn PB, Giddings A, Causby S, Matthews ML, Usadi RS, Steuerwald N, Hurst BS. Influence of ejaculatory abstinence on seminal total antioxidant capacity and sperm membrane lipid peroxidation. *Fertil Steril* 2014;102:705-710.

- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* 2005;93:387-391.
- Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, et al. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 2010;30:532-539.
- Mendiola J, Torres-Cantero AM, Vioque J, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, et al. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril* 2010;93:1128-1133.
- Mendiola J, Meeker JD, Jørgensen N, Andersson AM, Liu F, Calafat AM et al. Urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: pooled analysis of fertile and infertile men. *J Androl* 2012;33:488-498.
- Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Juarez N, Martínez-García MJ et al. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ Health* 2011;10:6.
- Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, Bernabeu R. Food intake and its relationship with semen quality: a case-control study. *Fertil Steril* 2009;91:812-818.
- Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, Sarabia-Cos L, López-Espín JJ, Vivero et al. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology* 2013;1:408-413.
- Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen 2010; 12: 47-58. Menkveld R. *Asian Journal of Andrology* 2010;12:47-58.

- Merzenich H, Zeeb H, Blettner M. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health* 2010;10:24.
- Messaros BM, Rossano MG, Liu G, Diamond MP, Friderici K, Nummy-Jernigan K, et al. Negative effects of serum p,p'-DDE on sperm parameters and modification by genetic polymorphisms. *Environ Res* 2009;109:457-464.
- Milby TH, Whorton D. Epidemiological assessment of occupationally related, chemically induced sperm count suppression. *J Occup Med* 1980;22:77-82.
- Miller WR, Sharpe RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related cancer* 1998;5:69-96.
- Mínguez-Alarcón L, Chavarro JE, Mendiola J, Gaskins AJ, Torres-Cantero AM. Physical activity is not related to semen quality in young healthy men. *Fertil Steril*. 2014. Published Online.
- Moberg-Mogren E, Nelson DL. Evaluating the quality of reporting occupational therapy randomized controlled trials by expanding the CONSORT criteria. *Am J Occup Ther* 2006;60:226-235.
- Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. *Quality of Reporting of Meta-analyses*. *Lancet* 1999;354:1896-900.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Br Med J* 2009;339:2535.
- Moher D, Schulz KF, Altman D; CONSORT Group (Consolidated Standards of Reporting Trials). The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *JAMA* 2001;285:1987-1991.

- Moher D, Schulz KF, Simera I, Altman DG. Guidance for developers of health research reporting guidelines. *PLoS Med* 2010;7:e1000217.
- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 2001;286:1195-200.
- Møller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *Br Med J* 1999; 318:559-562.
- Monoski M, Nudell Dm, Lipshultz LI. Effects of medica therapy, alcohol, and smoking on male fertility. *Contemporary Urology* 2002;2:57-63.
- Montané E, Vallano A, Vidal X, Aguilera C, Laporte JR. Reporting randomised clinical trials of analgesics after traumatic or orthopaedic surgery is inadequate: a systematic review. *BMC Clin Pharmacol* 2010;10:2.
- Montgomery AA, Astin MP, Peters TJ. Reporting of factorial trials of complex interventions in community settings: a systematic review. *Trials* 2011;12:179.
- Morgan DJ, Muller CH, Murataeva NA, Davis BJ, Mackie K.  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) attenuates mouse sperm motility and male fecundity. *Br J Pharmacol* 2012;165:2575-2583.
- Mortimer D, Barratt CL, Björndahl L, de Jager C, Jequier AM, Muller CH. What should it take to describe a substance or product as 'sperm-safe'. *Hum Reprod Update* 2013;19:1-45.
- Mortimer D, Lenton EA. Distribution of sperm counts in suspected infertile men. *J Reprod Fert* 1983;68:91-96.
- Multigner L, Kadhel P, Pascal M, Huc-Terki F, Kercret H, Massart C, et al. Parallel assessment of male reproductive function in workers and wild rats exposed to pesticides in banana plantations in Guadeloupe. *Environ Health* 2008;7:40.

- Murature DA, Tang SY, Steinhardt G, Dougherty RC. Phthalate esters and semen quality parameters. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1987;14:473-477.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Internal quality control testing: principles and definitions; approved guideline, NCCLS. Document C24-A. 1991.
- Nef S, Shipman T, Parada LF. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev Biol* 2000; 224:354-361.
- NIEHS. Estrogens in the environment I. Conference proceedings. National Institute Environment and Health Sciences. North Carolina, 1997
- 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.p.228-313.
- Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril* 1990;54:308-314.
- Olea N, Olea-Serrano MF. Estrogens and the environment. *Cancer Prevention J* 1996;5:1-6.
- Olea N, Barba A, Lardelli P, et al. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol Ind Health* 1999;15:151-158.
- Olea N, Fernandez MF. Chemicals in the environment and human male fertility. *Occup Environ Med* 2007;64:430-431.
- Olea N, Fernandez MF, Araque P, et al. Perspectives on endocrine disruption. *Gac Sanit* 2002;16:250-256.
- Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1768-1776.

- Olsen GW, Lanham JM, Bodner KM, Hylton DB, Bond GG. Determinants of spermatogenesis recovery among workers exposed to 1,2-dibromo-3-chloropropane. *J Occup Med* 1990;32:979-984.
- Olshan AF, Perreault SD, Bradley L, Buus RM, Strader LF, Jeffay SC, et al. The healthy men study: design and recruitment considerations for environmental epidemiologic studies in male reproductive health. *Fertil Steril* 2007;87:554-564.
- OMS, 2013: Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, et al., editor. UNEP/WHO. State of the science of endocrine disrupting chemicals-2013. [consultado el 04/10/2013]. Disponible en: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en>.
- Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Mathew TC. Indications of the mechanism involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract* 2008;17:108-116.
- Pacey AA. Quality assurance and quality control in the laboratory andrology. *Asian J Androl* 2010;12:21-25.
- Pacey AA, Povey AC, Clyma JA, McNamee R, Moore HD, Baillie H, Cherry NM; Modifiable and non-modifiable risk factors for poor sperm morphology. Participating Centres of Chaps-UK. *Hum Reprod* 2014;29:1629-1636.
- Palacios ER, Clavero A, Gonzalvo MC, Rosales A, Mozas J, Martínez L, et al. Acceptable variability in external quality assessment programmes for basic semen analysis. *Hum Reprod* 2012;27:314-322.
- Palmer JR, Herbst AL, Noller KL, Boggs DA, Troisi R, Titus-Ernstoff L, et al. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ Health* 2009;8:37.
- Pant N, Kumar R, Mathur N, Srivastava SP, Saxena DK, Gujrati VR. Chlorinated pesticide concentration in semen of fertile and infertile men and correlation with sperm quality. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:135-139.

- Pascualotto FF, Locambo CV, Athayde KS, Arap S. Measuring male infertility: epidemiological aspects. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2003;58:173-178.
- Parazzini F, Marchini M, Luchini L, Tozzi L, Mezzopane R, Fedele L. Tight underpants and trousers and risk of dyspermia. *Int J Androl* 1995;18:137-140.
- Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 1997;100:831-834.
- Peck JD, Leviton A, Cowan LD. A review of the epidemiologic evidence concerning the reproductive health effects of caffeine consumption: a 2000-2009 update. *Food Chem Toxicol* 2010;48:2549-2576.
- Peng BC, Tomashefsky P, Nagler HM. The cofactor effect: varicocele and infertility. *Fertil Steril* 1990;54:143-148.
- Petersen PM, Skakkebaek NE, Giwercman, A. Gonadal function in men with testicular cancer: biological and clinical aspects. *APMIS* 1998; 106:24-36.
- Plint AC, Moher D, Morrison A, Schulz K, Altman DG, Hill C, Gaboury I. Does the CONSORT checklist improve the quality of reports of randomised controlled trials? A systematic review. *Med J Aust* 2006;185:263-267.
- Pocock SJ, Collier TJ, Dandreo KJ, de Stavola BL, Goldman MB, Kalish LA et al. Issues in the reporting of epidemiological studies: a survey of recent practice. *BMJ* 2004;329:883.
- Porta M. *A dictionary of epidemiology* 5Ed. Oxford University Press, 2008.
- 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;16:257-266.



- 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;20:233-238.
- Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fitó N, Llop S, et al. Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience. *Environ Int* 2008;34:546-61.
- Potashnik G. A four-year reassessment of workers with dibromochloropropane-induced testicular dysfunction. *Andrologia* 1983;15:164-170.
- Potashnik G, Porath A. Dibromochloropropane (DBCP): a 17-year reassessment of testicular function and reproductive performance. *J Occup Environ Med* 1995;37:1287-1292.
- Potashnik G, Yanai-Inbar I. Dibromochloropropane (DBCP): an 8-year reevaluation of testicular function and reproductive performance. Potashnik G, Yanai-Inbar I. *Fertil Steril* 1987;47:317-323.
- Povey AC, Clyma JA, McNamee R, Moore HD, Baillie H, Pacey AA, et al; Participating Centres of Chaps-uk. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study. *Hum Reprod* 2012;27:2799-2806.
- Punjabi U, Spiessens C. Basic semen analysis courses: experience in Belgium. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandepuut H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E (eds). *Modern ART in the 2000s -Andrology in the Nineties*. London, UK: The Parthenon Publishing Group, 1998.
- 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.
- Ralph JL, Orgebin-Crist MC, Lareyre JJ, Nelson CC. Disruption of androgen regulation in the prostate by the environmental contaminant hexachlorobenzene. *Environ Health Perspect* 2003;111:461-466.

- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007a;22:188-96.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L, Toft G, Olsen J, Bonde JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007b;165:1372-1379.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J. Parental infertility and semen quality in male offspring: a follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007c;166:568-70.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J, Bech BH. Semen quality according to prenatal coffee and present caffeine exposure: two decades of follow-up of a pregnancy cohort. *Hum Reprod* 2008;23:2799-2805.
- Ramlau-Hansen CH, Toft G, Jensen MS, Strandberg-Larsen K, Hansen ML, Olsen J. Maternal alcohol consumption during pregnancy and semen quality in the male offspring: two decades of follow-up. *Hum Reprod* 2010;25:2340-2345.
- Ravnborg TL, Jensen TK, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Prenatal and adult exposures to smoking are associated with adverse effects on reproductive hormones, semen quality, final height and body mass index. *Hum Reprod* 2011;26:1000-1011.
- Röhrig B, du Prel JB, Wachtlin D, Blettner M. Types of study in medical research. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:262-268.
- Ribera JM, Cardellach F, Selva A; Editorial committee of *Medicina Clínica*. The processes of manuscript evaluation and publication in *Medicina Clínica*. The editorial committee of *Medicina Clínica*. *Med Clin* 2005;125:3-7.
- Richthoff J, Rylander L, Jönsson BA, Akesson H, Hagmar L, Nilsson-Ehle P, et al. Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the general Swedish population. *Environ Health Perspect* 2003;111:409-413.

- Riddell D, Pacey A and Whittington K. Lack of compliance in UK andrology laboratories to World Health Organisation recommendations for sperm morphology assessment. *Hum Reprod* 2005; 20:3441-3445.
- Rignell-Hydbom A, Rylander L, Giwercman A, Jönsson BA, Nilsson-Ehle P, Hagmar L. Exposure to CB-153 and p,p'-DDE and male reproductive function. *Hum Reprod* 2004;19:2066-2075.
- Rios LP, Oduyungbo A, Moitri MO, Rahman MO, Thabane L. Quality of reporting of randomized controlled trials in general endocrinology literature. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3810-3816.
- 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;109:185-197.
- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* 2013;28:462-470.
- Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril* 2002;78:1187-1194.
- Sackett DL. Bias in analytic research. *J Chronic Dis* 1979;32:51-63.
- SACO 100EN. Endocrine disrupting chemicals: A challenge for the EU?. European Parliament, Public Health and Consumer Protection Series, Strasbourg, 1998.
- Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, Shenoy U, Shenoy R, Rajmohan H, et al. Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ Health Perspect* 2003;111:1958-1962.
- Samaan Z, Mbuagbaw L, Kosa Daisy, Borg V, Dillenburg R, Zhang S, et al. A systematic scoping review of adherence to reporting guidelines in health care literature. *J Multidiscip Healthc* 2013;6:169-188.

- Sánchez-Pozo MC, Mendiola J, Serrano M, Mozas J, Björndahl L, Menkveld R, et al. Proposal of guidelines for the appraisal of SEMen QUALity studies (SEMQUA). *Hum Reprod* 2013;28:10-21.
- Sandifer SH, Wilkins RT, Loadholt CB, Lane LG, Eldridge JC. Spermatogenesis in agricultural workers exposed to dibromochloropropane (DBCP). *Bull Environ Contam Toxicol* 1979;23:703-710.
- Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update* 2010;16:65-79.
- Schenker MB, Samuels SJ, Perkins C, Lewis EL, Katz DF, Overstreet JW. Prospective surveillance of semen quality in the workplace. *J Occup Med* 1988;30:336-344.
- Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *BMC Med* 2010;8:18.
- Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod* 2000;15:1314-1321.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:221-331.
- Sharpe RM. "Additional" effects of phthalate mixtures on fetal testosterone production. *Toxicol Sci.* 2008;105:1-4.
- Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol* 1997;11:675-80.

- Sheiner EK, Sheiner E, Carel R, Potashnik G, Shoham-Vardi I. Potential association between male infertility and occupational psychological stress. *J Occup Environ Med* 2002;44:1093-1099.
- Sheynkin Y, Welliver R, Winer A, Hajimirzaee F, Ahn H, Lee K. Protection from scrotal hyperthermia in laptop computer users. *Fertil Steril* 2011;95:647-651.
- Shikata S, Nakayama T, Yamagishi H. Quality of surgical randomized controlled trials for acute cholecystitis: assessment based on CONSORT and additional check items. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15:297-303.
- Shine R, Peek J, Birdsall M. Declining sperm quality in New Zealand over 20 years. *N Z Med J* 2008;121:50-56.
- Simera I, Altman DG, Moher D, Schulz KF, Hoey J. Guidelines for reporting health research: the EQUATOR network's survey of guideline authors. *PLoS Med* 2008;5:e139.
- Simera I, Moher D, Hoey J, Schulz KF, Altman DG. The EQUATOR Network and reporting guidelines: Helping to achieve high standards in reporting health research studies. *Maturitas* 2009;63:4-6.
- Singer R, Ben-Bassat M, Malik Z, Sagiv M, Ravid A, Shohat B et al. Oligozoospermia, asthenozoospermia, and sperm abnormalities in ex-addict to heroin, morphine, and hashish. *Arch Androl* 1986;16:167-74.
- Skakkebaek NE. Normal reference ranges for semen quality and their relations to fecundity. *Asian J Androl* 2010;12:95-98.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De ME, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;5:972-978.
- Slama R, Esustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17:503-515.

- Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum Reprod.* 2006;21:2868-2875.
- Slutsky M, Levin JL, Levy BS. Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. *Int J Occup Environ Health* 1999;5:116-122.
- Smith CG, Asch RH. Drug abuse and reproduction. *Fertil Steril* 1987;48:355-373.
- Snick HKA, Snick TS, Evers JLH, Collins JA. The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum Reprod* 1997;12:1582-1588.
- Soares SR, Melo MA. Cigarette smoking and reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:281-291.
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995;103:113-122.
- Spanò M, Toft G, Hagmar L, Eleuteri P, Rescia M, Rignell-Hydbom A, et al; INUENDO. Exposure to PCB and p, p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human spermchromatin integrity. *Hum Reprod* 2005;20:3488-3499.
- Squires BP, Elmslie TJ. Reports of randomized controlled trials: what editors want from authors and peer reviewers. *CMAJ* 1990;143:381-382.
- Squires BP, Elmslie TJ. Cohort studies: what editors want from authors and peer reviewers. *CMAJ* 1990;143:179-180.
- Squires BP, Elmslie TJ. Reports of case-control studies: what editors want from authors and peer reviewers. *CMAJ* 1990;143:17-18.
- Squires BP. Statistics in biomedical manuscripts: what editors want from authors and peer reviewers. *CMAJ* 1990;142:213-214.

- Stewart TM, Liu DY, Garrett C, Brown EH, Baker HWG. Recruitment bias in studies of semen and other factors affecting pregnancy rates in fertile men. *Hum Reprod* 2009;24:2401-2408.
- Stöckl D, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, et al. Analytical specifications of reference methods compilation and critical discussion (from the members of the European EQA-Organizers Working Group B). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:319-337.
- Stokes-Riner A, Thurston SW, Brazil C, Guzick D, Liu F, Overstreet JW et al. One semen sample or 2? Insights from a study of fertile men. *J Androl* 2007;28:638-643.
- Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, et al. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts? *Epidemiol* 2003;14:278-286.
- Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* 2000;283:2008-2012.
- Süt N, Senocak M, Uysal O, Köksalan H. Assessing the quality of randomized controlled trials from two leading cancer journals using the CONSORT statement. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2008;1:38-43.
- 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;108:961-966.
- Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res.* 2008;108:177-84.

- Takahashi W, Wong L, Rogers BJ, Hale RW. Depression of sperm counts among agricultural workers exposed to dibromochloropropane and ethylene dibromide. *Bull Environ Contam Toxicol* 1981;27:551-558.
- Thabane L, Chu R, Cuddy K, Douketis J. What is the quality of reporting in weight loss intervention studies? A systematic review of randomized controlled trials. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:1554-1559.
- TAWG. The Asilomar Working Group on Recommendations for Reporting of Clinical Trials in the Biomedical Literature. Checklist of information for inclusion in reports of clinical trials. *Ann Intern Med* 1996;124:741-743.
- The Journal of the American Dental Association. Guidelines for reporting clinical trials. *JADA* 1973;87:557
- Thorup J, Cortes D, Petersen BL. The incidence of bilateral cryptorchidism is increased and the fertility potential is reduced in sons born to mothers who have smoked during pregnancy. *J Urol* 2006;176:734-737.
- Thorup J, McLachlan R, Cortes D, Nation TR, Balic A, Southwell BR, Hutson JM. What is new in cryptorchidism and hypospadias -a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *J Pediatr Surg* 2010;45:2074-2086.
- Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, Shvets M, Giwercman A, Lindh CH, et al. Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology* 2006;17:450-458.
- Toft G, Hagmar L, Giwercman A, Bonde JP. Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reprod Toxicol* 2004;19:5-26
- Tomlinson MJ, Harbottle SJ, Woodward BJ, Lindsay KS; Association of Biomedical Andrologists. Association of biomedical andrologists-laboratory andrology guidelines for good practice version 3-2012. *Hum Fertil (Camb)* 2012;15:156-173.



- Tooth L, Ware R, Bain C, Purdie DM, Dobson A. Quality of reporting of observational longitudinal research. *Am J Epidemiol* 2005;161:280-288.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104:741-803.
- Torre DL, Falorni A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3:929-951.
- Tuomisto J, Holl K, Rantakokko P, Koskela P, Hallmans G, Wadell G, et al. Maternal smoking during pregnancy and testicular cancer in the sons: a nested case-control study and a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009;45:1640-1648.
- Turek PJ, Williams RH, Gilbaugh JH III, Lipshultz LI. The reversibility of anabolic steroid-induced azoospermia. *J Urol* 1995;153:1628-1630.
- Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clin Reprod Fertil* 1982a;1:273-285.
- Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clin Reprod Fertil* 1982b;1:287-293.
- Tyler JP, Matson PL, Crockett NG. The effects of frequent ejaculation on seminal spermatozoal number and calculation of daily spermatozoa output. *Clin Reprod Fertil* 1985;3:145-149.
- Ulrich EM1, Willett KL, Caperell-Grant A, Bigsby RM, Hites RA. Understanding enantioselective processes: a laboratory rat model for alpha-hexachlorocyclohexane accumulation. *Environ Sci Technol* 2001;35(8):1604-1609.
- UNE 179007. Sistemas de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción asistida; 2014.

- Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Barrera N, Vaamonde-Lemos R. Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *Eur J Appl Physiol* 2012;112:3267-3273.
- Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Vaamonde-Lemos R, Swanson RJ, Oehninger SC. Response of semen parameters to three training modalities. *Fertil Steril* 2009;92:1941-1946.
- Vaamonde D, Da Silva ME, Poblador MS, Lancho JL. Reproductive profile of physically active men after exhaustive endurance exercise. *Int J Sports Med* 2006;27:680-689.
- Van Zyl JA, Menkveld R, Kotze TJ, Retief AE, Van Niekerk WA. The importance of spermograms that meet the requirements of international standards and the most important factors that influence semen parameters. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Urological Society*. Paris: Diffusion Dion Editeurs 1976;2:263.
- Vandenbroucke JP, Von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M; Iniciativa STROBE. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Gac Sanit* 2009;23:158.
- Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a metaanalysis. *Fertil Steril* 1994;61:35-43.
- Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Epidemiology* 2007;18:800-804.
- Vonier PM, Crain DA, McLachlan JA, Guillette LJ Jr, Arnold SF. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect* 1996;104:1318-1322.

- Vreeburg JTM, Weber RFA. Basic semen analysis courses: experience in the Netherlands. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E (eds). *Modern ART in the 2000s-Andrology in the Nineties*. London, UK: The Parthenon Publishing Group, 1998.
- Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, van der Spek PJ, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2009;24:1304-1312.
- Weissman A, Gotlieb L, Ward S, Greenblatt E, Casper RF. Use of the internet by infertile couples. *Fertil Steril* 2000;73:1179-1182.
- 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.
- Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 2006;85:653-660.
- Wirth EF, Lund SA, Fulton MH, Scott GI. Reproductive alterations in adult grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, following sublethal, chronic endosulfan exposure. *Aquat Toxicol* 2002;59:93-99.
- WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus interaction. 3th edn, 1999. Cambridge, University Press, Cambridge, UK.
- WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn, 2010. Geneva: World Health Organization Press, Switzerland.
- Whorton MD, Milby TH, Krauss RM, Stubbs HA. Testicular function in DBCP exposed pesticide workers. *J Occup Med* 1979;21:161-166.

- Whorton MD, Milby TH. Recovery of testicular function among DBCP workers. *J Occup Med* 1980;22:177-179.
- Whorton D, Krauss RM, Marshall S, Milby TH. Infertility in male pesticide workers. *Lancet*. 1977;17:1259-1261.
- Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2011;95:1025-1030.
- Wu JQ, Gao ES, Yang QY, Tang JG, Liang CL, Xu X, et al. The investigation on working and other lifestyles influencing semen quality of Chinese young men. *Chinese J Family Plan* 2004;6:346-349.
- Xie SH, Li YF, Tan YF, Zheng D, Liu AL, Xie H et al. Urinary trichloroacetic acid levels and semen quality: a hospital-based cross-sectional study in Wuhan, China. *Environ Res* 2011;111:295-300.
- Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. Washington, USA: AACC Press, 1995.
- Yu B, Chen J, Liu D, Zhou H, Xiao W, Xia X et al. Cigarette smoking is associated with human semen quality in synergy with functional NRF2 polymorphisms. *Biol Reprod* 2013;89:5.
- Zareba P, Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Jørgensen N, Mendiola J, Swan SH, Chavarro JE. Semen quality in relation to antioxidant intake in a healthy male population. *Fertil Steril* 2013;100:1572-1579.
- Zhong YQ, Fu JJ, Liu XM, Diao X, Mao B, Fan T et al. The reporting quality, scientific rigor, and ethics of randomized placebo-controlled trials of traditional Chinese medicine compound formulations and the differences between Chinese and non-Chinese trials. *Curr Ther Res Clin Exp* 2010;71:30-49.

Zhu J, Lu WQ. A comprehensive evaluation on semen quality of 201 healthy men in Guizhou province. *J Guiyang Med Coll* 2005;30:498–501.

Ziogas DCZ, E. Analysis of the quality of reporting of randomized controlled trials in acute and chronic myeloid leukemia, and myelodysplastic syndromes as governed by the CONSORT statement. *Ann Epidemiol* 2009;19:494-500.

Zou Z, Hu H, Song M, Shen Y, Guo X, McElreavey K et al. Semen quality analysis of military personnel from six geographical areas of the People's Republic of China. *Fertil Steril* 2011; 95:2018-2023.



