



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Influencia de la concentración de Bifenilos Policlorados
similares a dioxinas sobre la calidad seminal en varones con
problemas de fertilidad

Raiza Paul Caballero



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE

Influencia de la concentración de Bifenilos Policlorados similares a dioxinas sobre la calidad seminal en varones con problemas de fertilidad

Raiza Paul Caballero

**Tesis presentada para aspirar al grado de
DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE**

Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud

Dirigida por:

M^a José Gómez Torres
Profesora Titular

Julia Moltó Berenguer
Profesora Contratado Doctor

Financiación: Cátedra Human Fertiliy de la Universidad de Alicante

Proyecto PROMETEOII/2014/007 Generalitat Valenciana

Proyecto CTQ2013-41006-R Ministerio de Economía y Competitividad
(España)

Índice



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes y estado actual del tema.	3
1.2 Problemática de la esterilidad	4
1.3 Sistema Reproductor Masculino	5
1.3.1 Espermatogénesis	7
1.3.2 Maduración del espermatozoide	11
1.3.3 Semen	12
1.3.4 Características del espermatozoide	13
1.4 Esterilidad Masculina	14
1.5 Estudio del semen	16
1.5.1 Estudios complementarios para el estudio de la infertilidad en el varón	17
1.6 Factores ambientales que afectan la calidad seminal	19
1.7 Disruptores endocrinos	22
1.8 Policlorobifenilos (PCBs)	24
1.8.1 PCBs similares a dioxinas	28
1.8.2 Vías de exposición	32
1.8.3 Efectos sobre la salud humana de los dl-PCBs	33
1.9 Metodología analítica de dl-PCBs en muestras biológicas	34
2. OBJETIVOS	39
2.1 Hipótesis de Trabajo	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 FASE I: Desarrollo de una metodología para el análisis de dl-PCBs en muestras de suero	43
3.2 Fase II. Estudio de la influencia de las concentraciones de los PCBs similares a dioxinas sobre la calidad seminal.	57
3.3 Análisis estadísticos de los datos	65
4. RESULTADOS	69
4.1 FASE I. Desarrollo del método de análisis para la determinación de PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs) en suero humano.	69
4.2 FASE II. Estudio de la influencia de las concentraciones de los PCBs similares a dioxinas sobre la calidad seminal.	71
4.2.1 Estudio de correlación entre las variables estudiadas	77
5. DISCUSIÓN	83
5.1 FASE I. Desarrollo del método de análisis para la determinación de PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs) en suero humano.	83
5.2 FASE II. Estudio de la influencia de las concentraciones de los PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs) sobre la calidad seminal.	85
6. CONCLUSIONES	95



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática del sistema genital masculino. Las estructuras tales como el testículo, el epidídimo, el conducto deferente y la vesícula seminal, se pueden observar (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).	6
Figura 1.2. Corte transversal del testículo y del epidídimo. (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).	6
Figura 1.3. Representación esquemática de la espermatogénesis. (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).	9
Figura 1.4. Esquema que representa la secuencia de transformaciones posmeióticas mediante las cuales las espermátides se convierten en espermatozoides (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).	10
Figura 1.5. Esquema del corte transversal del epitelio germinal donde podemos observar el proceso de la espermatogénesis. En la figura se ilustra, la ultraestructura de la célula de Sertoli y de sus relaciones con las células germinales. (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).	11
Figura 1.6. Representación esquemática de la estructura de un espermatozoide maduro. Las tres zonas del espermatozoide y sus componentes principales: cabeza, pieza intermedia y cola se observan en la figura (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).	14
Figura 1.7. Mecanismo de acción de los disruptores endocrinos (DE) (Imagen obtenida de Moreno et. al. 2012)	22
Figura 1.8. Transformadores eléctricos	25
Figura 1.9 Estructura química de los PCBs	26
Figura 1.10 Estructura de la (2,3,7,8-TCDD)	28
Figura 1.11 Estructura del 3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo (PCB-126)	29
Figura 1.12 Mecanismo molecular de la activación del receptor aril hidrocarburo (AhR) por los PCB. (Modificado de Denison et. al., 2003).	31
Figura 3.1 Esquema del diseño experimental llevado a cabo en la Fase I, para el desarrollo de una metodología de análisis de dl-PCBs en suero sanguíneo	45
Figura 3.2 Primera ventana cromatográfica (congéneres tetra y pentaclorados) del patrón de PCBs denominado WP-CS4.	54
Figura 3.3 Esquema del diseño experimental llevado a cabo durante la Fase II.	57
Figura 3.4 Tipos de motilidad de los espermatozoides (spz). A (progresivo rápido). B (progresivo lento) se agrupan en motilidad progresiva spz-PR. C es motilidad no progresiva spz-NP. D es un espermatozoide inmóvil-IM. (OMS, 2010).	61
Figura 3.5 Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides. (OMS, 2010).	64
Figura 4.1 Boxplots de valores medios de concentración de dl PCBs.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Comparación entre los valores de referencia OMS-1999 y los límites de referencia inferiores (LIR) según Manual OMS-2010.....	16
Tabla 1.2 Aplicaciones industriales más comunes de los PCBs (Bejarano, 2004).....	27
Tabla 1.3 Principales fuentes emisoras de PCBs a la atmósfera en Europa (EC, 2006).....	28
Tabla 1.4 Factores de equivalencia tóxicos para los 12 PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs).....	30
Tabla 3.1 Cronograma del estudio por fases	43
Tabla 3.2 Patrones utilizados en el análisis de PCBs similares a dioxinas.....	48
Tabla 3.3 Condiciones del análisis de PCBs mediante HRGC-HRMS	49
Tabla 3.4 Patrones de calibrado utilizados en el análisis de dl-PCBs	52
Tabla 4.1 Niveles de concentración de los diferentes congéneres de dl-PCBs (pg/g lípido) y valor total de toxicidad (pg WHO-TEQ/g lípido) en muestras de suero sanguíneo	69
Tabla 4.2. Concentraciones de dl-PCBs (pg WHO-TEQ /g lípido) en muestras de suero en función de la edad (años) y el IMC (kg/m ²).	71
Tabla 4.3. Datos biológicos y sociodemográficos entre los grupos estudiados.....	72
Tabla 4.4 Diferencias entre los parámetros seminales entre los grupos estudiados	73
Tabla 4.5. Valores de colesterol total y triglicéridos en suero entre los grupos estudiados.	74
Tabla 4.6. Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de cada uno de los 12 dl-PCBs expresadas en pg/g de lípido en muestras de suero.	74
Tabla 4.7. Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de no-orto, mono-orto y concentración total de PCBs expresadas en pg/g de lípido en muestras de suero.	75
Tabla 4.8 .Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de cada uno de los 12 dl-PCBs expresadas en WHO-TEQ pg/g de lípido en muestras de suero.....	76
Tabla 4.9. Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de PCBs no-orto, mono-orto y Σ dl-PCBs expresadas en pg WHO-TEQ/g de lípido en muestras de suero	76
Tabla 4.10. Concentraciones de dl-PCBs (pg WHO-TEQ /g lípido) en muestras de suero en función de la edad (años) y el IMC (kg/m ²).	77
Tabla 4.11. Correlación entre las concentraciones de dl-PCBs y las características de los sujetos.....	78
Tabla 4.12. Correlación entre congéneres de PCBs, non-orto y total PCBs y los parámetros seminales	78
Tabla 5.1. Comparativa de el valor medio de dl-PCBs (pg WHO-TEQ/g de lípido) en muestras de suero con los publicados en la literatura.	87

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AhR	Receptor aril hidrocarburo
ARN	Ácido ribonucleico
ASRM	Asociación Americana de Medicina Reproductiva
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulador
COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
dl-PCB	dioxin-like PCBs (policlorobifenilos “similares a dioxinas”)
EC	European Commission
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embriology
FIV	Fecundación In Vitro
FSH	Hormona Foliculoestimulante
GC	gas chromatography (cromatografía de gases)
HRGC	High resolution gas chromatography (cromatografía de gases de alta resolución)
HRMS	High resolution mass spectrometry (espectrometría de masas de alta resolución)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Indice de Masa Corporal
LH	Hormona Luteinizante
LLE	Liqui-liquid extraction (Extracción líquido-líquido)
LP	Lipoperoxidación
MLLE	Micro liquid-liquid extraction
MMA	Ministerio de Medioambiente
NATO/CCMS	North Atlantic Treaty Organization ,Committee on the Challenges of Modern Society
OH	Radical Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud

REM	Recuento de Espermatozoides Móviles obtenidos tras capacitación
PCBs	Policlorobifenilos
PCDDs	Policlorodibenzo- <i>p</i> -dioxinas
PCDFs	Policlorodibenzofuranos
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
RSD	relative standard deviation (desviación estándar relativa)
RR	Respuesta Relativa
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SIR	selected-ion recording (registro selectivo de iones)
FR	Factor de Respuesta
TCDDs	Tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxinas
TCDFs	tetraclorodibenzofuranos
TEFs	Toxic Equivalency Factors (factores de equivalencia tóxica)
TEQ	Toxic Equivalent (equivalente tóxico)
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
UE	Unión Europea
UNEP	United Nations Environment Programme
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante



1.Introducción

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y estado actual del tema.

En las últimas décadas se ha producido un notable descenso en los índices de fertilidad, tanto en los países desarrollados como en aquellos que se encuentran en vías de desarrollo. A pesar de que los factores socioeconómicos son responsables en gran medida de estos cambios, existen evidencias que apuntan a que de forma paralela factores biológicos adversos han ocasionado un deterioro de la salud reproductiva. Se estima que en los países desarrollados un 15% de las parejas en edad reproductiva sufren problemas de esterilidad. Aproximadamente, en el 30% de los casos encontramos al factor masculino como el único responsable (ESRHE, 2014).

Actualmente existe un debate sobre el declive de la calidad seminal a lo largo del tiempo. En lo que se refiere a las causas de este descenso se han estudiado varios factores, desde un aumento en la incidencia de patologías en aparato reproductor masculino, factores ambientales y ocupacionales, hasta determinados hábitos de vida. En este sentido encontramos en la literatura, varios estudios que sugieren que esta disminución de la calidad seminal, y por tanto de la fertilidad masculina, está relacionada con el incremento de un gran número de compuestos químicos orgánicos, entre los que se encuentran los policlorobifenilos o bifenilos policlorados (PCBs) (Duty *et. al.*, 2003; Hauser *et. al.*, 2005; 2006; Meeker *et. al.*, 2009; Mendiola *et. al.*, 2010; 2012; Porta *et. al.*, 2002; 2006).

Los PCBs pertenecen al grupo de Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) entre cuyos efectos en la salud humana se incluyen la toxicidad dérmica, la inmunotoxicidad, los efectos reproductivos y la teratogenicidad, los efectos perturbadores del sistema endocrino y los efectos cancerígenos. Son compuestos muy estables, difícilmente biodegradables, insolubles en agua, resistentes al fuego y muy buenos aislantes eléctricos (Mackay *et. al.*, 1992). Hoy en día toda la población humana está expuesta en mayor o menor medida a estos compuestos. De las tres vías (ingestión oral, inhalación y contacto dérmico) por las que el hombre puede entrar en contacto con estos contaminantes e incorporarlos a su organismo, la ingestión oral es aproximadamente la responsable del 90-95% de los PCBs presentes en el organismo, mientras que el contacto dérmico es la minoritaria, salvo en algunas excepciones.

Bajo la denominación de PCBs se incluyen 209 compuestos, de los cuales existe un pequeño grupo, que presentan efectos tóxicos similares a las dioxinas, y se conocen con el nombre de PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs). Los efectos de la toxicidad de los 12 dl-PCBs sobre el sistema reproductor masculino han sido estudiados principalmente en animales: alteración de la secreción de la hormona luteinizante (LH), reducción de la concentración de andrógeno en plasma, reducción del peso de testículos, morfología anormal de testículos, decrecimiento de la espermatogénesis y reducción de la fertilidad (Ahlborg *et. al.*, 1992; Peterson *et. al.*, 1993; Ping Shu *et. al.*, 2004).

La elevada toxicidad de estos compuestos químicos, la variedad de sus posibles efectos adversos, y diversas incertidumbres sobre su magnitud clínica y poblacional han generado

Introducción

una preocupación razonable en científicos, médicos y ambientalistas, entre otros profesionales, así como en una parte no desdeñable del resto de la sociedad.

Distintos estudios han mostrado que estos tóxicos ambientales podrían estar asociados con efectos adversos sobre el sistema reproductivo masculino, bien por afectación de la función endocrina, o de la espermatogénesis, resultando en una calidad seminal disminuida (Leijs *et al.*, 2014).

Actualmente, aunque el número de estudios va en aumento, existen pocos trabajos que estudien las relaciones entre exposiciones ocupacionales a tóxicos e infertilidad masculina en varones que acuden a clínicas de reproducción asistida, y los datos no son concluyentes (Dallinga *et al.*, 2002; Den Hond *et al.*, 2015; Hauser *et al.*, 2002).

1.2 Problemática de la esterilidad

La esterilidad ha sido uno de los mayores problemas sociales y médicos desde los albores de la humanidad e implica que las personas realicen un objetivo vital importante: la posibilidad de ser el progenitor de un hijo genéticamente relacionado o de un hijo concebido con su pareja (Burns, 2007).

La prevalencia de infertilidad se sitúa alrededor del 15% de las parejas en edad reproductiva, lo que quiere decir que pueden existir entre 60 – 80 millones de parejas infértiles y experimenta una evolución creciente (Bentle *et al.*, 2000; López *et al.*, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que aproximadamente del 8% al 12% de las parejas experimentan algún problema de infertilidad durante su vida fértil lo que, de extrapolarse a la población mundial, representaría entre 50 y 80 millones de personas (OMS, 1999; Parada, 2006).

En la actualidad se reconocen dos términos diferentes para hacer referencia a la falta de concepción de una pareja, la esterilidad y la infertilidad. La primera es la incapacidad para concebir tras un año de relaciones sexuales frecuentes sin métodos anticonceptivos. Mientras que se entiende como infertilidad a la incapacidad de llevar a tiempo las gestaciones, es decir, sí que hay embarazo pero se interrumpe involuntariamente antes del nacimiento.

Si bien en la terminología española hasta hace años se diferenciaba entre esterilidad (o dificultad para conseguir el embarazo) e infertilidad (dificultad para conseguir que los embarazos concluyeran en recién nacidos), en la actualidad el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española los considera como sinónimos. La definición más comúnmente aceptada de esterilidad/infertilidad es la ausencia de consecución de embarazo tras 12 meses de relaciones sexuales sin empleo de métodos anticonceptivos (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Tal definición es la empleada por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), Asociación Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) y por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESRHE). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) considera que el periodo sin consecución de embarazo para poder hablar de esterilidad debe ser de 24 meses.

Debido a que estas definiciones están basadas en probabilidades de concebir en un determinado espacio temporal, y generalmente no se refieren a una imposibilidad irreversible para concebir, parece últimamente más correcto hablar de subfertilidad. Por lo que, debería hablarse no de una esterilidad absoluta, sino de distintos grados de subfertilidad que pueden tener mayor o menor trascendencia en función del tiempo de evolución.

Habitualmente distinguimos entre esterilidad absoluta y subfertilidad.

- ◆ Esterilidad absoluta: Correspondería a las parejas en las que hay un impedimento total para la consecución del embarazo.
- ◆ Subfertilidad o esterilidad relativa: Parejas en las que está presente un impedimento parcial en su fecundidad, en las que existe algún problema que determina que ésta sea más baja de lo normal, pero no nula. Ésta es la situación más común entre las parejas que consultan en la actualidad por problemas reproductivos (Matorras *et. al.*, 2011).

Por otro lado, conviene aclarar términos como fecundabilidad y fecundidad:

- ◆ Fecundabilidad: Probabilidad de conseguir un embarazo durante un ciclo menstrual (20-25% por ciclo en parejas fértiles).
- ◆ Fecundidad: Capacidad para conseguir un feto vivo y viable en un ciclo menstrual con exposición al coito.

Hoy en día, hay que entender la esterilidad como una enfermedad de pareja, donde ambos gametos deben ser estudiados con la misma atención y la misma intensidad. Si bien históricamente el estudio de la esterilidad se ha centrado en la mujer, actualmente se sabe que aproximadamente el 30% de los casos de esterilidad son debidos a un factor masculino, otro 25% son de etiología mixta, en un 30% de los casos está involucrado únicamente el factor femenino y un 15 % de etiología desconocida (Huidobro, 2010; Jungwirth *et. al.*, 2012).

1.3 Sistema Reproductor Masculino

Antes de identificar las causas de infertilidad masculina, conviene hacer un breve recuerdo sobre la fisiología de la reproducción en el varón que es una función integrada, dependiente de la interacción de señales hormonales y nerviosas entre el sistema nervioso central (SNC), hipotálamo, hipófisis y testículo.

El sistema reproductor masculino está formado por una serie de estructuras cuya misión es producir las células reproductoras masculinas (espermatozoides), las hormonas responsables de los caracteres masculinos y la formación del plasma seminal y su posterior eyaculación (Fawcett *et. al.*, 1995). Está constituido por los testículos, un sistema tubular de almacenamiento y conducción, glándulas accesorias que participan en la formación del plasma seminal y el pene órgano de la copulación (Figura 1.1).

Introducción

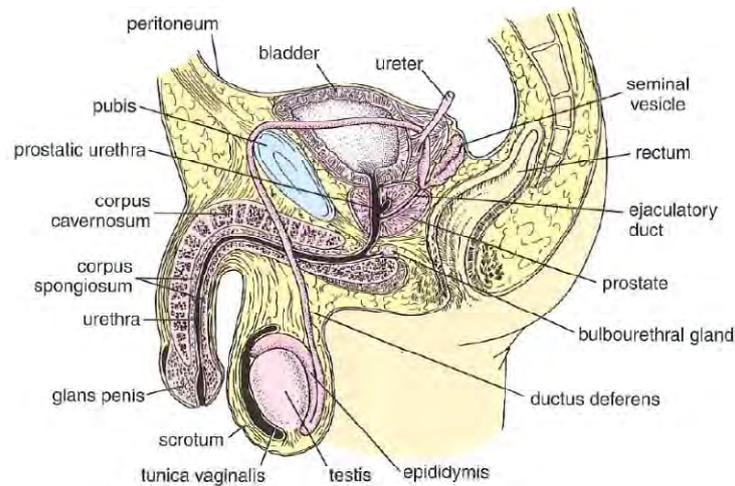


Figura 1.1. Representación esquemática del sistema genital masculino. Las estructuras tales como el testículo, el epidídimo, el conducto deferente y la vesícula seminal, se pueden observar (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).

Los testículos son dos órganos pares situados fuera de la cavidad corporal, en una bolsa de piel altamente especializada, el escroto, lo que significa que se mantienen a una temperatura alrededor 2-3 grados °C por debajo de la temperatura corporal. Esta temperatura más baja es esencial para el desarrollo normal de la espermatogénesis (Amann *et. al.*, 1980). Los testículos tienen una doble función, por una parte producen los espermatozoides mediante un proceso llamado espermatogénesis y por otra ejercen una importante regulación endocrina, tanto a nivel reproductor como sobre otros órganos y funciones de nuestro cuerpo.

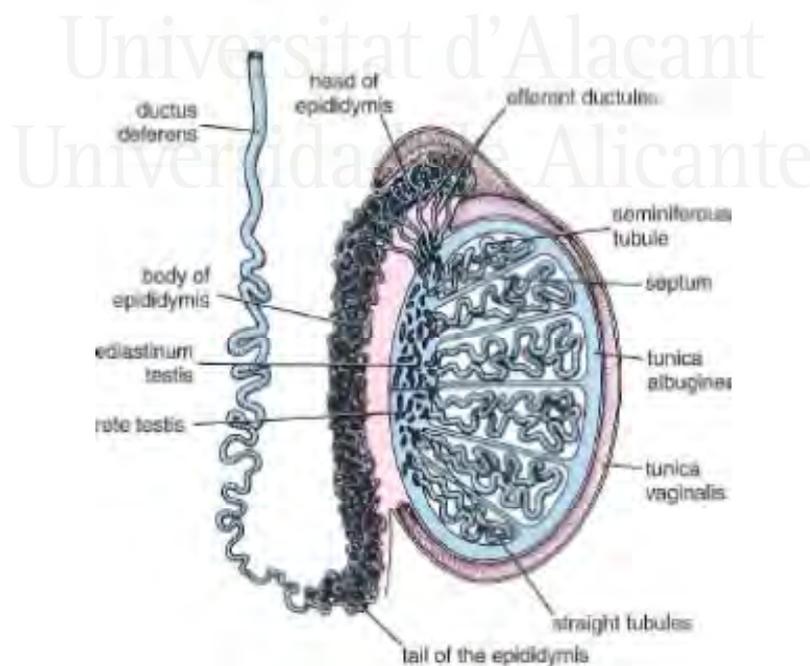


Figura 1.2. Corte transversal del testículo y del epidídimo. (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).

Los espermatozoides formados (Busso *et. al.*, 2007), pasan a la rete testis a través de los túbulos rectos cortos. Los conductos de la rete testis se fusionan para formar aproximadamente una docena de conductillos eferentes que salen por el extremo superior del mediastino testicular, penetran en la túnica albugínea y entran en la cabeza del epidídimo (Frenette *et. al.*, 2010). Allí se fusionan gradualmente hasta originar un único tubo, que es el conducto epididimario (ver Figura 1.2).

El conducto epididimario es un conducto altamente enrollado de unos 5 m de longitud, entre el testículo y el conducto deferente. Este conducto está inmerso en un estroma de sostén vascular laxo de fibroblastos, colágeno y una matriz de glucosaminoglucanos y se halla rodeado por una cápsula fibrocolagenosa densa, que forma un cuerpo en forma de media luna, al que se denomina epidídimo.

Así mismo, el conducto deferente es un tubo recto con un trayecto vertical por detrás del epidídimo, dentro del cordón espermático, contiene también arterias, venas, linfáticos y nervios. Por otro lado, cada vesícula seminal se forma a partir de un divertículo tubular no ramificado, de 15 cm de longitud y muy enrollado, del conducto deferente, que forma una espiral sobre si mismo constituyendo un cuerpo de unos 5-6 cm de longitud (Fawcett *et. al.*, 1995).

La próstata por su parte, está formada por glándulas de secreción que desembocan en la uretra prostática; la secreción prostática, que también forma parte del eyaculado (aproximadamente en un 20%) y es andrógeno dependiente, es alcalina y rica en fosfatasa ácida, calcio, ácido cítrico, colesterol, una enzima coagulante y profibrinolisisina. Las glándulas accesorias contribuyen de esta forma muy decisivamente a la formación del plasma seminal, cuya función es ser: medio nutritivo, vehículo de transporte y protección del tracto urinario.

Y por último, el pene es un órgano genital externo, formado por un tejido eréctil, altamente vascularizado, que facilita el depósito de los espermatozoides en el canal vaginal femenino.

1.3.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo de maduración y diferenciación celular, mediante el cual una población independiente de células germinales indiferenciadas se transforma en espermatozoides. La espermatogénesis se inicia con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros. Se pueden diferenciar tres etapas en este proceso:

- ◆ Espermatogoniogénesis o Fase proliferativa.
- ◆ Fase de maduración, donde se producen los fenómenos de Meiosis.
- ◆ Fase de diferenciación o Espermiogénesis.

Introducción

Espermatogoniogénesis o Fase proliferativa

En la fase proliferativa se produce la continua repoblación de espermatogonias. Las espermatogonias son células diploides situadas en la base del tejido germinal. En el hombre se han descrito tres tipos:

- ◆ Espermatogonias del tipo A oscuras.
- ◆ Espermatogonias del tipo A pálidas o claras.
- ◆ Espermatogonias del tipo B (Clemornt, 1966; De Rooij *et. al.*, 2000).

Las espermatogonias de Tipo A son la reserva de las células madre de la espermatogénesis, las de Tipo B representan el comienzo del desarrollo de las células germinales hasta las espermátides.

Las espermatogonias oscuras son células diploides. Se denominan así por tener la cromatina nuclear fina y oscura. Se consideran las células madre de la espermatogénesis. Son células diploides quiescentes que sólo entran en mitosis cuando se reduce drásticamente la población de espermatogonias.

La división produce más espermatogonias oscuras y algunas claras. Las espermatogonias claras son igualmente diploides. La cromatina nuclear es fina y pálida. Se dividen a intervalos regulares y dan lugar a más espermatogonias pálidas o espermatogonias del tipo B.

Las primeras se unen por el citoplasma pudiendo derivar a tipo B por maduración. Por último las espermatogonias del tipo B representan el comienzo del desarrollo de las células germinales hasta las espermátides. Son células diploides, la cromatina nuclear es granulosa y oscura y se dividen produciendo más espermatogonias B. Por maduración producen espermátocitos primarios espermátocitos preleptotene (fase de preparación de la meiosis).

Fase de maduración

En la fase de maduración se produce el fenómeno de la Meiosis. Es un proceso de división celular en el cual una célula diploide ($2n$) experimenta dos divisiones nucleares y citoplasmáticas sucesivas. La primera conocida como Meiosis I y la segunda como Meiosis II, generando al final cuatro células haploides.

Como la meiosis conlleva dos divisiones, las células son llamadas espermátocitos primarios antes de la primera división meiótica, y espermátocitos secundarios antes de la segunda división meiótica (De Kretser *et. al.*, 1998).

Este proceso ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos, en asociación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli (Ross *et. al.*, 2005). Las **células de Sertoli** son las células de sostén del epitelio seminífero, están conectadas entre si por zonas de la membrana plasmática mediante uniones estrechas o tight junctions (Lui *et. al.*, 2003), separando el epitelio germinal en un compartimento basal y otro adluminal. Estas zonas especializadas, las denominadas uniones estrechas o tight junctions, forman la barrera

hematotesticular de los testículos. Durante su maduración, las células germinales pasan esta barrera hemato-testicular, entrando en el compartimento adluminal, donde están protegidas de la difusión de sustancias extrañas y quedan aisladas del sistema inmune.

Además de tener funciones de sostén, se caracterizan por: nutrir las células germinales, participar en la liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero, eliminar células espermáticas degeneradas y sintetizar proteínas relacionadas con la función reproductora.

Los espermaticitos primarios sufren meiosis hasta alcanzar el estado de espermaticitos secundarios. Durante este tiempo, las células cruzan desde la zona basal a los compartimentos adluminales, el núcleo es más pequeño y la cromatina es fina. Los espermaticitos secundarios sufren una segunda meiosis y se convierten en espermátides. Durante la segunda división meiótica no se produce replicación del ADN, y las células se dividen rápidamente (Grootegoed, 2000).

Esta división reduccional genera un número de cromosomas haploides. Por lo tanto, un total de 4 espermátides se generan a partir de cada espermaticito. En la Figura 1.3, se aprecian todos los cambios sufridos desde la célula germinal primordial que da paso a la espermatogonia hasta la diferenciación a espermatozoides maduros .

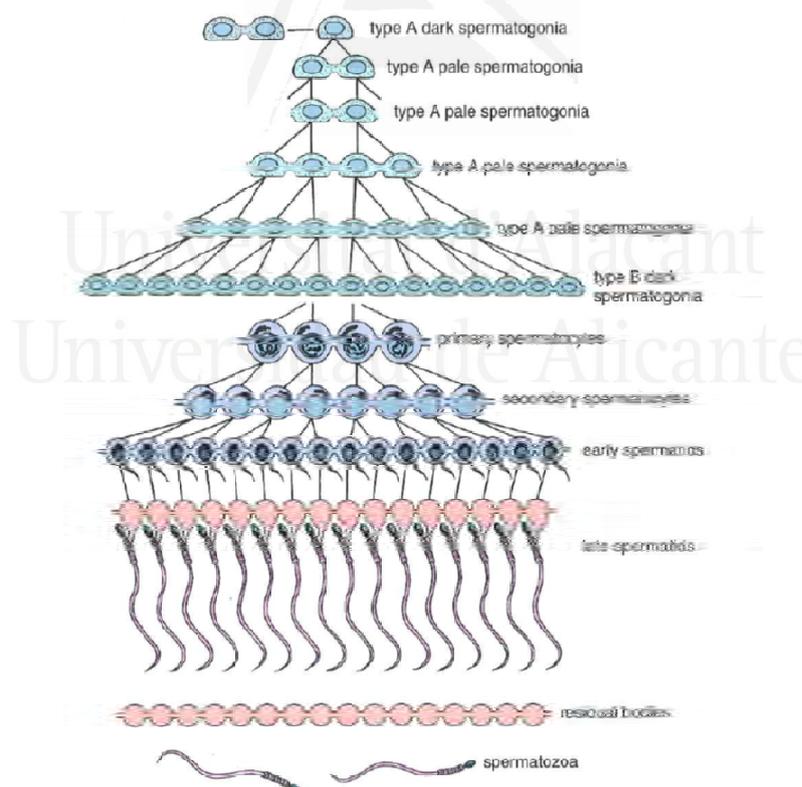


Figura 1.3. Representación esquemática de la espermatogénesis. (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).

Introducción

Espermiogénesis

Durante esta etapa las espermatídes redondas producidas tras la segunda división meiótica sufren una secuencia de transformaciones mediante las cuales se convierten en espermatozoides (Ross *et. al.*, 2005). Las principales transformaciones que se producen durante la espermiogénesis son las siguientes (Ver Figura 1.4):

Desarrollo del acrosoma: El aparato de Golgi, del cual deriva el acrosoma, forma vesículas proacrosómicas que se unen y desplazan junto al núcleo hacia el extremo apical de la cabeza.

Desarrollo de las estructuras del flagelo y su implantación en el núcleo: El desarrollo del flagelo se inicia cuando los centriolos emigran hacia la periferia. Del centriolo distal se origina el axonema. Conforme se alarga, los centriolos se invaginan y las mitocondrias se disponen helicoidalmente alrededor del flagelo, formando la pieza intermedia.

Reorganización del núcleo: El núcleo se vuelve elíptico, adopta posición excéntrica, se produce la condensación de la cromatina y la sustitución de histonas por protaminas

Reorganización del citoplasma: éste es reducido en su mayor parte, bien porque es fagocitado por las células de Sertoli o bien porque es liberado en el interior de los túbulos. Puede permanecer unido al espermatozoide durante un tiempo.

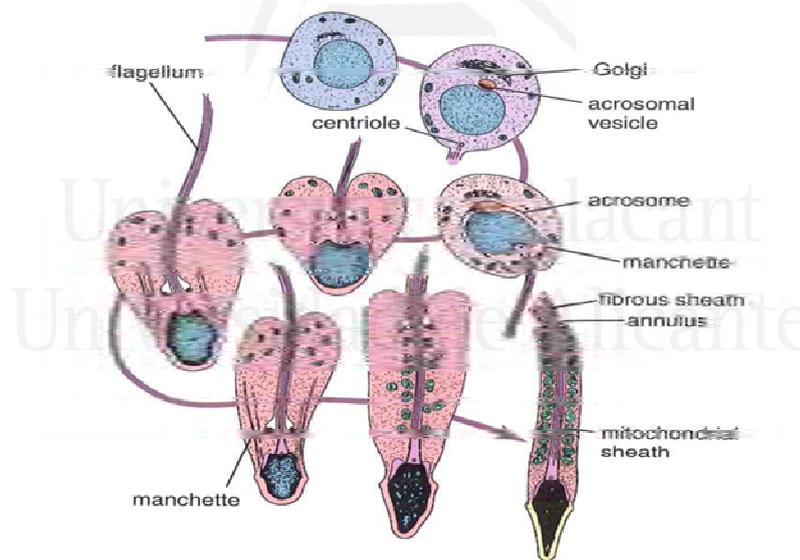


Figura 1.4. Esquema que representa la secuencia de transformaciones posmeióticas mediante las cuales las espermatídes se convierten en espermatozoides (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. *Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana*)

Durante este proceso las espermatídes se van elongando y van perdiendo casi la totalidad de su citoplasma, a excepción de la región media del espermatozoide, donde se acumulan las mitocondrias y que recibe el nombre de vaina mitocondrial.

Espermiación

El último proceso implicado es la espermiación, que consiste en la liberación de los espermatozoides ya formados a la luz de los túbulos seminíferos, proceso mediado por las células de Sertoli (Lui *et. al.*, 2003). Una vez libres las células pasan a denominarse espermatozoides. Durante el proceso de liberación, las espermatídes rompen los puentes celulares con las células adyacentes. Las células de Sertoli retienen parte del citoplasma de las espermatídes que salen a la luz tubular, formando los cuerpos residuales, que son fagocitados posteriormente. Los espermatozoides recién formados no son móviles y no pueden fecundar al ovocito, sólo después de la maduración en el conducto epididimario adquieren la motilidad progresiva (Jones, 1999) (Ver Figura 1.5).

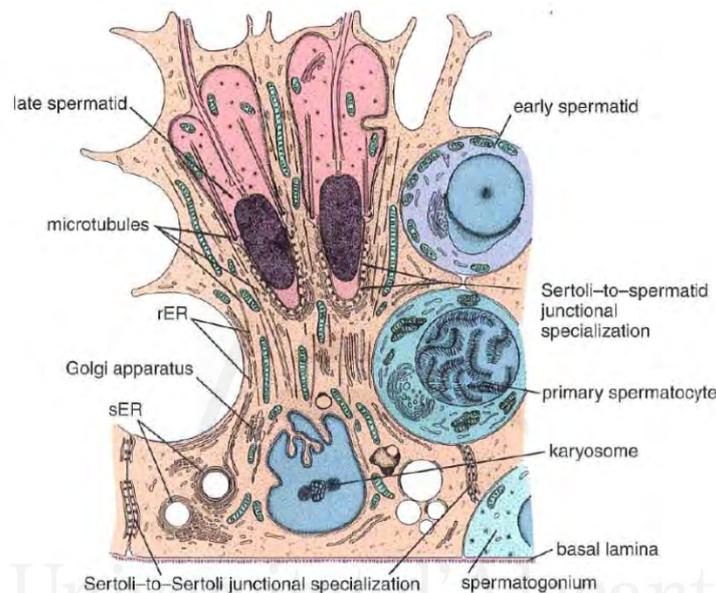


Figura 1.5. Esquema del corte transversal del epitelio germinal donde podemos observar el proceso de la espermatogénesis. En la figura se ilustra, la ultraestructura de la célula de Sertoli y de sus relaciones con las células germinales. (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).

1.3.2 Maduración del espermatozoide

Después de su liberación desde las células de Sertoli hacia el lumen de los túbulos seminíferos, las espermatídes pasan sucesivamente a través de los túbulos rectos, red testicular, conductos deferentes, y, finalmente al epidídimo. La función del epidídimo es la concentración, maduración y almacenaje del espermatozoide jugando un papel fundamental en la adquisición de la movilidad y de la capacidad fecundante del espermatozoide. La modificación de los espermatozoides para lograr la maduración requiere enzimas que son secretadas del epitelio del epidídimo en el fluido luminal (Grootegoed, 2000).

Introducción

Los cambios en la célula espermática durante la maduración epididimaria son las siguientes:

- ◆ Modificación del complejo proteína-ADN del núcleo para minimizar la probabilidad de daño ambiental o degradación prematura.
- ◆ Modificación de la membrana plasmática, mitocondria, y componentes fibrosos y microtubulares de las piezas media y principal para permitir la transducción de energía por contracciones coordinadas para contracciones coordinadas de la cola y motilidad.
- ◆ Desarrollo de las características de la superficie para permitir una sobrevivencia prolongada dentro del tracto reproductivo de la mujer.
- ◆ Estabilización de las membranas plasmáticas y acrosómicas y desarrollo de múltiples proteínas aglutinantes para unirse con los receptores del óvulo (Amann *et. al.*, 1980).

El proceso de maduración incluye cambios funcionales como el desarrollo del potencial para la motilidad sostenida y la maduración de organelos celulares. Así mismo, a medida que los espermatozoides van progresando a través del epidídimo, su metabolismo cambia gradualmente de un metabolismo oxidativo (aerobio) a uno glicolítico (anaerobio), ahorrando así energía. Incluso, la membrana del acrosoma es revestida de colesterol, sustancia contenida en grandes cantidades en las vesículas flotantes presentes en los túbulos seminíferos, fortaleciéndola e impidiendo la liberación de sus enzimas (Amann *et. al.*, 1980).

Los espermatozoides ya maduros siguen su tránsito hasta llegar a la cola del epidídimo. El almacenamiento y el mantenimiento de los espermatozoides fértiles es el rol primario de la cola del epidídimo, llegando a contener el 70% de la cantidad total de gametos presentes en el epidídimo y conducto deferente, mientras que éste último contiene sólo el 2%. Mientras que los espermatozoides presentes en los testículos o en la cabeza del epidídimo son inmóviles e inmaduros, los que alcanzan la cola son generalmente móviles, maduros y capaces de fertilizar. Sin embargo, cuando dichos espermatozoides abandonan el epidídimo, su actividad es frenada por múltiples factores que son secretados por los conductos genitales del varón, por tanto, inmediatamente después de su expulsión en el semen, son incapaces de fecundar el ovocito.

Todos estos procesos se llevan a cabo durante el transporte desde la cabeza del epidídimo hasta la cola, lugar en el que quedan depositados los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación, en un tiempo que oscila entre los 12-21 días como norma general. Aunque la cola del epidídimo está adaptada para el almacenaje de espermatozoides, éstos no permanecerán viables indefinidamente; por lo tanto, tras un prolongado período de inactividad sexual el semen eyaculado presentará una mala calidad espermática, al margen de las altas concentraciones de espermatozoides que se puedan observar (Björndahl, 2003).

1.3.3 Semen

El semen es un fluido biológico que se observa tras la estimulación sexual y al que se denomina eyaculado. El semen presenta un componente sólido, celular, y un componente líquido, el plasma seminal, que vehiculiza al anterior. El componente celular está compuesto fundamentalmente por los espermatozoides formados en el epitelio seminífero de los testículos, aunque también aparecen otros tipos celulares como células germinales inmaduras, leucocitos y células epiteliales de los conductos eferente y deferentes, entre otras

(Johanisson *et. al.*, 2000). Menos de un 10% del volumen del semen de una eyaculación corresponde a los espermatozoides, y más del 90% al líquido seminal que se forma por el aporte de los testículos, el epidídimo, las vesículas seminales, la próstata, las glándulas de Cowper, las glándulas de Littre y los vasos deferentes (Björndahl, 2003).

El plasma seminal tiene varias funciones, como por ejemplo proteger a los espermatozoides del pH ácido de la vagina (Tevi-Benissam *et. al.*, 1997), proteger a los espermatozoides del efecto negativo de los radicales libres (Sanocka *et. al.*, 2004), participa en el proceso de coagulación y licuefacción del semen (Lilja *et. al.*, 1987) y proporcionar nutrientes a los espermatozoides (Mann, 1946).

1.3.4 Características del espermatozoide

Morfología del espermatozoide

El producto final de la espermatogénesis son los espermatozoides maduros. La morfología del espermatozoide maduro presenta partes bien diferenciadas, **la cabeza** que contiene el núcleo y aporta la información genética, **la pieza intermedia**, que contiene las mitocondrias, fuente de energía y **el flagelo**, que proporciona la movilidad necesaria para el traslado al lugar de fecundación y asegura la adecuada orientación de la cabeza para penetrar las cubiertas del ovocito. Todo ello rodeado por una membrana constituida por una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, fosfolípidos y proteínas (Toro-Montoya, 2009). En la Figura 1.6, se puede observar la estructura completa del espermatozoide.

En la cabeza se encuentra el núcleo, el cual contiene a la cromatina altamente condensada y está limitada anteriormente por el acrosoma, que favorecerá la unión con el ovocito.

El acrosoma es una estructura membranosa, situada entre el núcleo y la membrana plasmática. Se forma a partir del aparato de Golgi y contiene una gran concentración de hidratos de carbono y enzimas lisosómicas como la hialuronidasa y la acrosina, que favorecerán la rotura de las células de la granulosa para la penetración al ovocito. Cubre los dos tercios anteriores de la cabeza y está envuelto por la membrana acrosómica: la porción adherida a la envoltura nuclear por su parte interna es la membrana acrosómica interna y la membrana plasmática por su parte externa, membrana acrosómica externa

El núcleo ocupa la mayor parte de la cabeza, se encuentra en la parte post acrosomal y está delimitado por una membrana doble, la membrana nuclear. Es una masa de ADN haploide que se fusionará con el núcleo del ovocito en el momento de la fecundación. Su cromatina se ha condensado intensamente a fin de disminuir el volumen de la cabeza, lo que facilita la movilidad del espermatozoide a través de los diferentes fluidos y estructuras que debe atravesar. Además protege al genoma de daños durante el trayecto.

El **cuello** es la unión entre la cabeza y el flagelo y es una zona compleja y de gran importancia. Es muy corto y estrecho, por lo que no es visible mediante el microscopio óptico. El cuello es ligeramente más grueso que las demás partes del flagelo y contiene residuos citoplasmáticos de la espermátida.

Introducción

En la parte posterior de la cabeza, se localiza el centriolo distal, que origina la pieza media, y el otro, el proximal, desaparece luego de haber dado origen al flagelo. Contiene una placa basal de material denso que lo separa de la cabeza y es donde se anclan 9 columnas proteicas, que son centriolos modificados, continuándose por toda la cola.

La **pieza media** (de unos 4 o 5 μm de longitud), posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide produciendo ATP. El espermatozoide necesita esta energía para realizar su recorrido por el cérvix, el útero y las trompas de Falopio femeninas hasta llegar al ovocito para fecundarlo.

Y por último, la **cola**, que le proporciona movilidad (zona flagélica funcional recubierta sólo de membrana).

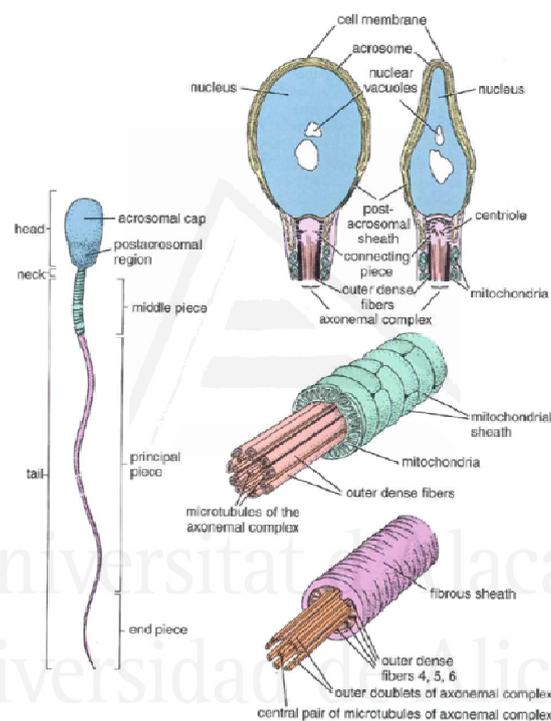


Figura 1.6. Representación esquemática de la estructura de un espermatozoide maduro. Las tres zonas del espermatozoide y sus componentes principales: cabeza, pieza intermedia y cola se observan en la figura (Imagen obtenida de Ross M, Kaye G.I, Pawlina W. Histología, 4ª edición, 2005; Edición Panamericana).

1.4 Esterilidad Masculina

El factor masculino representa uno de los problemas más comunes en el estudio de la pareja infértil; estando presente ya sea como factor único o de manera combinada con otro factor, en aproximadamente el 40% de las parejas estériles (Huidobro, 2010; Sigman *et. al.*, 2009).

Las causas de infertilidad masculina pueden clasificarse por su localización en tres categorías principales: pretesticular, testicular y posttesticular.

Pretesticular:

- Problemas endocrinos
- Hiperprolactinemia
- Hipopituitarismo
- Hipogonadismo
- Factores psicológicos
- Consumo excesivo de alcohol y drogas

Testicular:

- Defectos genéticos del cromosoma Y. Ej; microdeleciones del cromosoma Y.
- Conjunto anormal de cromosomas. Ej: Síndrome de Klinefelter
- Neoplasma
- Criptorcidismo
- Varicocele
- Trauma
- Síndrome de disgenesia testicular
- Exposición de los genitales a altas temperaturas, etc.

Posttesticular:

- Obstrucción de vías deferentes
- Infecciones
- Eyaculación retrógrada
- Hipospadias
- Defecto acrosomal

De todas las causas de infertilidad masculina, las más frecuentes son: varicocele (15.6%), hipogonadismo (8.9%), infección genitourinaria (8%) y criptorquidia (7.8%). Cuando no resulta posible esclarecer la etiología de la alteración se califica de esterilidad idiopática masculina. Es interesante destacar que, aproximadamente el 30% de los hombres infértiles tienen esterilidad idiopática (esterilidad masculina de causa u origen desconocidos) (Dohle *et. al.*, 2010). Estos varones consultan sin antecedentes de problemas de fertilidad y tienen unos resultados normales en la exploración física y las pruebas analíticas endocrinológicas (Jungwirth *et. al.*, 2012).

El seminograma, sin embargo, revela una disminución del número de espermatozoides (oligozoospermia), una reducción de la motilidad de los espermatozoides (astenozoospermia) y muchas formas anormales de espermatozoides (teratozoospermia); estas anomalías suelen aparecer juntas y se denominan síndrome de oligoastenoteratospermia (OAT).

Introducción

1.5 Estudio del semen

El análisis de semen o seminograma es el principal recurso a la hora de evaluar la fertilidad del varón en el estudio de la pareja infértil. Nos indica el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orienta sobre patologías del sistema genital (Vásquez *et. al.*, 2012).

Este análisis se basa en la evaluación macroscópica y microscópica de las características del espermatozoide. En esta prueba se analiza una muestra de semen obtenida tras masturbación y guardando un periodo de abstinencia sexual comprendido entre 3 y 5 días.

Las características macroscópicas que se deben analizar en el examen de una muestra seminal en fresco son el aspecto, la licuefacción, la viscosidad, el pH y el volumen. En cuanto al examen microscópico de la muestra valoraremos la concentración espermática, la motilidad, la vitalidad, la presencia de detritos y otros elementos celulares del semen, la aglutinación entre espermatozoides y la morfología.

A todo varón se le debe realizar al menos un espermiograma completo y en el caso de que se le vaya a realizar un tratamiento de reproducción asistida (TRA) donde se espere que los espermatozoides fecunden por sí solos, sin la intervención de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) debemos realizar una prueba diagnóstica de recuperación de espermatozoides móviles (REM).

El análisis de semen se realiza siguiendo las directrices establecidos en el último manual de la OMS, publicado en el año 2010 (OMS, 2010). Debe ser llevado a cabo por personal especializado y en un laboratorio con controles internos y externos de calidad (ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Comparación entre los valores de referencia OMS-1999 y los límites de referencia inferiores (LIR) según Manual OMS-2010.

Parámetros	OMS-1999	OMS-2015
pH	7.2-7.8	≥7.2
Volumen	2ml	1.5ml (1.4-1.7)
Concentración espermática	20x10 ⁶ /ml	15x10 ⁶ /ml
Concentración total	40x10 ⁶	39x10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos+no progresivos)		40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32%(31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	<1x10 ⁶ /ml	<1x10 ⁶ /ml
Anticuerpos antiespermatozoides	<50%	<50%

Los valores de referencia del seminograma corresponden a población fértil pero no indican fertilidad o esterilidad de manera absoluta, pues varones con seminogramas con parámetros por debajo de esos valores pueden conseguir gestaciones.

Cada uno de estos parámetros, los cuales serán descritos posteriormente en el apartado de Materiales y Métodos, nos brinda una información útil que nos permite valorar la calidad seminal. Sin embargo, aunque estos parámetros son importantes en la valoración inicial, el análisis básico del semen como herramienta única es insuficiente para determinar el status del varón infértil.

El semen se clasifica según los siguientes criterios:

- ◆ Concentración

Azoospermia: ausencia total de espermatozoides en el eyaculado (criterio OMS).

Oligozoospermia: concentración de espermatozoides por debajo de 15 millones/mL (criterio OMS).

Oligozoospermia severa: concentración de espermatozoides por debajo de 5 millones/mL (criterio OMS).

Criptoospermia: es la ausencia de espermatozoides en la observación microscópica de una muestra, pero observándose éstos al analizar el sedimento de la muestra tras centrifugación. (Término no descrito por OMS, pero aceptado internacionalmente).

Polizoospermia: concentración de espermatozoides > 250 millones/mL, no estando claro si esta elevada concentración es causa de esterilidad. (Término no descrito por OMS, pero aceptado internacionalmente).

- ◆ Viabilidad

Necrozoospermia: ≤ 58 % de espermatozoides no teñidos en test de vitalidad (criterio OMS).

- ◆ Motilidad

Astenoospermia: movilidad de los espermatozoides con motilidad a+b ≤ 40%, o bien ≤ 32% con motilidad a (criterio OMS).

- ◆ Morfología

Teratoospermia: bajo porcentaje de espermatozoides con formas normales. Aún no se ha podido establecer un valor de referencia con criterios de la OMS.

Estudios complementarios para el estudio de la infertilidad en el varón

Cuando el resultado del seminograma es anormal, se plantean otros estudios o exploraciones complementarias. Estos estudios se llevan a cabo, con el fin de identificar

Introducción

alteraciones potencialmente corregibles, desvelar anomalías genéticas transmisibles a la descendencia, diagnosticar afecciones relevantes para la salud del paciente y orientar sobre las posibles técnicas de reproducción asistida, con espermatozoides propios o asesorar acerca de alternativas para las que no sea posible usar gametos propios (Bassas, 2009).

Estos estudios complementarios son:

Cultivo microbiológico: cultivo del semen.

El estudio bacteriológico del semen está indicado en pacientes con clínica sugestiva de infección urinaria o prostatitis (Matorras *et. al.*, 2007). La infección del tracto genital y de las glándulas genitales anexas puede alterar la función reproductiva por diversos mecanismos: producción de radicales libres de oxígeno que afectan a la membrana espermática y la integridad del ADN, deterioro de la motilidad y la morfología espermáticas, disminución de la capacidad fecundante, cambios en la composición bioquímica del plasma seminal, producción de anticuerpos antiespermáticos (Bassas, 2009). El cultivo de semen identifica el tipo de bacteria y el tipo de antibiótico que mejor trataría la infección. El tratamiento con antibióticos es exitoso en erradicar infecciones de la uretra, próstata y conductos genitales.

Biopsia testicular:

En general la biopsia testicular está indicada con el objeto de diferenciar entre azoospermia obstructiva y no obstructiva en pacientes sin factor evidente, hormonas normales y tamaño testicular normal.

Además de tener información sobre el estado de la espermatogénesis, se recomienda la realización de ésta idealmente en el contexto de enviar simultáneamente muestras testiculares al laboratorio de reproducción asistida con el fin de aprovechar el procedimiento con fines terapéuticos y criopreservar espermatozoides en caso de ser encontrados (Huidobro, 2010). La biopsia testicular diagnóstica se realizará en condiciones que permitan criopreservar los espermatozoides que pudieran obtenerse, para su posterior uso en ciclos de ICSI.

Cariotipo y estudio de anomalías cromosómicas:

En determinados casos de factor masculino deben realizarse estudios en sangre (cariotipo) o en semen (meiosis, fragmentación de ADN) con el objetivo de descartar alteraciones cromosómicas y/o trastornos genéticos. El cariotipo resulta obligado para investigar las causas del hipogonadismo primario y de la azoospermia no obstructiva, a fin de descartar el síndrome de Klinefelter y otras anomalías cromosómicas que se relacionan con la infertilidad masculina. También en todos los casos de azoospermia de origen testicular o idiopática, y recomendable en oligozoospermias < 5 millones/mL (Bassas, 2009).

Estudios de fragmentación del ADN:

El índice de fragmentación del ADN espermático es considerado como buen predictor de fertilidad, habiéndose comprobado relación directa entre el incremento en la fragmentación

de ADN y el empobrecimiento de la calidad seminal, por lo que podrían formar parte del análisis rutinario del semen (Lopes *et. al.*, 1998; Sun *et. al.*, 1997; Irvine *et. al.*, 2000). Aunque todavía se desconoce la medida en la que esta fragmentación afectaría al índice de fertilización o desarrollo embrionario, los conocimientos actuales parecen otorgarle un papel etiológico importante en los abortos de repetición (Sharma *et. al.*, 2004).

En determinados casos también puede ser necesario realizar estudios de genética molecular:

Microdeleciones del cromosoma Y:

Su estudio está indicado en pacientes con azoospermia y oligozoospermia (< 5 millones/mL) de origen secretor. Se han podido identificar regiones de este cromosoma con alteraciones en genes que controlan la espermatogénesis, que solo tienen repercusión en la fertilidad siendo por lo tanto la causa de la esterilidad (Quilter *et. al.*, 2003).

Estudio de mutaciones CFTR:

Recomendada en todos los casos de agenesia (bilateral o unilateral) de conductos deferentes (Matorras *et. al.*, 2007).

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o Estudio de cromosomas espermáticos (FISH de espermatozoides):

Consiste en un estudio realizado en semen para valorar la dotación cromosómica de los espermatozoides, en concreto, los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, implicados en abortos y malformaciones fetales.

Determinaciones hormonales plasmáticas

Consisten en la medición en sangre de las hormonas que controlan el funcionamiento testicular. En la actualidad no está indicada la realización sistemática de determinaciones hormonales en los varones de parejas estériles. Se indicará determinación de los niveles de FSH en el varón en el caso de oligozoospermia severa y azoospermia, especialmente en esta última.

Algunos autores consideran aconsejable la determinación de los niveles plasmáticos de inhibina B, debido a que niveles bajos de Inhibina B parecen estar asociados con daños en la espermatogénesis (Pierik *et. al.*, 1998). Además, se evaluará la LH y la testosterona si hay disfunción sexual asociada, volumen testicular bajo signos de hipoandrogenización u otras endocrinopatías. El hipogonadismo secundario es una condición infrecuente, pero su identificación es importante porque puede ser tratado médicamente (Bassas, 2009; Matorras *et. al.*, 2007).

1.6 Factores ambientales que afectan la calidad seminal

Desde hace algunos años se han publicado estudios que sugieren que la calidad seminal y por tanto la fertilidad masculina en los países industrializados han ido declinando durante las

Introducción

últimas décadas (Carlsen *et. al.*, 1992; Mendiola *et. al.*, 2013; Swan *et. al.*, 1997), con un descenso de la concentración espermática más pronunciado en Europa (-2,3 %) respecto a Estados Unidos (-0,8 %) y a otros países (-0,2 %) (Fisch *et. al.*, 1996; Jørgensen *et. al.*, 2001; 2002).

Incluso en regiones próximas, existen importantes diferencias entre países (Punab *et. al.*, 2002). Mientras que en países como Finlandia (Jørgensen *et. al.*, 2011) o Francia (Rolland *et. al.*, 2013), los estudios indican una disminución temporal en los parámetros seminales, otros estudios no muestran este descenso en la calidad seminal (Axelsson *et. al.*, 2011; Jørgensen *et. al.*, 2012; Paulsen *et. al.*, 1996).

De hecho, el estudio realizado por Jørgensen *et. al.* entre 1996 y 2010, muestra un ligero incremento en el recuento total y la concentración espermática mientras que no se observan cambios en la motilidad y la morfología (Jørgensen *et. al.*, 2012). También parecen existir diferencias dentro de un mismo país. Swan *et. al.* encontraron que la concentración y motilidad espermáticas podrían verse reducidas en áreas semirurales y agrícolas, comparadas con áreas urbanas y con menos desarrollo agrícola (Swan *et. al.*, 2003).

Estos cambios en las muestras seminales se ha atribuido a exposiciones ambientales u ocupacional a tóxicos y/o contaminantes, estilos de vida o hábitos dietéticos pero que, en gran medida, son aún desconocidos o han sido insuficientemente estudiados (Bonde *et. al.*, 2014; Homan *et. al.*, 2007; Mendiola *et. al.*, 2009; Tielemans *et. al.*, 1999; Toft *et. al.*, 2006; Woodruff *et. al.*, 2010).

Es patente la importancia que está adquiriendo la asociación entre exposiciones medioambientales y calidad seminal en los últimos años. Distintos estudios han mostrado que estas sustancias tóxicas, podrían estar asociados con efectos adversos sobre el sistema reproductivo masculino, bien por afectación de la función endocrina (De Jager *et. al.*, 2006; Dhooge *et. al.*, 2006; Fernández *et. al.*, 2012; Stevens *et. al.*, 1998; Wyrobek *et. al.*, 1997), o de la espermatogénesis, resultando en una calidad seminal disminuida (Den Hond *et. al.*, 2015; Mocarelli *et. al.*, 2011; Sharpe, 2010). Paralelamente se ha producido, además, un incremento en las tasas de incidencia de anomalías genitales tales como la criptorquidia, hipospadias o el cáncer testicular (Fernández *et. al.*, 2007; Serrano *et. al.*, 2013; Sharpe *et. al.*, 1993).

Algunas de estas sustancias químicas que producen estos efectos lo hacen porque se comportan como hormonas, lo que significa que son capaces de incorporarse a los organismos vivos y alterar los mecanismos de actuación en los que participan las hormonas naturales (Diamanti-Kandarakis *et. al.*, 2009; Sharpe, 2003). Entre las alteraciones sobre la salud que han sido detectadas se incluyen enfermedades en sistemas dependientes de las hormonas y alteraciones en el desarrollo (Fernández *et. al.*, 2006).

Algunos autores han propuesto que el incremento en la incidencia de cáncer testicular (Moller *et. al.*, 1998; Sharpe *et. al.*, 1993), la pobre calidad seminal y el descenso en el recuento espermático en algunas regiones del mundo (Carlsen *et. al.*, 1992; Irvine *et. al.*, 1996; Mendiola *et. al.*, 2013; Rolland *et. al.*, 2013), el incremento en la frecuencia de criptorquidia e hipospadias (Audí *et. al.*, 2014; Fernández *et. al.*, 2007; Paulozzi *et. al.*, 1997),

junto con el aparente crecimiento en la demanda de reproducción asistida, no son más que signos de un problema de salud, con una base patofisiológica común al que denominaron Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS) (Skakkebaek *et. al.*, 2001).

La hipótesis incluye, además, como posible etiología a determinados factores ambientales y estilos de vida que determinan la exposición a un grupo específico de contaminantes ambientales o disruptores endocrinos, introducidos en el medio por la actividad humana, los cuales interfieren en la función hormonal normal, con mayor probabilidad de asociación causal que aquellos otros factores que suponen la acumulación de errores genéticos. Esto no excluye que ciertas aberraciones cromosómicas junto con una mayor predisposición por la presencia de polimorfismos específicos potencien el papel de los factores ambientales (Skakkebaek *et. al.*, 2001).

Datos de investigación clínica, básica y epidemiológica sugieren que el origen de todas las patologías anteriormente citadas se deriva de una alteración importante en la diferenciación de las células germinales que afectaría a la funcionalidad de las células de Sertoli o de Leydig (Rajpert-De Meyts *et. al.*, 2000). En el primer caso, una alteración de la función celular de las células de Sertoli se manifestaría clínicamente o bien como una pobre calidad seminal o como una mayor probabilidad de desarrollar cáncer testicular. En la otra vía la alteración de la función de las células de Leydig trae consigo insuficiencia androgénica que se manifestaría clínicamente como hipospadias y/o criptorquidia. Para añadir aun más complejidad a la hipótesis, se establecen relaciones de conexión entre estas dos vías (Sertoli y Leydig) y se propone que la expresión de los síntomas clínicos variará de tal manera que algunos individuos presentarán patología más severa que otros, pero siempre del ámbito del cuadro descrito (Skakkebaek *et. al.*, 2001). Mientras que en los casos más leves tan solo es apreciable una calidad seminal disminuida y el riesgo de cáncer testicular es mínimo, en los más severos junto con los problemas de la espermatogénesis, aparecerán alteraciones en el descenso testicular y una mayor probabilidad de cáncer testicular.

La hipótesis de causalidad de las hormonas medio ambientales o disruptores endocrinos es relevante y plausible, y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilbestrol (DES) o las alteraciones observadas en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, actualmente, como xenoestrógenos (Newbold *et. al.*, 1985; Soto *et. al.*, 1996).

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 transcurso de unas pocas generaciones orienta sobre la búsqueda de causas ambientales (Toppari *et. al.*, 1996), actuando quizás sobre un fondo de predisposición genética que implicaría alguna forma de susceptibilidad individual (Nef *et. al.*, 2000).

Introducción

1.7 Disruptores endocrinos

Definición de disruptor endocrino

El término disruptor endocrino (Endocrine Disrupting Chemicals) define a un conjunto de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso con capacidad de interactuar con el sistema endocrino (EC, 2007). El funcionamiento del sistema endocrino se basa en la secreción de hormonas, las cuales actúan como mensajeros químicos entre órganos, y se acoplan a receptores específicos desencadenándose el efecto hormonal deseado.

Los disruptores endocrinos (DE) pueden modificar este efecto por medio de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la competencia por su lugar de unión al receptor; así como la interferencia con la producción, liberación, transporte, metabolismo o eliminación de las hormonas y/o receptores (Olea, 2000). Entre los DE hay que destacar, debido a la importancia de sus efectos sobre el ser humano, los llamados xenoestrógenos, los cuales ejercen su acción a nivel de las hormonas sexuales (Olea *et. al.*, 2001b; Sikka *et. al.*, 2008). La Figura 1.7 explica una de las formas de actuación de los DE, la unión a los receptores diana.

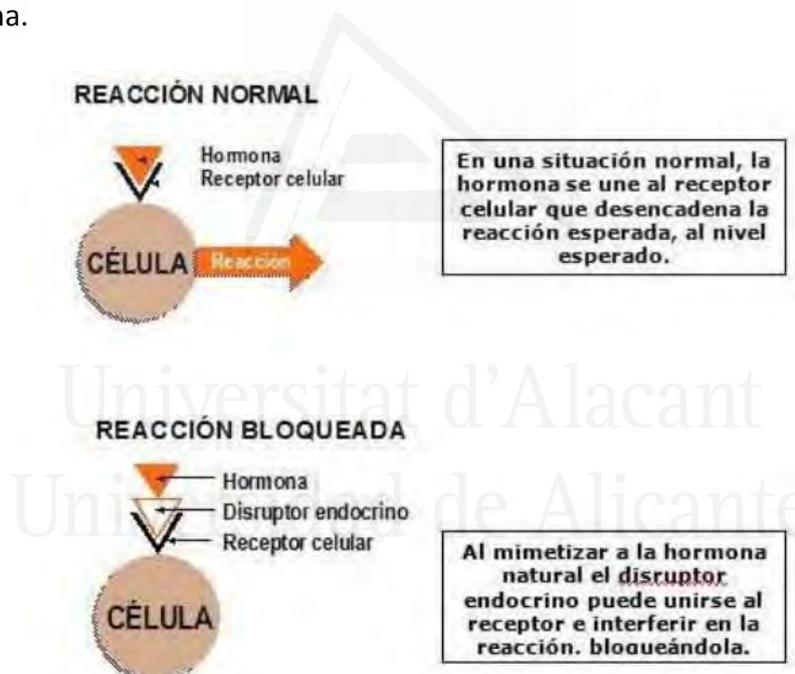


Figura 1.7. Mecanismo de acción de los disruptores endocrinos (DE)(Imagen obtenida de Moreno *et. al.* 2012)

En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido un efecto importante. 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 (Olea *et. al.*, 2001b). En otras ocasiones se trata de compuestos bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los conocidos y caracterizados COPs o contaminantes orgánicos persistentes (Arrebola JP *et. al.*, 2010; Porta *et. al.*, 2002; UNEP, 2001).

La capacidad de los contaminantes medio ambientales, para interferir en la función endocrina fue establecida hace más de 30 años cuando se asoció la caída en la población de pájaros piscívoros en los Estados Unidos, debido a problemas reproductivos graves, con la exposición medioambiental al DDT (Kruse *et. al.*, 2003). Otras observaciones medio ambientales relacionadas con la exposición masiva de poblaciones animales, han ayudado a entender el problema de la disrupción hormonal (Colborn *et. al.*, 1993).

Se ha descrito que la población general está expuesta a disruptores endocrinos por distintas vías, aunque predomina la vía alimentaria (Moser *et. al.*, 2001). También se sabe que las características fisicoquímicas confieren a cada sustancia un diferente grado de bioacumulación en los organismos y que por tanto la biomagnificación en la cadena trófica es un determinante de la exposición. Debido a este hecho se estima que no existen grupos de población humana libres de exposición, se trate o no de compuestos bioacumulables (Olea *et. al.*, 2001a).

Numerosos trabajos de investigación han evidenciado efectos adversos en la salud en humanos y animales derivados de la exposición a DE, los cuales incluyen: disfunción tiroidea, retrasos en el crecimiento, reducción de la capacidad reproductora manifestada por una disminución de la calidad seminal e infertilidad, alteraciones metabólicas, alteración del desarrollo fetal resultando en malformaciones congénitas del tracto urogenital como criptorquidia e hipospadias, así como aumento de la incidencia de ciertos tipos de tumores (cáncer testicular) (Audi *et. al.*, 2014; Guillette, 2006; Silver *et. al.*, 2000). Estos fenómenos se agravan si tenemos en cuenta que la exposición es múltiple y se pueden producir efectos sinérgicos y/o antagónicos entre los distintos residuos (Arrebola JP *et. al.*, 2010).

Mecanismos de los Disruptores Endocrinos

Los disruptores endocrinos pueden modificar este efecto por medio de diferentes mecanismos (Fernández *et. al.*, 1998):

- ◆ Mimetizar la acción de las hormonas, por ejemplo, los que actúan como estrógenos se denominan estrógenos ambientales.
- ◆ Antagonizar la acción de las hormonas, por ejemplo los anti-estrógenos o anti-andrógenos.
- ◆ Alterar su patrón de síntesis y metabolismo.
- ◆ Modular los niveles de los receptores correspondientes

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

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

Introducción

2) Las consecuencias se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto. Los efectos pueden permanecer latentes durante años y hacerse patentes en la descendencia, en lugar de en los individuos expuestos.

3) El umbral de concentración preciso por debajo del cual hay seguridad de no efecto no es conocido.

4) La combinación de compuestos actuando a través de un mecanismo común puede resultar en un efecto paradójico, ya sea sinérgico, antagónico o simplemente aditivo, difícilmente predecible.

Entre los disruptores endocrinos hay que destacar, debido a la importancia de sus efectos sobre el ser humano, algunos COPs, que se comportan en modelos animales como los estrógenos naturales. Entre los que se encuentran (Olea *et. al.*, 2002):

- ◆ Algunos bifenilos policlorados o PCBs, usados hasta hace poco en los transformadores eléctricos, como aceites refrigerantes o en la formulación de pesticidas.
- ◆ El grupo de los alquilfenoles, (p. ej. nonifenol) utilizados en los detergentes industriales en forma de polietoxilatos, como espermicida, como aditivo en la fabricación del plástico, como agentes de secado o como humectantes en la formulación de pesticidas.
- ◆ Algunos Ftalatos, (p.ej. n-butilftalato, benzibutilftalato) usados en la industria del envasado de alimentos, tratamientos de suelos, antioxidantes alimentarios, y como aditivos en el plástico proporcionándole elasticidad, en productos tales como bolsas de transfusión de sangre, tetinas y mordedores infantiles, entre otros.
- ◆ Absorbentes de radiación ultravioleta (derivados alquilados del ácido para -amino benzoico (PABA), 3-benzofenona) utilizados en una gran variedad de fórmulas comerciales: cremas solares, espumas, geles de baño con burbujas, barras de labios, entre otros productos.

1.8 Policlorobifenilos (PCBs)

La especificidad de este estudio sobre los contaminantes orgánicos clorados denominados PCBs (policlorobifenilos) hace necesaria la realización de una descripción detallada sobre las características generales más relevantes de estos compuestos.

Antecedentes

Los PCBs fueron descubiertos en 1865 como un subproducto en el alquitrán del carbón. Su síntesis fue descrita por primera vez en 1881 comenzando su producción comercial a finales de 1920. Por razones técnicas, los PCB se utilizaban como mezclas complejas cada una de las cuales podía contener entre 60-90 congéneres (Frame *et. al.*, 1996).

Entre los nombres comerciales de las mezclas producidas en los diferentes países se encuentran: la marca Arocloro, nombre comercial de mezclas de PCBs utilizado por la compañía Monsanto en los EEUU, Clofen de Bayer (Alemania), Diacloro de Sangano Electric (USA), Fenclor de Caffaro (Italia), Inerteen de Westinghouse Electric (USA), Piraleno de

Prodelec (Francia), Santotherm de Mitsubishi (Japón) y Kanecloro de Kanegofochi (Japón), entre otros (PNUMA, 2002; Breivik *et. al.*, 2007).

Se estima que se han producido cerca de 1,3 millones de toneladas de PCB en todo el mundo entre los años 1930 y 1993, de las cuales cerca del 97 % se utilizó en el hemisferio norte (PNUMA, 2002; Breivik *et. al.*, 2007).

En España se fabricaron en Flix (Tarragona), entre los años 1955 y 1984, en el complejo químico que hoy pertenece a ERCROS, bajo patente de Rhône-Poulenc (Francia), con los nombres de "Piraleno" o "Fenochlor". La producción total ascendió a 28.964 toneladas (Breivik *et. al.*, 2002). Los usos de los PCBs en España han sido muy variados, se estima que la mayor cantidad se encuentra en la actualidad en transformadores (Figura 1.8), condensadores y otros equipos que hayan continuado utilizando PCBs como fluidos dieléctricos.



Figura 1.8. Transformadores eléctricos

El Plan Nacional de Descontaminación y Eliminación de PCB, PCT y Aparatos que los contengan (2001-2010) estima que en el estado español deben existir 210.000 toneladas de aceites contaminados (MMA, 2001).

En la década de los 60, la producción y utilización de estos compuestos organoclorados aumentó considerablemente hasta los años 70 cuando diversos estudios toxicológicos constataron que estos compuestos provocaban efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente. A raíz de estos estudios, su producción comenzó a disminuir como resultado de su prohibición.

Características y estructura química

Los bifenilos policlorados (PCBs) presentan una estructura química básica compuesta por una molécula de bifenilo (unión de dos anillos de benceno) y entre 1 y 10 átomos de cloro. La cantidad y posición de los átomos de cloro en su estructura química genera un total de 209 tipos diferentes (congéneres), siendo su fórmula química $C_{12}H_{10-n}Cl_n$. La estructura base de un policlorobifenilo se ilustra en la Figura 1.9. Existen 10 posibles localizaciones para los átomos de cloro sustituyendo a los átomos de hidrógeno en la estructura bifenilo. Las posiciones se denominan orto (2 y 2', 6 y 6'), meta (3 y 3', 5 y 5') y para (4 y 4') (PNUMA, 2004).

Introducción

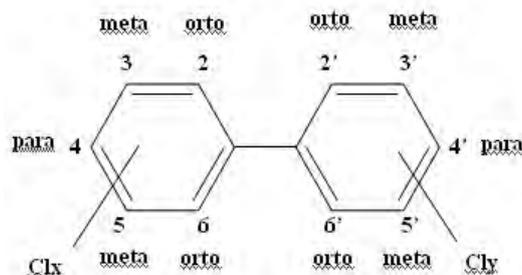


Figura 1.9 Estructura química de los PCBs

Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos dependen del grado de cloración y de la posición de los átomos de cloro. Por lo general son compuestos muy estables, buenos aislantes eléctricos, con baja volatilidad a temperatura ambiental, resistentes al fuego, insolubles en agua y con alta solubilidad en solventes orgánicos.

La estabilidad química y su resistencia a la degradación a elevadas temperaturas les hacen ser considerados inertes. No sufren hidrólisis, ni oxidación bajo condiciones típicamente encontradas en sistemas industriales. Mientras que la estabilidad es importante en sus aplicaciones industriales, también es una de las razones de su persistencia y distribución global incluso después de décadas desde la prohibición de su fabricación.

También son resistentes a degradaciones químicas y biológicas en el medio natural, siendo esta propiedad mayor cuanto más elevado es el grado de cloración de los mismos. De forma general, la solubilidad en agua y la presión de vapor disminuyen a medida que aumenta el grado de cloración, mientras que su carácter lipófilo, se incrementa a medida que aumenta el número de átomos de cloro en la molécula (Mackay *et. al.*, 1992).

Aplicaciones Industriales

Precisamente, algunas de estas propiedades hicieron que los PCBs se utilizaran ampliamente en diversas aplicaciones industriales y comerciales. Los usos o aplicaciones de los PCBs se han clasificado según su presencia en: sistemas cerrados, sistemas parcialmente cerrados y sistemas abiertos.

Los **sistemas cerrados** se refieren a equipos donde los PCBs se encuentran formando parte de una mezcla en estado líquido de una manera estanca. La mayor parte fueron usados por la industria eléctrica como fluidos dieléctricos en sistemas cerrados (transformadores y condensadores de motores eléctricos y electroimanes); pero también se emplearon en instalaciones industriales, operaciones mineras y militares, e incluso en diversos artículos eléctricos y electrodomésticos de uso cotidiano, como por ejemplo, en los condensadores para el arranque del motor en refrigeradores, sistemas de calefacción, acondicionadores de aire, secadores del pelo y en motores de bombas hidráulicas; incluso en las lámparas fluorescentes y en las luces de neón producidas antes de 1978 y fabricadas en Estados Unidos.

Los **sistemas parcialmente cerrados** se refieren a sistemas donde los PCBs tienen la posibilidad de evaporarse al no estar confinados completamente. Se utilizaron en sistemas parcialmente cerrados, como líquidos de termo-transferencia, fluidos refrigerantes, fluidos hidráulicos y en bombas de vacío, y pudieron contaminar otros equipos eléctricos durante su funcionamiento y mantenimiento, como interruptores y reguladores de voltaje.

En **sistemas abiertos** no existe ningún impedimento para la transferencia a la atmósfera de los PCBs. En aplicaciones abiertas se usaron principalmente como plastificantes en la fabricación de PVC, neopreno, selladores de goma, selladores para juntas de hormigón y empaque. Además, se utilizaron como lubricantes en aceites de inmersión para la preparación de microscopios, revestimiento de frenos en la industria automotriz, y aceites para corte; como ceras y aditivos de fundición; como retardantes de llama en pinturas y plásticos; como adhesivos especiales para revestimientos de pared repelentes al agua y en otros usos como material aislante.

Tabla 1.2 Aplicaciones industriales más comunes de los PCBs (Bejarano, 2004).

Sistema	Aplicaciones
Cerrado	Transformadores eléctricos Condensadores eléctricos Motores eléctricos Electroimanes
Parcialmente cerrados	Fluidos refrigerantes, Fluidos hidráulicos ,etc
Abierto	Lubricantes: Aceites de inmersión para microscopios, Aceites de corte, Revestimiento de frenos, etc. Recubrimientos de superficies: Pinturas, Tratamiento de textiles, Retardantes de llama Adhesivos: Adhesivos especiales ,Adhesivos para recubrimiento de pared repelente al agua Plastificantes: Selladores de empaquetado, Selladores para juntas de hormigón, Selladores de caucho Tintas: Tintes,Tintas de impresión

Los PCBs además de ser un producto industrial, se producen de manera no intencional en varios procesos industriales, incluyendo la fabricación de PVC y magnesio, la incineración de residuos peligrosos, hospitalarios y municipales, la quema de aceites contaminados y otros residuos clorados en hornos de cemento, en incendios accidentales de equipos eléctricos, en emisiones de tráfico marino, entre otros procesos (Breivik *et. al.*, 2002).

Aunque la producción de estas sustancias ha sido prohibida en la mayoría de países industrializados, la liberación de PCBs al ambiente continúa como consecuencia del uso y la eliminación inadecuada de estos productos, así como de escapes y vertidos de materiales que contienen PCBs.

Introducción

Estimaciones realizadas por expertos de la Unión Europea señalan que más de 6000 toneladas de estos productos se vierten cada año al medio ambiente, de las cuales 600 son emitidas a la atmósfera y el resto se trata como residuos (EC, 2006). Entre las principales fuentes de emisión de PCBs a la atmósfera destacan la generación de energía, el transporte por carretera y la industria metalúrgica, en especial la producción de hierro y acero (Tabla 1.3) (EC, 2006).

Tabla 1.3 Principales fuentes emisoras de PCBs a la atmósfera en Europa (EC, 2006).

Actividad	Cantidad (kg/año)
Generación de energía	1500
Transporte por carretera	1400
Producción de hierro y acero	500
Hornos de arco eléctrico	350
Producción de carbón	200
Cementeras	200
Industria química	200
Plantas de sinterización	100
Industria de la pulpa y del papel	90
Refinerías de petróleo	65
Incineradoras de residuos sólidos urbanos	50
Instalaciones de calefacción domésticas	50

1.8.1 PCBs similares a dioxinas

Dentro de los 209 congéneres existe un conjunto de 12 PCBs coplanares denominados “PCBs similares a dioxinas” o dl-PCBs (del inglés dioxin-like PCBs) que presentan una configuración espacial plana que les confiere propiedades parecidas a la molécula de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2378-TCDD) (Ver Figura 1.10), especialmente en cuanto a su toxicidad (Van Leeuwen *et. al.*, 2000).

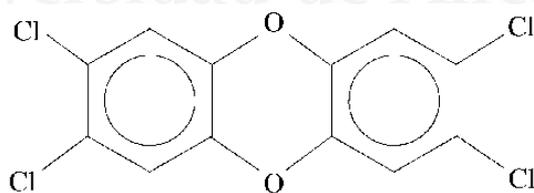


Figura 1.10 Estructura de la (2,3,7,8-TCDD)

Según la posición de los átomos de cloro en el anillo bifenilo, los dl-PCBs se dividen en 2 grupos: PCBs coplanares o no-orto sustituidos y PCBs mono-orto sustituidos. Esta clasificación tiene su importancia cuando se estudia el nivel de toxicidad debido a que el anillo bifenilo con estructura espacial plana tiene más tendencia a actuar como disruptor endocrino.

PCBs no-orto: no tienen átomos de cloro en las posiciones orto- (2,2',6,6'), tienen átomos de cloro en las dos posiciones para- (4,4') y al menos un átomo de cloro en una posición meta- (3,3',5,5'). Son los más tóxicos.

PCBs mono-orto: derivados de los PCBs no-orto con un átomo de cloro en posición orto.

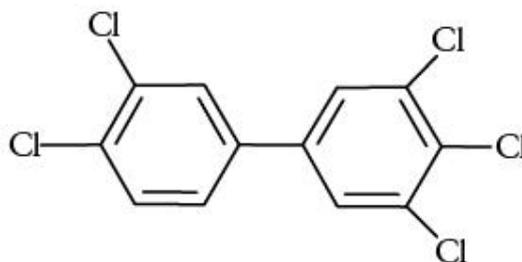


Figura 1.11 Estructura del 3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo (PCB-126)

En la Figura 1.11 se muestra la estructura química del PCB-126 (3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo), que es uno de los compuestos de mayor toxicidad dentro de la familia de los PCBs.

La toxicidad de estos compuestos depende del grado de cloración, la posición de los átomos de carbono en el anillo bifenilo y de la capacidad para adoptar una configuración plana similar a la de la 2,3,7,8-TCDD, que está energéticamente menos impedida en el caso de los PCBs no-orto, al presentar estos congéneres un menor impedimento estérico (Grimm *et. al.*, 2015).

Factores de toxicidad

Cuando se analiza el contenido en dioxinas de una muestra real normalmente no se obtiene un solo compuesto, sino que en realidad en estas muestras coexisten tanto los isómeros tóxicos como el resto de los congéneres en diferentes cantidades y cada uno de ellos con diferente toxicidad. Por lo que conocer la concentración absoluta de cada compuesto no proporciona mucha información cuantitativa acerca de las características toxicológicas de la muestra.

Para poder relacionar la toxicidad de los distintos congéneres se utilizan los Factores de Equivalencia Tóxica (TEFs, del inglés Toxic Equivalency Factors), que indican la relación entre la toxicidad del congénere implicado frente a la del compuesto más tóxico, la 2,3,7,8-TCDD, a la que se le asigna un TEF igual a 1. La utilización de estos factores presupone que la toxicidad es aditiva, y que no hay efectos antagonistas.

Al multiplicar la concentración o cantidad de cada congénere por el TEF correspondiente se obtiene un valor equivalente tóxico (TEQ, del inglés Toxic Equivalent). La suma de todos los TEQs de los distintos congéneres analizados en la muestra da el valor de toxicidad equivalente total (TEQ total), que permite a través de un valor numérico expresar el grado de toxicidad de una muestra y facilita su comparación con otras.

Existen dos listas de TEF comúnmente aceptadas: los I-TEF o factores de equivalencia internacionales propuestos por la Organización del Tratado del Atlántico Norte (NATO/CCMS 1988 a, b) y los WHO-TEF propuestos por la Organización Mundial de la Salud (Van den Berget. *al.*, 1998; 2006). En la Tabla 1.4 se muestran los valores de estos factores los de los dl-PCBs (sólo considerados en los WHO-TEF).

Introducción

Tabla 1.4 Factores de equivalencia tóxicos para los 12 PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs)

Nombre IUPAC	Compuesto	WHO-TEF (1998)	WHO-TEF (2005)
PCBs no-orto			
PCB-77	3,4,4',5-Tetraclorobifenilo	0.0001	0.0001
PCB-81	3,3',4,4'-Tetraclorobifenilo	0.0001	0.0003
PCB-126	3,3',4,4',5-Pentaclorobifenilo	0.1	0.1
PCB-169	3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenilo	0.01	0.03
PCBs mono-orto			
PCB-105	2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenilo	0.0001	0.00003
PCB-114	2,3,4,4',5-Pentaclorobifenilo	0.0005	0.00003
PCB-118	2,3',4,4',5-Pentaclorobifenilo	0.0001	0.00003
PCB-123	2',3,4,4',5-Pentaclorobifenilo	0.0001	0.00003
PCB-156	2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenilo	0.0005	0.00003
PCB-157	2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenilo	0.0005	0.00003
PCB-167	2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenilo	0.00001	0.00003
PCB-189	2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenilo	0.0001	0.00003

Mecanismo de acción de los dl-PCBs

Los dl-PCBs y en general los compuestos conocidos como tipo-dioxinas, es decir, las policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs) y los policlorodibenzofuranos (PCDFs), desencadenan su acción tóxica cuando interaccionan con un receptor celular llamado AhR (Birnbaum, 1994; Safe *et. al.*, 1985; 1998). Aunque los mecanismos que regulan la toxicidad inducida por las dioxinas no se conocen completamente a nivel molecular, una gran cantidad de evidencias experimentales indican que se encuentran mediados por el AhR (Pocar *et. al.*, 2005).

La estructura lipofílica de los PCB permite su entrada a la célula a través de la membrana celular por difusión pasiva y llega al citosol. Diversos efectos biológicos de los PCB y las dioxinas están mediados por la activación del receptor aril hidrocarburo, un factor de transcripción ligando dependiente (AhR) (Schmidt *et. al.*, 1996). El mecanismo de acción propuesto es que en el citosol los PCB funcionan como ligandos del receptor AhR, al que se unen con una alta afinidad en el rango nanomolar (Safe *et. al.*, 1985).

El AhR es miembro de la familia de los receptores esteroides y es un factor de transcripción activado por ligandos que controla la expresión de varios genes, entre los que están los de los citocromos. El AhR tiene unidos dos monómeros de hsp90 (heat shock proteins 90) y uno de XAP2 (hepatitis virus B X-associated protein 2), una proteína que se identificó previamente como cochaperona (Denison *et. al.*, 2003) (Figura 1.12).

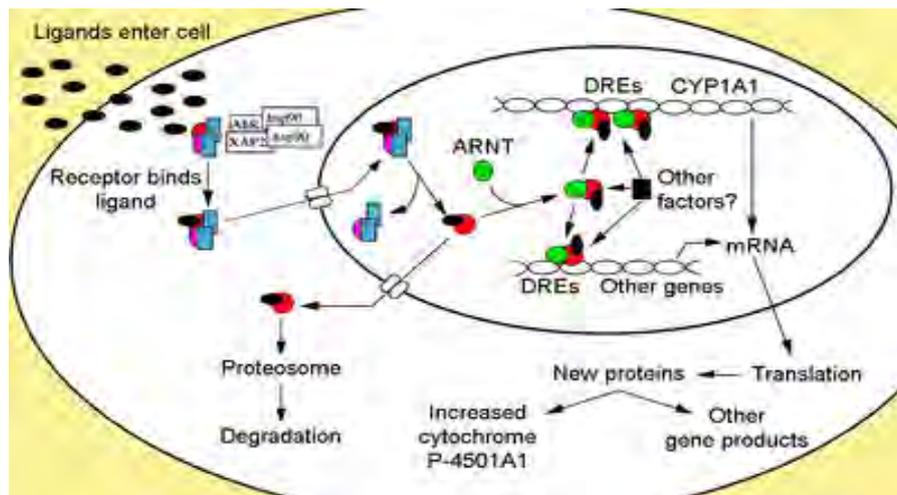


Figura 1.12 Mecanismo molecular de la activación del receptor aril hidrocarburo (AhR) por los PCB.
(Modificado de Denison *et. al.*, 2003).

La unión del ligando, es decir, el PCB, produce la disociación del oligómero, desplazando las proteínas hsp90. A partir de aquí se proponen dos rutas: en una hay un aumento rápido de la actividad tirosinquinasa y en la otra se forma un heterodímero con el translocador nuclear de AhR (ARNT) para formar el complejo L-AhR-ARNT (Anderson, 2003; Guyot *et. al.*, 2013; Pocar *et. al.*, 2005; Sorg *et. al.*, 2013). Este heterodímero se transloca al núcleo para unirse a regiones específicas del ADN, como los genes DRE (dioxin responsive element), y posteriormente se une a otras regiones del ADN con una secuencia específica de reconocimiento (GCCTG) para regular la velocidad de transcripción de genes específicos, lo cual implica una activación de genes como Cyt-P450 CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 (Abel *et. al.*, 2010; Beischlag *et. al.*, 2008; Bock *et. al.*, 2009; Gauger *et. al.*, 2007; Schmidt *et. al.*, 1996). Los cambios en la expresión génica conducen a alteraciones de los procesos celulares y sus funciones (Carpenters, 2015; Martínez *et. al.*, 2002; Mimura *et. al.*, 2003; Kitajima *et. al.*, 2004). Uno de éstos es el incremento de la actividad del citocromo P-450 1A1, que provoca la generación de metabolitos tóxicos (Denison *et. al.*, 2003).

Los principales metabolitos que se forman son los PCB hidroxilados (OH-PCBs) y los PCB metilsulfonados por conjugación con glutatión (MeSO₂-PCBs), los cuales podrían actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos. Algunos efectos estrogénicos podrían ser indirectos, la activación del sistema P450 incrementaría el metabolismo del estradiol, alterando la función estrogénica (ATSDR 2000; 2011; Kitamura *et. al.*, 2005; Quinete *et. al.*, 2014; Safe, 2001; 2003).

Adicionalmente se han propuesto otros mecanismos por el cual los dl-PCBs pueden ejercer su acción. La unión de compuestos similares a dioxinas al receptor AhR, podría activar la fosforilación de importantes proteínas en el citosol, membrana plasmática y otras organelas intracelulares, produciendo cambios en la señal de transducción y en la expresión de los genes, proliferación celular, inhibición de la apoptosis e incremento de la invasividad celular, lo que podría estar ligado a los procesos de carcinogénesis (Hayes *et. al.*, 2009; IARC, 2013; Long *et. al.*, 1998; Lucena *et. al.*, 2001).

Introducción

1.8.2 Vías de exposición

Los PCBs son omnipresentes en el medio ambiente, no obstante las vías de exposición fundamentales mediante las cuales los seres humanos pueden verse expuestos a estos contaminantes son la ingestión oral, el contacto dérmico y la inhalación (Liem *et. al.*, 1991); cabe destacar que las 2 últimas tienen mucha menor importancia y por consiguiente suponen un riesgo mucho menor.

Ingesta oral

Para la población en general la vía de exposición más importante a los PCBs tipo dioxinas son los alimentos. Esta vía representa más del 95 % de la exposición de estos contaminantes y en los que ocupan un lugar destacado los alimentos de origen animal (Malisch *et. al.*, 2000).

Las fuentes que tienen mayor influencia en el contenido de PCBs similares a dioxinas en la dieta de los humanos son los alimentos con alto contenido en grasas como son las carnes, huevos, leches y productos lácteos y pescados (Avkhimenko, 2000; Kiviranta *et. al.*, 2001). Un estudio llevado a cabo en productos lácteos, pescados, cárnicos, huevos, vegetales, legumbres, cereales y frutas, demostró que los alimentos procedentes del mar fueron los que mayor nivel de contaminación presentaban. El aporte en la ingesta diaria correspondió en un 80 % a los pescados, seguido por la leche y la carne (Llobet *et. al.*, 2003).

Otras fuentes de contaminación son los piensos de consumo animal contaminados con aceites industriales, la aplicación incorrecta de los fangos de depuradora como fertilizantes agrícolas, algunos procesos de elaboración de alimentos, así como los vertidos de aguas residuales sin tratar sobre terrenos dedicados a la ganadería (Ábalos *et. al.*, 2008; Bernard *et. al.*, 1999; Malisch, 2000).

No obstante, dentro de la población general algunos grupos pueden estar expuestos a cantidades elevadas de compuestos tipo dioxinas debido a sus hábitos de consumo, como pueden ser los bebés lactantes y los grandes consumidores de pescado. La cantidad de estos contaminantes que se acumula en el organismo durante toda la vida de las personas es la denominada carga corporal (Ábalos *et. al.*, 2010).

El hecho de que durante la lactancia materna los bebés puedan estar expuestos a grandes cantidades de estos compuestos provoca una gran preocupación a nivel mundial. Este hecho explica los incontables estudios llevados a cabo para evaluar su presencia en leche materna, así como los posibles efectos que provocan en los recién nacidos (Dewailly *et. al.*, 1991; Konishi *et. al.*, 2006; Srogi, 2008).

Contacto dérmico e inhalación

Afortunadamente, la exposición directa debido a la fabricación de productos que contienen PCBs no ocurre en la actualidad, aunque hay que destacar que pueden producirse exposiciones durante el mantenimiento o reparación de equipamientos que contengan estos contaminantes. A día de hoy, los PCBs se encuentran fundamentalmente en transformadores y condensadores fabricados antes de 1977, así como en equipos industriales antiguos (por

ejemplo, soldadores), en aparatos médicos (equipos de rayos X) o en dispositivos domésticos (televisores y refrigeradores) fabricados hace más de 35 años (EC, 2006).

Por otra parte, la inhalación de estos contaminantes presentes en el aire también constituye una vía de exposición de estos compuestos en humanos. Algunos estudios revelan que solo el 2-3 % de la concentración total de dioxinas presentes en individuos que viven en ciudades industrializadas proviene de la inhalación de estos compuestos (Harrad *et. al.*, 2006; Prinz *et. al.*, 1993).

1.8.3 Efectos sobre la salud humana de los dl-PCBs

Los PCBs han demostrado poseer la capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de los animales y en particular de los seres humanos. Los datos obtenidos de estudios en humanos y en animales de laboratorio, especialmente mamíferos, proporcionan fuerte evidencia de la toxicidad potencial de la exposición crónica a los bifenilos policlorados (Dhanabalan *et. al.*, 2011; Carpenter, 2006; Fierens *et. al.*, 2007; Srogi, 2008; US EPA, 2014).

Información de los efectos causados por los PCBs sobre la salud humana se han obtenido de estudios de población expuesta ambiental y laboralmente, de personas que consumieron accidentalmente aceite de arroz contaminado en los incidentes de “Yusho” en Japón (1968) y de “Yu-Cheng” en Taiwán (1978-1979), y por el consumo de pescado contaminado y otros productos alimenticios de origen animal (Masuda, 1996; Furue *et. al.*, 2005).

Los estudios en humanos son complicados por la exposición a diferentes mezclas de PCBs y las posibles interacciones entre los congéneres y otros compuestos químicos (dioxinas, furanos y otros) (ATSDR 2000; 2011). Efectos sobre la salud asociados a la exposición a PCBs en los seres humanos y/o animales incluyen alteraciones en hígado, en la tiroides, cambios dérmicos y oculares, bajo peso al nacer, también pueden producir irritación de nariz y pulmones.

Se ha comprobado que los PCBs causan cáncer, así como un número importante de efectos de naturaleza no cancerígena, que alteran el equilibrio hormonal, afectando a los sistemas reproductor, nervioso e inmunológico (ATSDR, 2000). Exposiciones pre y postnatal a PCBs estarían relacionadas con deficiencias en el desarrollo neurológico y en el aprendizaje en el niño expuesto, déficit en el desarrollo psicomotor y en el comportamiento, alteraciones de la memoria y del coeficiente intelectual. Estos efectos también han sido reportados en la población infantil por exposición prenatal a PCBs y PCDFs en los incidentes de Yusho y Yu-Cheng (ATSDR, 2000; Carpenter, 2006; US EPA, 2014).

Exposición a dl-PCBs y sus efectos sobre la salud reproductiva y la calidad seminal

El impacto negativo que pueden ejercer estos tóxicos medioambientales sobre el sistema reproductor masculino y por ende en la calidad seminal, depende de muchos factores, entre ellos el grado de toxicidad, la duración de la exposición y el mecanismo de acción. Dependiendo de estos factores se observa disminución de la calidad seminal y/o reducción de la fertilidad (Mocarelli *et. al.*, 2008).

Introducción

Estudios en animales de experimentación han demostrado claros efectos tóxicos por parte de estas sustancias, tanto a corto plazo como en exposiciones crónicas. Hay numerosos estudios que relacionan la exposición a estos contaminantes con alteraciones en la reproducción animal como pueden ser: disminución de la fertilidad, del tamaño de testículos y epidídimo, reducción de la motilidad y de las formas normales de los espermatozoides en ratas expuestas perinatalmente (Gray *et. al.*, 1993; Faqui *et. al.*, 1998; Peterson *et. al.*, 1993; Ping Shu *et. al.*, 2004).

La disminución de la espermatogénesis es la respuesta más sensible del sistema reproductor masculino (Oliva *et. al.*, 2001). Algunos de los efectos observados en la espermatogénesis son espermatoцитos degenerados y espermatozoides maduros en los túbulos seminíferos; también se ha observado disminución en el número de túbulos que contienen espermatozoides maduros (Mably *et. al.*, 1992 a,b).

Los dl-PCBs, actúan como disruptores endocrinos. En términos generales el carácter estrogénico depende del porcentaje de cloro de la molécula (a menor cloración en la molécula, mayor estrogénicidad) y la estabilidad se incrementa con la cloración (Bonfeld-Jorgensen *et. al.*, 2001).

Lilienthal *et. al.* demostraron que la exposición a mezclas de PCBs durante el desarrollo causa feminización en ratas macho adultas, debido a sus efectos sobre las hormonas esteroides, produciendo dimorfismo sexual (Lilienthal *et. al.*, 2013). Por otro lado, la 2,3,7,8-TCDD es el más potente inductor del receptor de andrógenos (Henriksen *et. al.*, 1996). Se ha demostrado la alteración en la producción de testosterona por efecto de estos compuestos sobre la aromataasa y el efecto antiandrogénico por el bloqueo de los receptores de andrógenos, derivación muy grave para el desempeño reproductivo de los machos, representado en alteraciones en la calidad espermática (Andersson, 2003; Gregoraszcuk 2002).

Sin embargo, la información disponible sobre efectos de estos compuestos en reproducción humana es limitada. Desde el último cuarto del siglo pasado hasta la fecha se han publicado varios estudios sobre los efectos adversos en la calidad seminal, asociados a la exposición a xenobióticos, sin embargo pocos estudios han analizado el efecto de PCBs similares a dioxinas sobre los parámetros seminales (Leijs *et. al.*, 2014).

1.9 Metodología analítica de dl-PCBs en muestras biológicas

El análisis de PCBs ha experimentado grandes avances en las últimas décadas como resultado del gran interés mostrado por parte de la comunidad científica involucrada en el estudio de estos contaminantes. En los años 70 se publicaron los primeros métodos analíticos que tenían como objetivo la identificación de estos compuestos en muestras biológicas (Firestone *et. al.*, 1972; Campbell *et. al.*, 1966).

Fue a partir de estos momentos cuando empezaron a desarrollarse un gran número de investigaciones sobre distintas posibilidades de mejora de los métodos analíticos para compuestos similares a dioxinas, especialmente los aspectos relacionados con los métodos

de detección, debido a la menor concentración de estos compuestos respecto a sus congéneres no coplanares, y para evitar interferencias.

El nivel de sofisticación que se emplee en el análisis de dl-PCBs dependerá de los objetivos perseguidos. En aquellos casos en los que los objetivos son principalmente un “estudio rápido” de las muestras para identificar los compuestos de manera cualitativa o semicuantitativa pueden llegar a ser adecuados los bioensayos rutinarios (CALUX bioassay). En otros casos donde el objetivo del análisis es cuantificar con precisión los isómeros específicos de dl-PCBs, se emplearán procedimientos analíticos más complejos.

La elevada toxicidad de estos compuestos en el medio obliga a disponer de métodos analíticos fiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan detectar estos compuestos tóxicos en las muestras biológicas de origen humano. Debido a ello la tendencia en el análisis en los últimos años se ha dirigido hacia la búsqueda de métodos analíticos adecuados para el análisis de los contaminantes ambientales.

Los procedimientos analíticos para la determinación de dl-PCBs son procesos laboriosos y complejos debido a la elevada complejidad de las matrices biológicas y la baja disponibilidad de las mismas. Además, los contaminantes ambientales están presentes en las matrices biológicas a niveles traza (ppb, ppt), mientras que otros componentes de la matriz alcanzan elevadas concentraciones.

Los métodos de análisis internacionalmente reconocidos (EPA 1613, EPA 23, Norma Europea EN1948) siguen criterios similares que se diferencian principalmente por el tipo de matriz en la que se encuentran los compuestos de interés, aunque comparten los siguientes requisitos (Rappe, 1987):

- ♦ Alta sensibilidad y bajos límites de detección. El intervalo de concentraciones al cual estos compuestos manifiestan su carácter tóxico se encuentra al nivel de pg/g, fg/m³, etc.
- ♦ Alta selectividad. La metodología analítica debe permitir una clara diferenciación frente a otras sustancias interferentes cuyos niveles pueden ser varios órdenes de magnitud superiores.
- ♦ Alta especificidad. La capacidad para realizar una discriminación específica de aquellos compuestos que queremos identificar.
- ♦ Alta precisión y exactitud. La determinación de estas sustancias debe aportar un valor de concentración que se aproxime al máximo al valor real y con la menor dispersión posible.

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos métodos para el análisis de los diferentes tóxicos ambientales en muestras de sangre (Viso *et. al.*, 2009; Salihovica *et. al.*, 2012; Aylward *et.al.*, 2014). La sangre constituye una matriz ideal para muchos contaminantes persistentes lipofílicos como los pesticidas organoclorados (aldrin, dieldrin, chlordano...), PBDEs, PCDD/Fs o dl-PCBs, ya que está en contacto con todos los tejidos y en equilibrio con los órganos donde se pueden depositar estos compuestos (Roca *et. al.*, 2013). Además, presenta la ventaja de poder determinar directamente el compuesto original, en lugar de los metabolitos, por tanto no se requieren detalles sobre el metabolismo del analito.

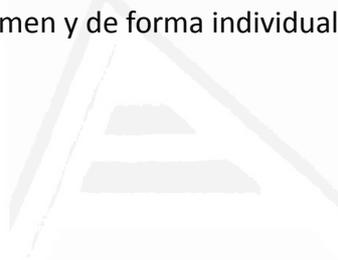
Introducción

Por estos motivos, es utilizada con más frecuencia debido a que supone un método de muestreo menos invasivo.

Sin embargo, el análisis de sangre presenta los inconvenientes de la obtención de la muestra, la limitación de la cantidad de sangre disponible y los bajos niveles de concentración de los contaminantes presentes en la matriz.

En general, cuando se trabaja con muestras de suero, al igual que con muestras de plasma o sangre total, hay que considerar la limitación de la muestra disponible. Por este motivo en los estudios de biomonitordeo poblacional, para analizar el suero se suele realizar una mezcla global y homogénea de varias muestras individuales para realizar las determinaciones de PCBs.

Aunque para el análisis de estos compuestos se han utilizado básicamente grandes volúmenes de muestras de sangre, la tendencia actual se centra en desarrollar nuevos métodos que permitan el análisis en muestras de bajo volumen lo cual facilitaría el estudio individualizado (Patterson *et. al.*, 2011). Sin embargo, debido a la dificultad que requiere la determinación de estos compuestos existen pocos estudios que lleven a cabo el análisis de dl-PCBs en muestras de bajo volumen y de forma individualizada.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. Objectivos



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de Trabajo

En las últimas décadas varias publicaciones han sugerido que la disminución de la calidad seminal, así como un aumento de las tasas de anomalías en el desarrollo del tracto urogenital y cáncer testicular podría estar relacionada con la exposición a sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal (disruptores endocrinos- DE).

Se ha señalado que al menos la mitad de los casos de esterilidad de etiología desconocida del varón podrían atribuirse a distintas exposiciones profesionales y/o ambientales. Sin embargo, las evidencias que asocian desórdenes como la baja calidad seminal con exposiciones a disruptores endocrinos (ocupacionales o ambientales) son todavía limitadas.

Basándonos en estos trabajos y publicaciones previas nos hemos planteado la siguiente hipótesis de trabajo: *La presencia en suero de contaminantes ambientales con actividad hormonal como los PCBs similares a dioxinas podría estar asociado con el deterioro de la calidad seminal, y como consecuencia con la esterilidad masculina.*

2.2 Objetivos generales y Específicos

Objetivo General

Analizar la influencia de los PCBs similares a dioxinas sobre la calidad seminal de pacientes con problemas de fertilidad, incluidos en el Programa de Reproducción Asistida, de la clínica de Fertilidad IVF Spain de Alicante.

Objetivos técnicos específicos

- 1) Desarrollar una metodología de análisis de PCBs similares a las dioxinas en muestras de pequeño volumen de suero sanguíneo humano. El método deberá lograr un compromiso entre el bajo límite de detección necesario, fiabilidad y el mínimo consumo de reactivos, con objeto de reducir al máximo el coste del análisis.
- 2) Determinar la concentración PCBs similares a dioxinas en muestras de suero sanguíneo de la población de estudio mediante la aplicación de la metodología de análisis desarrollada por nuestro grupo de trabajo.
- 3) Analizar el grado de asociación entre los niveles de PCBs determinados en suero sanguíneo y la calidad seminal de los sujetos de estudio.
- 4) Determinar que variables socio-demográficas y clínicas recogidas por un Cuestionario *ad hoc* (cumplimentado por el donante: estilos de vida, hábitos, profesión) se asocian con los niveles de PCBs similares a dioxinas determinados en suero humano.

3. Materiales y métodos



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental de esta tesis se planteó en dos fases, implementadas según el cronograma de la Tabla 3.1. En la primera fase de este proyecto se llevó a cabo el desarrollo de una metodología de análisis que permitiera la **determinación de los 12 isómeros de policloro bifenilos similares a dioxinas (dl-PCBs)** en muestras de pequeño volumen de suero sanguíneo. Posteriormente, en una segunda fase, se analizó la influencia de los niveles de dl-PCBs determinados en suero sobre la calidad seminal de los sujetos de estudio incluidos en el trabajo.

Tabla 3.1 Cronograma del estudio por fases

Cronograma del estudio por fases		
Año	FASE I	FASE II
2011	Desarrollo de una metodología para el análisis de dl-PCBs en muestras de suero.	
2012		
2013		Estudio de la influencia de las concentraciones de dl-PCBs determinadas en suero sobre la calidad seminal.
2014		

3.1 FASE I: Desarrollo de una metodología para el análisis de dl-PCBs en muestras de suero

Esta primera etapa de la tesis doctoral se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación “Residuos, Energía, Medioambiente y Nanotecnología” del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Alicante. Este laboratorio no está habituado a trabajar con muestras de fluidos biológicos, por lo que la realización de la parte experimental de esta tesis supuso un gran reto.

Los contaminantes sujetos a estudio se determinaron en el suero, ya que para su obtención no se precisa de aditivos (anticoagulantes) que podrían interferir en el proceso analítico.

Es necesario destacar que se ha realizado una revisión bibliográfica previa en la que no se ha encontrado ningún trabajo en el que se analicen los PCBs “similares a dioxinas” (dl-PCBs) en muestras de suero de pequeño volumen. Se han encontrado algunos trabajos en los que se analiza algún isómero de PCBs y otros compuestos orgánicos persistentes clorados que se encuentran en concentraciones superiores a los dl-PCBs (Čonka et. al., 2005; Mohr et. al., 2011; Rantakokko et. al., 2009). Por este motivo, el procedimiento empleado es una adaptación del método descrito previamente por Grimalt et. al. para el análisis de siete congéneres de PCBs no similares a dioxinas (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153 y PCB 180) mediante análisis por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (Grimalt et. al., 2010).

Materiales y métodos

El método desarrollado se basa en la extracción líquido-líquido (ELL), que separa en función de su polaridad los compuestos organoclorados presentes en las muestras de suero. Dado los bajos volúmenes de muestra y de disolvente empleados, en realidad se trata de una microextracción líquido-líquido (MELL), que permite reducir considerablemente el volumen de muestra y disolventes, lo cual supone una gran ventaja, teniendo en cuenta que la mayor limitación cuando se trabaja con muestras de fluidos biológicos es la poca cantidad disponible.

Es importante mencionar que en la determinación de dl-PCBs existe la dificultad añadida de su baja concentración con respecto al resto de PCBs. Por lo cual, la determinación de estos compuestos a niveles de ultratrazas en muestras de pequeños volúmenes ha precisado de un gran esfuerzo. Con el objetivo de determinar el volumen de muestra para el análisis de estos compuestos, se realizaron ensayos con diferentes volúmenes: 0.5 y 1 mL, y se encontró que el volumen de muestra que mejores resultados ofrecía era el de 1 mL.

Diseño experimental

Con el fin de poder determinar las concentraciones de dl-PCBs en las muestras de suero, estas se separaron en dos alícuotas; una de ellas fue utilizada para la determinación de lípidos totales, necesarios para expresar los valores de concentración de PCBs, y una segunda alícuota de 1 mL fue utilizada para la aplicación de la metodología analítica.

Pretratamiento de la muestra

Para el análisis de los dl-PCBs, el método de referencia empleado es el Método 1668C "Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS" (US EPA, 2010). Básicamente este método consta de las siguientes etapas: adición del patrón interno de dl-PCBs, extracción, limpieza y purificación del extracto, adición de patrones de recuperación y por último la etapa de detección instrumental.

El esquema general del proceso se explica en la Figura 3.1.

Sujetos de estudio

Las muestras de sangre analizadas en esta primera fase del estudio proceden de 21 pacientes varones incluidos en el programa de estudio integral del varón infértil de la clínica IVF Spain de Alicante, en el período de mayo a junio de 2014. Las edades de los sujetos de estudio se sitúan entre los 30 y los 55 años con una media de índice de masa corporal (IMC) de 25.2 kg/m². Todos los pacientes fueron informados de los objetivos de la investigación y dieron su consentimiento para participar en el proyecto, firmando un documento de Consentimiento Informado para la donación voluntaria de muestras, de acuerdo con los requerimientos del Comité Ético del Hospital Universitario General de Alicante.

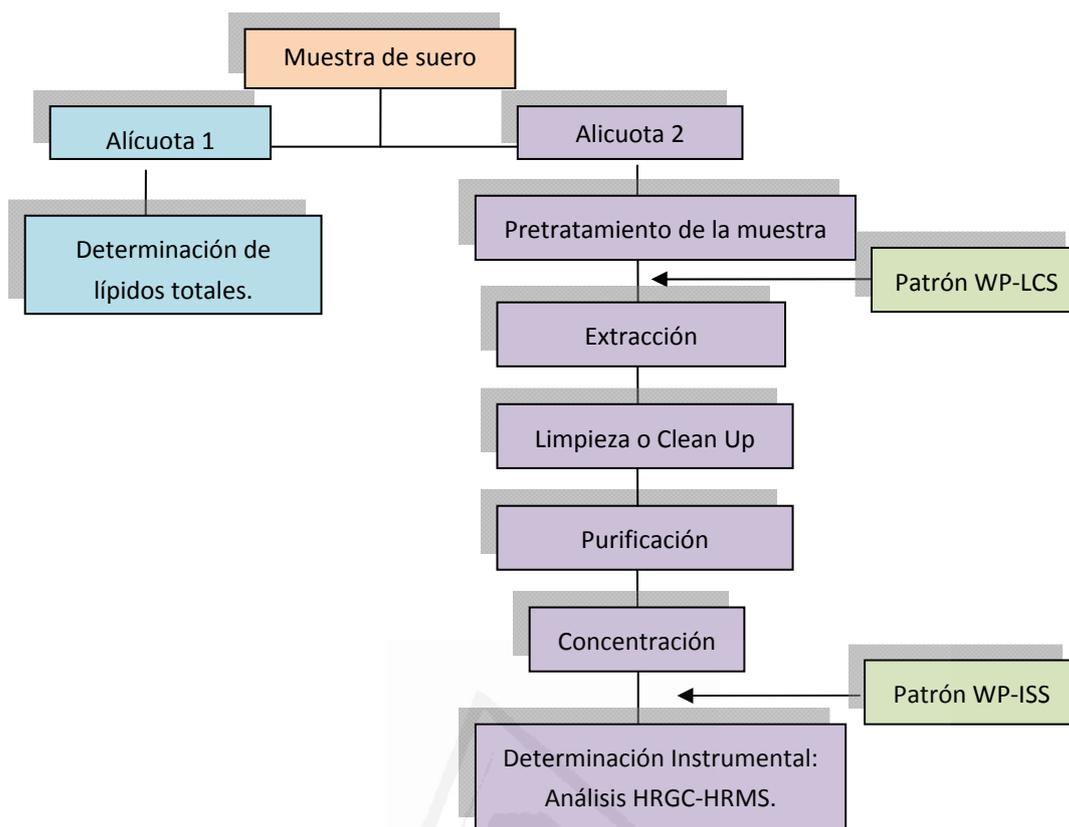


Figura 3.1 Esquema del diseño experimental llevado a cabo en la Fase I, para el desarrollo de una metodología de análisis de dl-PCBs en suero sanguíneo

Obtención y almacenamiento de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante venopunción cubital por personal especializado para la extracción de muestras biológicas. Posteriormente las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero. La fracción de suero obtenida fue trasvasado por aspiración con pipeta a viales de congelación codificados y mantenidos a -20 °C hasta su determinación analítica. El volumen de suero obtenido tras la centrifugación fue de 2 mL, suficiente para la realización del estudio.

Determinación de lípidos totales

Como los PCBs son lipofílicos las concentraciones de los mismos se ajustan al total de lípidos en suero. Con este objetivo se determinaron los niveles de colesterol y triglicéridos de las muestras siguiendo la técnica de rutina del servicio de laboratorio de Análisis Clínico de IVF Spain.

Para expresar los valores de concentración de los dl-PCBs en función del contenido lipídico de las muestras se utilizó la siguiente fórmula (Phillips *et. al.*, 1989):

$$\text{Lípidos totales en suero} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 0.623 + \text{triglicéridos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) + 2.27 \cdot \text{colesterol total} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)$$

Materiales y métodos

Esta fórmula permite expresar la concentración de PCBs en picogramos (pg) de compuesto por gramo de lípidos en el suero:

$$\text{Concentración de PCBs} \left(\frac{\text{pg}}{\text{g lípidos}} \right) = \frac{\text{Concentración de PCBs} \left(\frac{\text{pg}}{\text{mL suero}} \right)}{\text{Lípidos totales en suero} \left(\frac{\text{g lípidos}}{\text{mL suero}} \right)}$$

Etapas del análisis de dl-PCBs

Pretratamiento de las muestras

Como pretratamiento se deben considerar todos aquellos procesos que se realizan justamente antes de la extracción y que tienen como objeto preparar o modificar la muestra para que la posterior extracción y separación de los analitos de interés de la matriz se vea facilitada y se realice con mayor rendimiento.

Uno de los principales problemas que presentan las muestras de suero es su alto contenido proteico, por tanto el objetivo de esta etapa es la desproteización de la muestra antes de la extracción. En este caso, el agente desproteizante empleado en nuestro caso ha sido ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).

Adición del patrón interno

Antes de comenzar el proceso de extracción líquido-líquido, se añade a la muestra una cantidad conocida de patrón interno, que contiene los 12 dl-PCBs marcados con el isótopo ¹³C. Concretamente se añaden 10 µL de la disolución WP-LCS (del inglés "Labelled Compound Spiking Solution", Wellington Laboratories Inc.) diluida 1:200 en volumen.

Una vez añadido el patrón la muestra se agita brevemente, antes de iniciar la extracción, con el objetivo de permitir la integración del patrón lo máximo posible en la matriz.

La adición de estos compuestos marcados isotópicamente permite la posterior cuantificación mediante el método de dilución isotópica, detallado más adelante, de los compuestos nativos contenidos en la muestra. A su vez, permite controlar las inevitables pérdidas que se pueden producir durante las múltiples etapas del proceso analítico, con ayuda de los correspondientes patrones de recuperación que se añadirán al vial antes de la determinación instrumental.

Extracción y separación

El objetivo de la etapa de extracción es la liberación de los PCBs contenidos en la muestra y su transferencia a un disolvente orgánico con la mayor eficiencia posible.

Una vez sometida la muestra al proceso de extracción, se dispone de un extracto orgánico en el que se encuentran presentes simultáneamente los compuestos de interés junto con un buen número de otras sustancias coextraídas que pueden interferir en el análisis.

Hay que destacar que en el desarrollo de la etapa de extracción, se llevaron a cabo algunas modificaciones del método publicado por Grimalt *et. al.* que consisten básicamente en aumentar el número de extracciones (Grimalt *et. al.*, 2010).

De esta manera, la extracción se lleva a cabo como se detalla a continuación:

- ◆ Se toma 1 mL de la muestra de suero y se deposita en un tubo de ensayo con tapón de teflón.
- ◆ Se añaden a la muestra 10 µL del patrón WP-LCS de PCBs similares a dioxinas (diluido 1:200 en volumen).
- ◆ Se añaden 2 mL de ácido sulfúrico concentrado de alta pureza (H₂SO₄), con el objetivo de precipitar las proteínas.
- ◆ Se añaden 3 mL de un disolvente orgánico (hexano) para extraer los analitos contenidos en la muestra.
- ◆ Se agita el tubo de ensayo en un agitador vórtex y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 rpm con el objetivo de garantizar la precipitación de las proteínas y a su vez la transferencia de los analitos al disolvente orgánico. Para mejorar la separación entre fases se añaden 10 gotas de agua MilliQ previamente a la centrifugación de la muestra.
- ◆ El sobrenadante (fase orgánica) es aspirado con una pipeta Pasteur y trasvasado a un segundo tubo.
- ◆ A la fase acuosa se le añaden 2 mL de hexano, se agita en vórtex y se centrifuga de manera análoga al paso anterior. Esta operación se repite 2 veces para obtener el extracto final.

Purificación

Aunque un método de análisis sea muy específico, en la mayoría de los casos es indispensable una purificación del extracto orgánico obtenido, en particular en el caso de matrices complejas como las muestras biológicas debido a que estos “extractos crudos” contienen una gran cantidad de interferencias que hacen indispensable incluir etapas que permitan aislar, en la medida de lo posible, los compuestos de interés de otras familias de compuestos que son co-extraídas.

La etapa de purificación permite una eliminación aun mayor de las interferencias, con las consiguientes ventajas de: mejora de la relación señal/ruido y obtención de un límite de detección más bajo, mayor duración de la columna cromatográfica y menor necesidad de limpieza de la fuente de iones del espectrómetro de masas.

Para la purificación de los extractos de las muestras a las que hace referencia esta memoria se utiliza el método de hidrólisis ácida, que consiste en la destrucción química de las sustancias interferentes con ácido. Esta etapa se realiza añadiendo una etapa adicional de purificación al método de Grimalt *et. al.* (Grimalt *et. al.*, 2010). Para ello se añaden 2 mL de

Materiales y métodos

H₂SO₄ concentrado al extracto orgánico obtenido, se agita brevemente en el vórtex y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 rpm separando la fase orgánica.

A continuación se realiza una segunda limpieza ácida, obteniéndose finalmente el extracto purificado.

Concentración con corriente de N₂

Llegados a este punto, se dispone de un extracto purificado en el que previsiblemente se han eliminado la mayor parte de las interferencias preexistentes. Antes de realizar la determinación de los compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRGC-HRMS) se procede a la concentración de los extractos hasta un volumen final de unos 50 µL, mediante una corriente suave de nitrógeno para lograr un factor de concentración adecuado que permita superar los límites de detección instrumentales.

Adición del patrón de recuperación

Una vez concentrada la muestra y justo antes del análisis por HRGC-HRMS, se adiciona el patrón de recuperación marcado isotópicamente con ¹³C, que permite calcular el porcentaje de recuperación o pérdidas de los patrones a lo largo del proceso de extracción, purificación y concentración. Concretamente se añaden 10 µL de la disolución WP-ISS (del inglés "Internal Standard Solution", Wellington Laboratories Inc.) diluida 1:200 en volumen. En la Tabla 3.2 se ilustran los distintos patrones utilizados (interno y de recuperación).

Tabla 3.2 Patrones utilizados en el análisis de PCBs similares a dioxinas.

COMPUESTO	IUPAC	WP-LCS (ng/mL)	WP-ISS (ng/mL)
3,4,4',5-Tetracloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	81L	1000	-
3,3',4,4'-Tetracloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	77L	1000	-
2,3,3',4,4'-Pentacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	105L	1000	-
2,3,4,4',5-Pentacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	114L	1000	-
2,3',4,4',5-Pentacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	118L	1000	-
2',3,4,4',5-Pentacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	123L	1000	-
3,3',4,4',5-Pentacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	126L	1000	-
2,3,3',4,4',5-Hexacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	156L	1000	-
2,3,3',4,4',5'-Hexacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	157L	1000	-
2,3',4,4',5,5'-Hexacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	167L	1000	-
3,3',4,4',5,5'-Hexacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	169L	1000	-
2,3,3',4,4',5,5'-Heptacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	189L	1000	-
2,3',4',5-Tetracloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	70L	-	1000
2,3,3',5,5'-Pentacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	111L	-	1000
2,2',3,4,4',5'-Hexacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	138L	-	1000
2,2',3,3',4,4',5-Heptacloro[¹³ C ₁₂]bifenilo	170L	-	1000

Análisis por cromatografía de gases de alta resolución con espectrometría de masas de alta resolución (HRGC-HRMS).

La determinación de estos compuestos se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS-HRMS). La cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) permite la separación de los distintos isómeros utilizando columnas capilares de diversa polaridad, y la espectrometría de masas de alta resolución identifica, confirma y permite cuantificar los compuestos analizados con la suficiente selectividad como para poder diferenciar los dl-PCBs de todos los demás componentes que coeluyen con ellos durante la separación cromatográfica. Esta elevada sensibilidad permite alcanzar los bajos límites de detección requeridos y resolver las interferencias si no han conseguido eliminarse totalmente en la etapa de purificación.

Los análisis se realizan en un cromatógrafo de gases de alta resolución (HP 6890) con autoinyector de líquidos (HP 7683), acoplado a un espectrómetro de masas Micromass Autospec-Ultima NT con fuente de impacto electrónico positivo (EI+) de alta resolución y alta sensibilidad y analizador sector magnético con geometría EBE de triple sector. El sistema de inyección del cromatógrafo de gases además de split/splitless dispone de PTV (del inglés, Programmed Temperature Vaporization) que permite trabajar con más cantidad de muestra, aumentando de este modo la sensibilidad.

La detección de iones se realiza en modo SIR (Selective Ion Recording) y, por tanto, de todos los iones originados en la cámara de ionización solo se monitorizan las masas de los dos iones principales (M1 y M2) de cada compuesto.

Tabla 3.3 Condiciones del análisis de PCBs mediante HRGC-HRMS

Cromatógrafo de gases			
Parámetro	Valor		
Modo de inyección	PTV (Programmed Temperature Vaporization)		
Volumen de inyección	5 µL		
Flujo de He en la columna	1 mL/min		
Rampa de T del horno			
Velocidad de calefacción (°C/min)	T (°C)	Tiempo de espera (min)	Tiempo total (min)
	90	1	1
20	180	1	6.5
3	300	10	56.5
Espectrómetro de masas			
Parámetro	Valor		
Modo de detección	SIR		
Temperatura de la fuente	290 °C		
Voltaje del detector	450 V		
Energía de ionización	35 eV		

Materiales y métodos

Para el análisis de las muestras, se emplea una columna capilar Agilent DB-5MS (60m x 0.25mm i.d x 0.25µm) que tiene la capacidad de separar los diferentes compuestos según su grado de cloración. Esto permite dividir el cromatograma en 3 “ventanas cromatográficas”, de forma que el espectrómetro de masas sólo monitoriza un reducido número de masas durante cada uno de estos períodos de tiempo, que se corresponden con la elución de cada grupo homólogo, lo cual aumenta considerablemente la sensibilidad del equipo permitiendo una detección satisfactoria de los compuestos de interés. Los parámetros de operación más importantes del HRGC-HRMS se resumen en la Tabla 3.3 Condiciones del análisis de PCBs mediante HRGC-HRMS.

Identificación de los congéneres

Debido a que la sola presencia de picos cromatográficos no asegura que estas señales correspondan de forma inequívoca a los analitos estudiados, es necesario seguir una serie de criterios para confirmar su identificación.

Para la identificación de cada uno de los congéneres, no sólo es necesaria la identificación de sus masas principales y su relación isotópica (con una desviación máxima de 15 % respecto del valor teórico), sino que además se establecen unos criterios adicionales:

- ◆ Una señal se considera pico cromatográfico si cumple una relación señal/ruido mayor que 3.
- ◆ El tiempo de retención del pico cromatográfico debe encontrarse dentro del intervalo de la ventana cromatográfica correspondiente y se deben obtener respuestas simultáneas (no deben diferir más de 2 segundos) para las dos masas monitorizadas.
- ◆ La asignación de los picos cromatográficos correspondientes a los congéneres nativos se realiza por comparación con los tiempos de retención de los correspondientes compuestos marcados con ^{13}C añadidos durante el análisis.

Cuantificación de las muestras

La cuantificación se efectúa mediante el método de dilución isotópica, con calibración lineal y factores de respuesta medios. Como patrones internos se emplean los mismos congéneres que se quieren cuantificar marcados con ^{13}C . Este método se fundamenta en la linealidad de la respuesta del espectrómetro de masas frente a la señal que dan los dl-PCBs y en la utilización de una respuesta relativa de cada analito nativo respecto a su correspondiente marcado isotópicamente.

El factor de respuesta relativa (RR_n) es un parámetro que relaciona la señal que da un determinado congénere nativo con la respuesta del mismo congénere marcado isotópicamente y viene definido por la siguiente fórmula:

$$RR_n = \left(\frac{A_n / A_{m,C^{13}}}{Q_n / Q_{m,C^{13}}} \right)_{\text{en patrón}}$$

donde: RR_n = respuesta relativa del compuesto nativo n respecto a su marcado m.

A_n = suma de las áreas de los iones M1 y M2 del compuesto nativo n.

$A_{m,C}^{13}$ = suma de las áreas de los iones M1 y M2 del compuesto marcado m.
 Q_n = cantidad de compuesto nativo n introducido en el sistema
 $Q_{m,C}^{13}$ = cantidad de compuesto marcado m introducido en el sistema

Estos factores se determinan mediante el análisis en HRGC-HRMS de distintas soluciones patrones de calibrado que contienen los compuestos nativos en concentraciones crecientes y los compuestos marcados isotópicamente en concentración constante (ver Tabla 3.4).

Una vez determinada la respuesta relativa de cada compuesto mediante el calibrado, y conociendo el área de los picos de compuesto y la cantidad de patrón marcado correspondiente en cada muestra, el cálculo de la cantidad de compuesto en una muestra se realiza con la siguiente ecuación:

$$m_n = \left(\frac{A_n}{A_{m,C}^{13}} \cdot m_{m,C}^{13} \right)_{\text{en muestra}} \cdot \frac{1}{RR_n}$$

donde: m_n = cantidad de compuesto presente en la muestra.

$m_{m,C}^{13}$ = cantidad de compuesto marcado introducido en la muestra.

Por otra parte, para el cálculo de la recuperación de los compuestos marcados con ^{13}C es necesario calcular previamente un factor de respuesta (FR_n). Este factor relaciona la señal que da el compuesto marcado isotópicamente con la respuesta del compuesto del patrón de recuperación añadido justo antes del análisis:

$$FR_n = \left(\frac{A_{m,C}^{13}}{A_{\text{rec},C}^{13}} \right)_{\text{en patrón}}$$

donde: FR_n = factor de respuesta del compuesto marcado m respecto al de recuperación.

$A_{m,C}^{13}$ = suma de las áreas de los iones M1 y M2 del compuesto marcado m.

$A_{\text{rec},C}^{13}$ = suma de las áreas de los iones M1 y M2 del compuesto de recuperación.

Para cada uno de los compuestos marcados se calculan los valores de los distintos FR_n , que permiten calcular la cantidad de compuesto marcado recuperado en el análisis y, a su vez, estos valores permiten calcular la recuperación de cada compuesto por comparación del valor obtenido con la cantidad real de compuesto introducido en la muestra. Para ello se emplean las siguientes ecuaciones:

$$m_{m,C}^{13} = \left(\frac{A_{m,C}^{13}}{A_{\text{rec},C}^{13}} \cdot m_{m,C}^{13} \right)_{\text{en muestra}} \cdot \frac{1}{FR_n}$$

$$\text{Recuperación (\%)} = 100 \cdot \frac{m_{m,C}^{13} (\text{calculado})}{m_{m,C}^{13} (\text{real})} = 100 \cdot \left(\frac{A_{m,C}^{13}}{A_{\text{rec},C}^{13}} \right)_{\text{en muestra}} \cdot \frac{1}{FR_n}$$

donde: $m_{\text{rec},C}^{13}$ = cantidad de compuesto de recuperación introducido en la muestra.

$m_{m,C}^{13}$ = cantidad de compuesto marcado introducido en la muestra.

Materiales y métodos

La identificación y cuantificación de las muestras se realiza mediante el programa informático Quanlynx versión 4.0 (forma parte del software del equipo de HRGC-HRMS), el cual permite llevar a cabo de forma más sencilla la identificación de los picos (por comparación de los tiempos de retención), su integración (calculando las respuestas relativas a partir del área del pico o la altura), la recuperación de los distintos congéneres marcados con ^{13}C , la relación isotópica, el ruido, la relación señal/ruido, el límite de detección, etc.

Tabla 3.4 Patrones de calibrado utilizados en el análisis de dl-PCBs .

IUPAC	WP-CS1 (ng/mL)	WP-CS2 (ng/mL)	WP-CS3 (ng/mL)	WP-CS4 (ng/mL)	WP-CS5 (ng/mL)	WP-CS6 (ng/mL)	WP-CS7 (ng/mL)
77	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
81	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
105	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
114	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
118	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
123	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
126	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
156	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
157	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
167	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
169	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
189	0,1	0,5	2,0	10	40	200	800
MASS-LABELLED PCBs	WP-CS1	WP-CS2	WP-CS3	WP-CS4	WP-CS5	WP-CS6	WP-CS7
77L	50	50	50	50	50	50	50
81L	50	50	50	50	50	50	50
105L	50	50	50	50	50	50	50
114L	50	50	50	50	50	50	50
118L	50	50	50	50	50	50	50
123L	50	50	50	50	50	50	50
126L	50	50	50	50	50	50	50
156L	50	50	50	50	50	50	50
157L	50	50	50	50	50	50	50
167L	50	50	50	50	50	50	50
169L	50	50	50	50	50	50	50
189L	50	50	50	50	50	50	50
INTERNAL STANDARDS	CSL	CS0.5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
70L	50	50	50	50	50	50	50
111L	50	50	50	50	50	50	50
138L	50	50	50	50	50	50	50
170L	50	50	50	50	50	50	50

Control de calidad

Para el análisis de dl-PCBs se sigue el protocolo de control de calidad basado en la metodología descrita en el método 1668C de la US EPA (United States Environmental Protection Agency) para PCBs similares a dioxinas (US EPA, 2010). De este protocolo cabe destacar los siguientes puntos:

1) El estado de la columna cromatográfica se comprueba periódicamente mediante la inyección del patrón BP-WD (“Native PCB Window Defining Solution/Mixture”, Wellington Laboratories Inc.). Este patrón es utilizado para definir las distintas ventanas cromatográficas.

2) Al principio y al final de cada tanda de análisis debe comprobarse que se mantiene en el HRGC-HRMS la resolución de 10000 al 10 %, a lo largo de todo el rango de masas. El Perfluoroqueroseno (PFK), es el material de referencia que se utiliza para calibrar el espectrómetro, y su intensidad debe mantenerse constante a lo largo de toda la adquisición.

3) La calibración utilizando los distintos patrones debe cumplir los siguientes requisitos:

- ◆ En el patrón CS1 los picos cromatográficos de los distintos dl-PCBs y los marcados correspondientes deben tener una relación señal /ruido ≥ 10
- ◆ La relación isotópica (M1/ M2) debe ser ± 15 % del valor teórico.
- ◆ Los factores de Respuesta Relativos (RRF) deben permanecer invariables a lo largo del rango de concentración para el que la respuesta del espectrómetro de masas es lineal. Los RRF se calculan a partir del análisis por triplicado de un mínimo de 5 soluciones patrón. La desviación estándar entre los resultados obtenidos para una misma solución debe ser <10 %, mientras que la desviación estándar entre los 5 valores obtenidos para las 5 concentraciones diferentes debe ser <20 %.

4) Con cada grupo de muestras se inyecta el patrón de CS1, utilizado como patrón de verificación del calibrado, comprobándose que la relación isotópica para cada PCB se encuentra dentro de los límites propuestos en el método de la EPA.

5) Se realizan análisis de blancos de control, inicialmente y para cada grupo de muestras, con el objetivo de comprobar que el material y los disolventes empleados para los distintos análisis no contiene dl-PCBs y además las posibles pérdidas durante el proceso analítico. El análisis de estos blancos se lleva a cabo del mismo modo que si se tratase de una muestra, con la diferencia de que no se emplea muestra.

En la Figura 3.2, se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos para un patrón de la recta de calibrado de PCBs similares a dioxinas.

Materiales y métodos

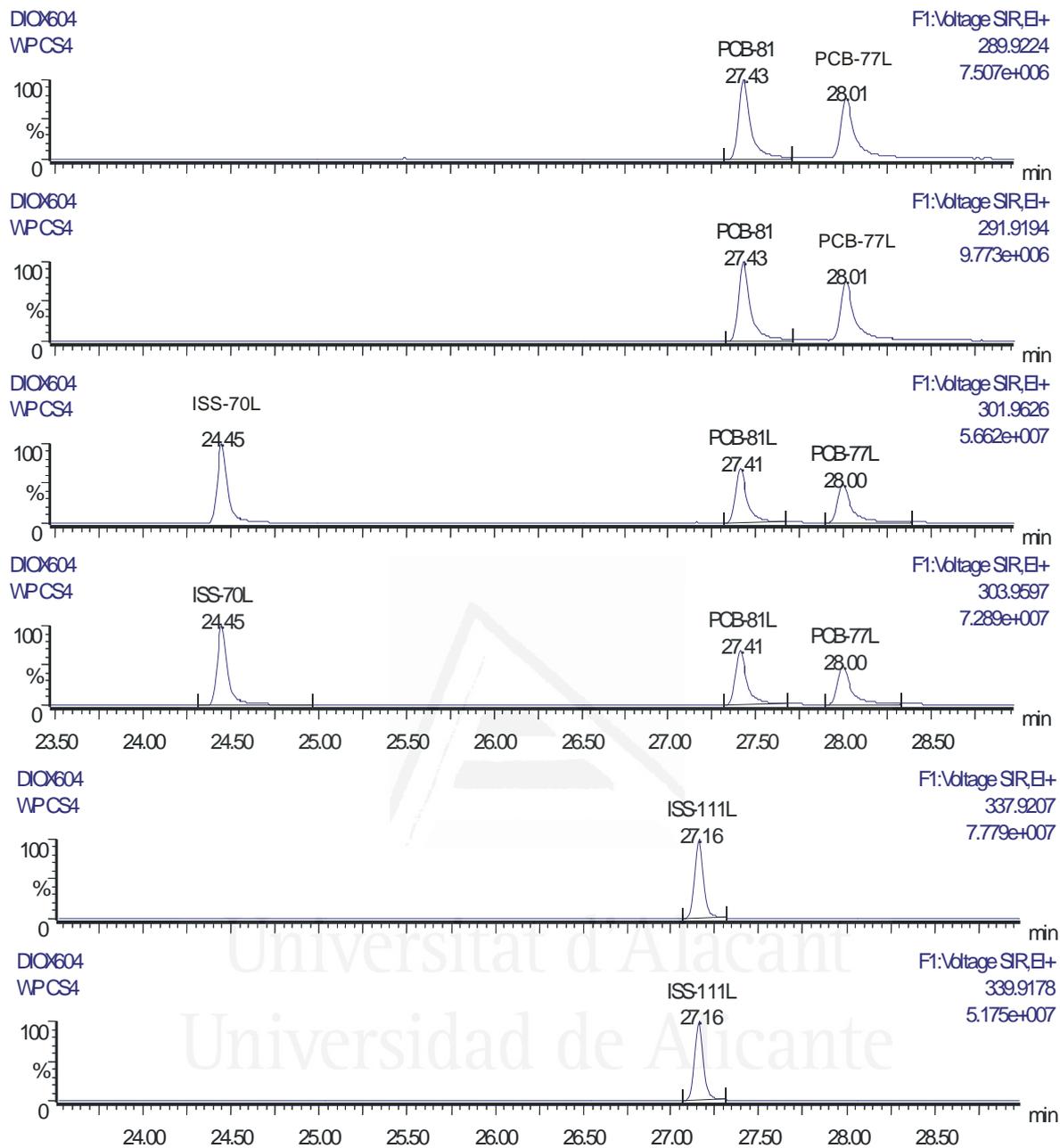


Figura 3.2 Primera ventana cromatográfica (congénereos tetra y pentaclorados) del patrón de PCBs denominado WP-CS4.

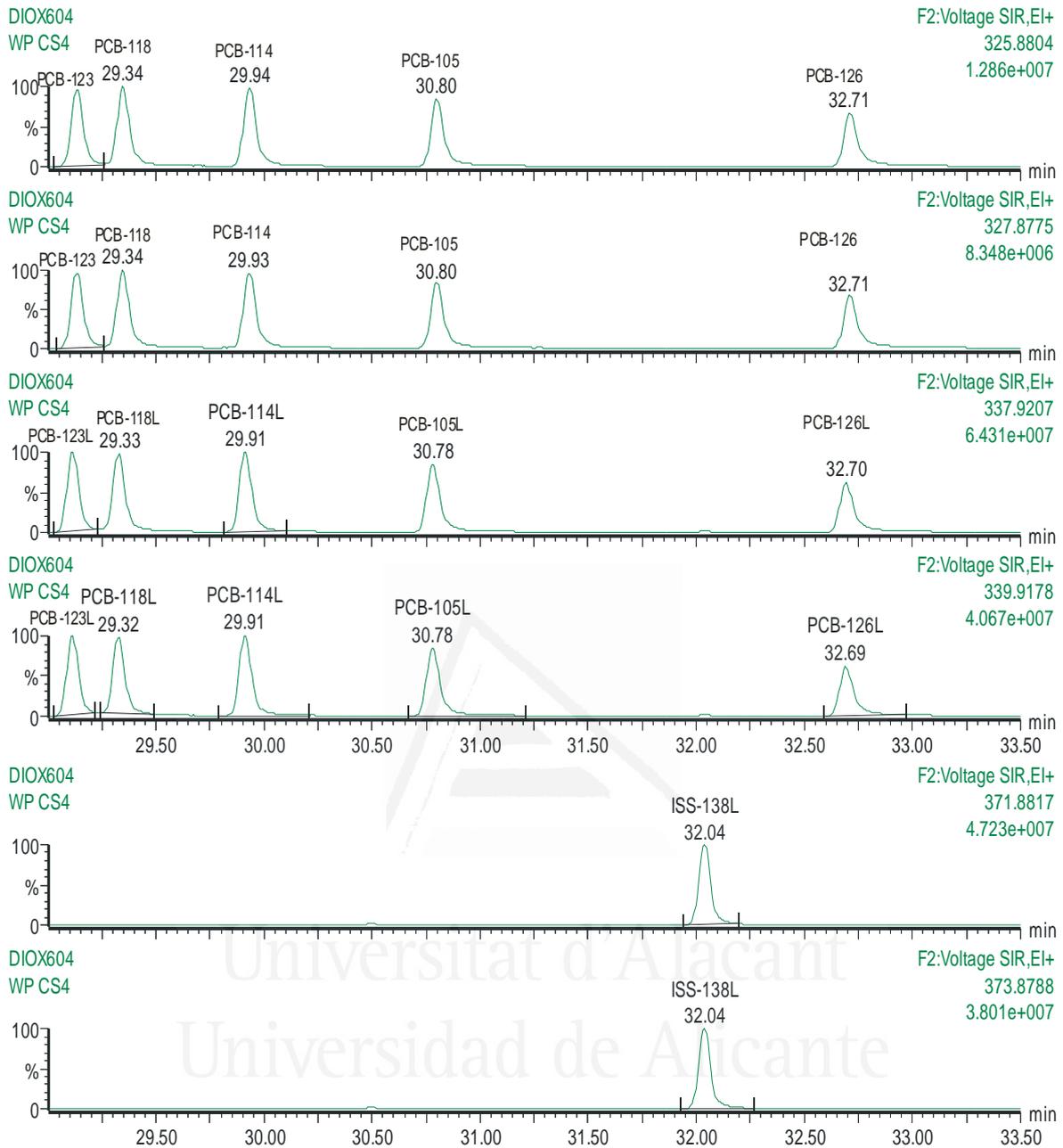


Figura 3.2 (cont.). Segunda ventana cromatográfica (congéneres penta y hexaclorados) del patrón de PCBs denominado WP-CS4.

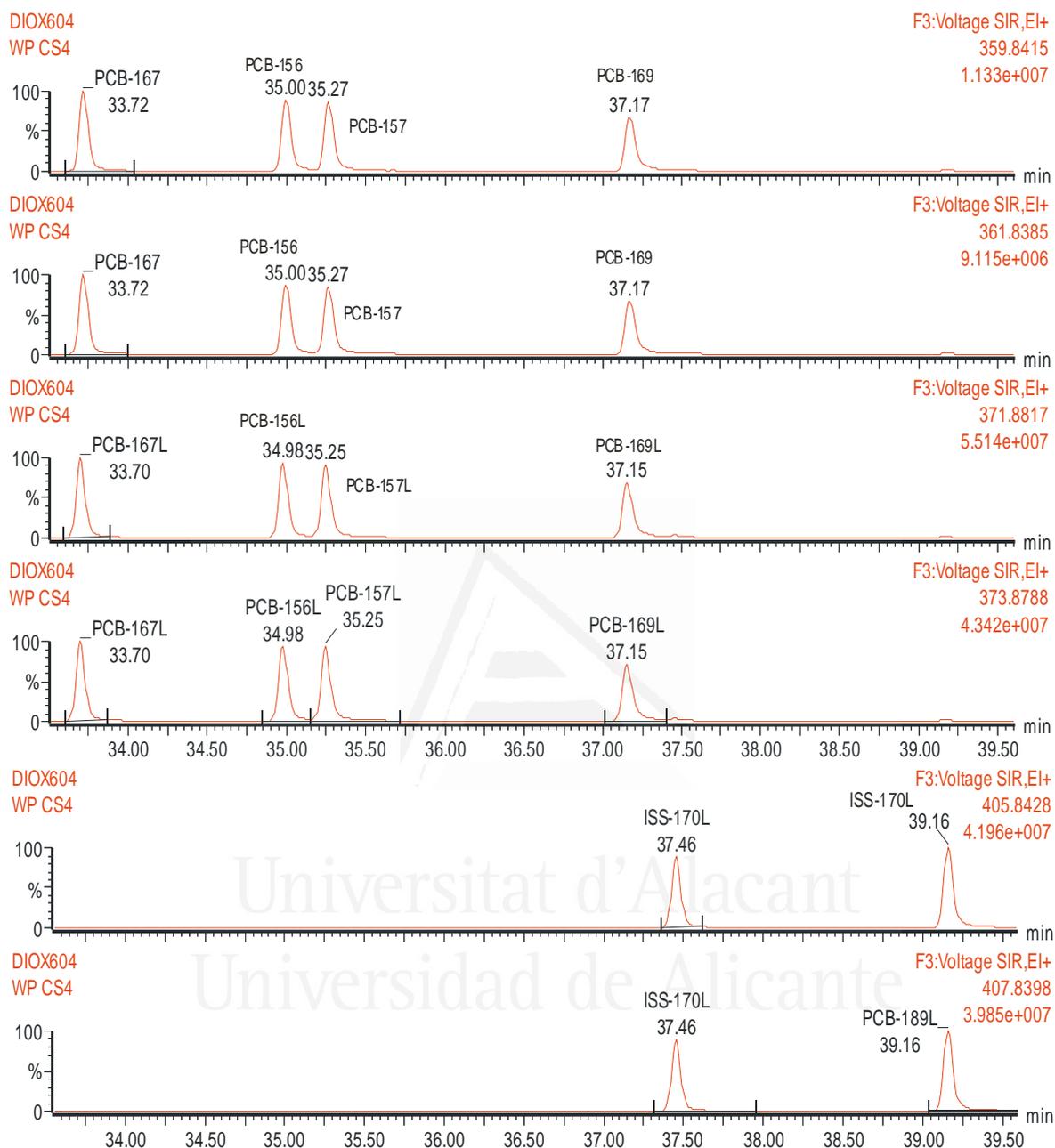


Figura 3.2 (cont.). Tercera ventana cromatográfica (congéneres hexa y heptaclorados) del patrón de PCBs denominado WP-CS4.

3.2 Fase II. Estudio de la influencia de las concentraciones de los PCBs similares a dioxinas sobre la calidad seminal.

Diseño Experimental

El objetivo de esta fase fue estudiar la influencia de las concentraciones de dl-PCBs sobre los parámetros seminales. De cada sujeto se analizaron las muestras de semen para la determinación de los parámetros que establecen su calidad y sus muestras de sangre para la determinación de lípidos totales y el análisis químico de dl-PCBs. Con el objetivo de comparar los niveles de dl-PCBs en sangre en función de la calidad seminal se establecieron dos grupos de estudio, en función de los parámetros seminales: Grupo de pacientes con baja calidad seminal (n=24), en los que presentaban al menos un parámetro seminal alterado, y el grupo control (n=26) en el que todos los sujetos fueron denominados normozoospermicos según la OMS (OMS, 2010).

Todo el esquema del proceso lo podemos ver en la Figura 3.3.

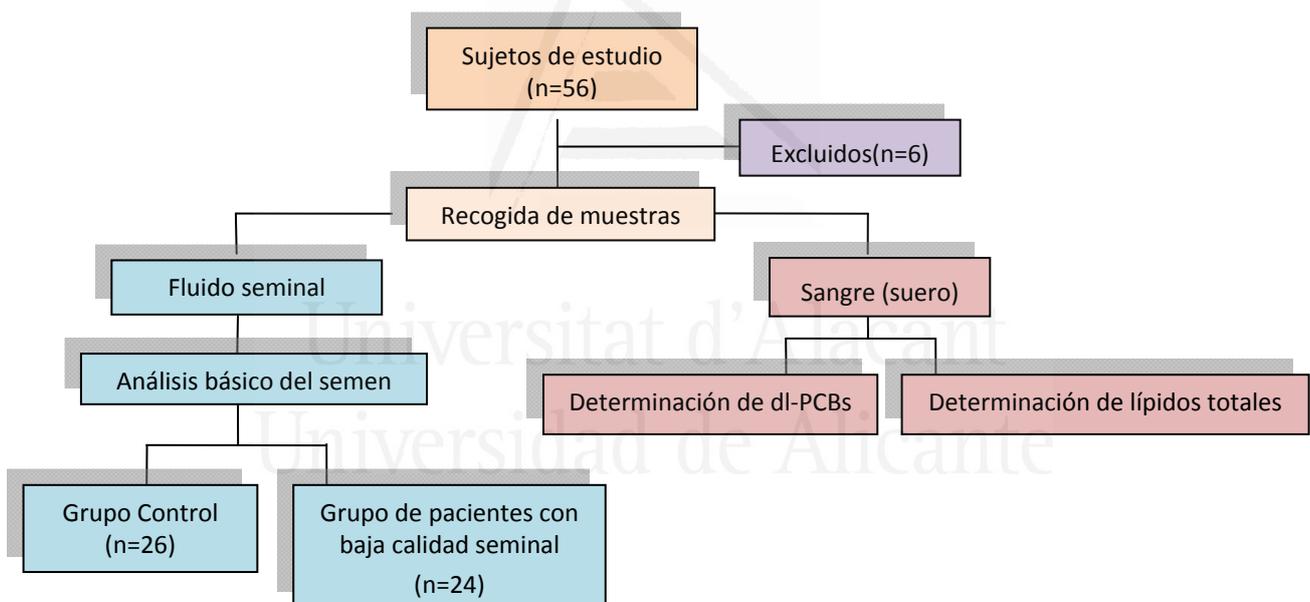


Figura 3.3 Esquema del diseño experimental llevado a cabo durante la Fase II.

Sujetos de estudio

En este estudio se participaron 56 pacientes varones, incluidos en el programa de estudio integral del varón infértil de la clínica IVF Spain de Alicante, durante Mayo de 2012 a Junio de 2014. Todos los pacientes que aceptaron participar en el estudio fueron informados, de forma oral y escrita de los objetivos del mismo y de los requisitos a seguir para su realización, entre los cuales se incluían guardar un periodo de abstinencia sexual de entre 3 y 5 días. Los participantes procedían de diferentes países del norte de Europa: Suecia, Noruega, Alemania y Dinamarca con edades comprendidas entre los 32-55 años.

Materiales y métodos

Encuesta Epidemiológica

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó un cuestionario donde se recogía información sobre salud general, hábitos y estilos de vida, antecedentes familiares, condiciones de trabajo y exposición a productos tóxicos. La encuesta epidemiológica se presenta en el apartado de anexos.

El cuestionario comprende 5 apartados. En el primer apartado se recoge información sobre datos biológicos, como la edad, la altura, el peso e historial reproductivo. En el segundo apartado, se solicitan los antecedentes familiares. En el tercer apartado se consulta sobre diferentes hábitos de vida, como el hábito tabáquico o la práctica de deporte. El cuarto apartado está dedicado a consultar sobre los datos sociodemográficos, como la raza, nivel de estudios, país de procedencia, conocer el tipo de profesión y la exposición a productos químicos en el puesto de trabajo. En el último apartado, con el objetivo de conocer el grado de contaminación ambiental al que estaban expuestos los sujetos, preguntamos por su lugar de residencia y el posible contacto directo o indirecto con tóxicos derivados de la ubicación del hogar.

Criterios de exclusión

Aquellos sujetos con factores conocidos relacionados con la infertilidad masculina tales como varicocele, posvasectomía o criptorquidia, hipogonadismo endocrino (concentraciones hormonales anormales), infertilidad inmune, enfermedad genética, infección genito-urinarias en los últimos 3 meses, fueron excluidos del estudio. Además para evitar la azoospermia u oligozoospermia severa causada por microdeleciones en el **cromosoma Y**, fueron excluidos aquellos pacientes que presentaron anomalías en el cariotipo o microdeleciones cromosómicas. Siendo descartados 6 de un total de 56 participantes.

Los sujetos de estudio fueron divididos en dos grupos en base a las características seminales, según los criterios de la OMS (OMS, 2010).

- ♦ **Grupo control (n=26)**: Sujetos que tras realizar el seminograma según los criterios de la OMS (OMS, 2010) fueron clasificados como normozoospermicos.
- ♦ **Grupo de baja calidad seminal (n=24)**: Sujetos con al menos uno de los parámetros seminales alterados según los criterios de la OMS (OMS, 2010).

Obtención y almacenamiento de las muestras de suero

El procedimiento para la obtención de las muestras de suero es idéntico al descrito en la Fase I.

Determinación de lípidos totales en muestras de suero

Con el fin de expresar los niveles de dl-PCBs en función del contenido lipídico de las muestras, alícuotas de suero fueron analizadas en su contenido de colesterol y triglicéridos como se ha descrito anteriormente en el apartado correspondiente a la Fase I.

Determinación de DL-PCBs en muestras de suero

La determinación de los niveles de dl-PCBs en muestras de suero se realizó con la metodología desarrollada para el análisis de estos compuestos por nuestro grupo de trabajo tal y como se explica en la Fase I del presente estudio.

Análisis básico del semen

Obtención de las muestras de semen

A cada individuo se le entregó un recipiente de orina estéril de boca ancha previamente testado para asegurar la no toxicidad de la muestra y se le informó, tanto de forma oral como por escrito de las instrucciones que debía seguir para la correcta obtención de la muestra de semen. Todos los frascos fueron previamente identificados.

Cuando la muestra fue entregada se anotaron aquellos datos de interés para el análisis: nombre y apellidos, y con el código de laboratorio, dificultades a la hora de la recogida, integridad de la muestra, posibles pérdidas o contaminaciones, tiempo transcurrido entre la eyaculación y la entrega y tiempo de abstinencia en horas.

El seminograma realizado en el presente estudio se hizo siguiendo las indicaciones de la OMS en la última edición del manual para el examen de semen (OMS, 2010). Todas las muestras de semen fueron analizadas por un único observador especializado en el análisis de semen con el fin de evitar los posibles sesgos que se derivan de la variabilidad entre observadores.

Evaluación macroscópica:

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, estas eran colocadas en una estufa a 37°C durante un periodo de 30 minutos hasta completar el proceso de licuación para posteriormente realizar el análisis macroscópico donde se analizaron los siguientes parámetros.

Licuefacción:

Inmediatamente después de la eyaculación el semen normal coagula, por factores que se hallan en el plasma seminal y posteriormente, en 5-60 minutos se licua por la acción del antígeno específico de próstata.

Una muestra de semen normal se licua a los 60 minutos posteriores a la eyaculación, a temperatura ambiente. En algunos casos la licuefacción no es completa a los 60 minutos y esto debe ser informado. Cuando esto ocurre las muestras deben ser sometidas a algún tratamiento adicional (mezclado mecánico, exposición a bromelina 1 g/L, a plasmina 0.35-0.5 unidades caseína/ml o a quimiotripsina 150 USP/mL) a fin de poder continuar con su análisis. Los procesos de la licuefacción se codificaron como completa o incompleta.

Materiales y métodos

Aspecto:

El aspecto de la muestra de semen fue examinado inmediatamente después de su licuefacción o dentro de los 60 minutos tras la eyaculación, por simple inspección ocular a temperatura ambiente. Una muestra normal tiene una apariencia homogénea gris opalescente. Puede presentar un aspecto traslúcido cuando la concentración de espermatozoides es muy baja, marrón-pardo cuando contiene glóbulos rojos o amarillo en el caso de un paciente con ictericia o que consume algunas vitaminas.

Volumen:

El volumen del eyaculado fue medido por aspiración de la muestra completa en una pipeta estéril de 5 a 10 mL. Los valores de referencia de la OMS son los iguales o superiores a 1,5 mL. Cuando el volumen es inferior se denomina hipospermia.

Viscosidad:

La viscosidad o consistencia de las muestras se estimó aspirando la muestra con una pipeta de 5 mL y permitiendo la libre caída de gotas para observar la longitud del filamento formado. Cuando se formaban gotas pequeñas bien definidas o un filamento de menos de 2 cm, fue considerado como muestra normal (el valor de la viscosidad fue de cero). Si formaban un filamento mayor de 2 cm, fueron consideradas como muestras de viscosidad aumentada. Una viscosidad aumentada puede ser el resultado de una inflamación crónica de la próstata, pero también se asocia con un alto contenido de moco y con la presencia de anticuerpos antiespermatozoides.

pH:

La medición del pH se realizó usando papel tiras de papel pH graduación 6-10. El pH fue medido distribuyendo una gota de semen sobre tiras de pH básicas dentro de los 60 minutos posteriores a la eyaculación. Al cabo de 30 segundos el color de la zona impregnada fue comparado con la escala cromática para determinar el pH de la muestra. El límite inferior de referencia establecido es de 7,2. Un pH ácido indica una ausencia de secreción de las vesículas seminales o algún proceso infeccioso. Un pH alcalino señala una disminución de la secreción prostática.

Evaluación microscópica:

Una vez finalizado la evaluación macroscópica se procedió a la realización de la evaluación microscópica. Para su realización es imprescindible un microscopio. Se aconseja además que esté dotado de contraste de fases y que cuente con la pletina termostaticada a 37°C. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

Valoración de la concentración :

Para valorar la concentración espermática en el eyaculado se utilizó la cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel). Se colocaron 10µl de muestra en la

cámara, previamente calentada a unos 37°C para evitar un posible shock térmico, y a continuación se observó bajo contraste de fases a 200x, contándose el número de espermatozoides presentes en 10 cuadrados de la cuadrícula. Una vez realizado el recuento, el número resultante es la concentración de espermatozoides expresados en millones de espermatozoides por mililitro de muestra (Makler, 1980). Según la OMS (OMS 2010) la concentración normal de espermatozoides debe ser de 15 millones/ml o superior. Cuando la concentración es inferior se denomina oligozoospermia.

Número total de espermatozoides:

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

Valoración de la motilidad:

Para la valoración de la motilidad, se utiliza una cámara de recuento Makler en la cual una gota de 10µl de muestra se coloca sobre un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos, 22x22. Tras dejar reposar la muestra durante 1 minuto a 37°C, se procede a evaluar la motilidad de los espermatozoides bajo contraste de fases en un microscopio dotado de pletina térmica a 37°C. Se cuentan varios campos hasta visualizar 200 espermatozoides en cada preparación con el fin de clasificar la motilidad. La clasificación de los tipos de motilidad que introduce el quinto manual de la OMS ha supuesto un gran cambio con relación a manuales anteriores. En estos se diferenciaba la motilidad progresiva en lenta y rápida, estableciéndose el punto de corte de los dos en una velocidad de 25 micras por segundo.

En este nuevo manual se unifican en un solo tipo de motilidad, la motilidad progresiva, quedando por tanto sólo tres tipos de motilidad (Figura 3.4)

- ◆ Espermatozoides con motilidad progresiva (PR): lineal o en círculos amplios, independientemente de la velocidad.
- ◆ Espermatozoides con motilidad no progresiva (NP)
- ◆ Espermatozoides inmóviles (IM).

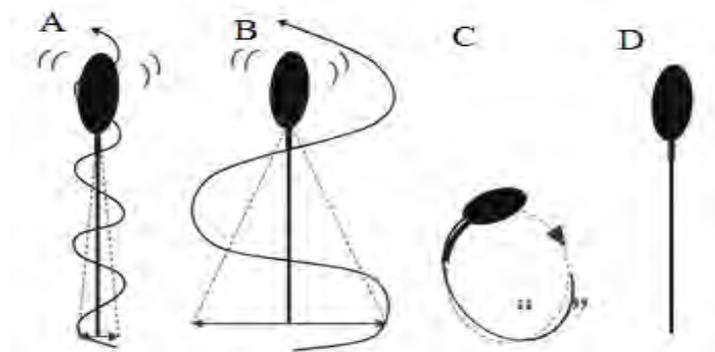


Figura 3.4 Tipos de motilidad de los espermatozoides (spz). A (progresivo rápido). B (progresivo lento) se agrupan en motilidad progresiva spz-PR. C es motilidad no progresiva spz-NP. D es un espermatozoide inmóvil-IM. (OMS, 2010).

Materiales y métodos

Para ello las siguientes precauciones fueron tomadas:

- ◆ El conteo de los espermatozoides se llevó a cabo a una distancia de los bordes mayor de 5 mm con objeto de prevenir artefactos.
- ◆ Se realizó un doble conteo, para ello dos portaobjetos fueron preparados.
- ◆ Al menos 5 campos fueron contados en cada uno de estos portaobjetos.
- ◆ Hay que contar al menos 200 espermatozoides por porta. Si no se consigue contando 5 campos, se deberá seguir hasta alcanzar ese número de 200.

Los recuentos de motilidad en las dos preparaciones de la misma muestra de semen fueron comparados según aconseja la OMS en el manual de Laboratorio para el examen del semen humano. En el caso de encontrar diferencias superiores a las esperadas (>5%) se realizan dos nuevas preparaciones y se repite todo el proceso. Como límite inferior de referencia se establece para la motilidad total en 40% (38%-42%), y para la motilidad progresiva 32% (31%-34%). Los valores inferiores corresponden a una **astenozoospermia** según la clasificación seminológica de la OMS.

Elementos celulares diferentes de los espermatozoides:

Además de espermatozoides, el eyaculado contiene otras células. Se pueden encontrar células epiteliales del tracto uretral, y células redondas, una terminología que agrupa a leucocitos y células de la espermatogénesis. El conteo de células redondas se realiza de forma rutinaria. Su concentración se determina en preparaciones frescas utilizando la cámara de Makler, dando su concentración en millones /mililitro. Según la OMS, un eyaculado normal debe contener menos de 5×10^6 células redondas/mL y el número de leucocitos no debe exceder de 1×10^6 /mL.

Aglutinación:

Las aglutinaciones están producidas por anticuerpos antiespermáticos y a menudo los espermatozoides móviles se adhieren entre ellos cabeza con cabeza, pieza intermedia con pieza intermedia, cola con cola o de otras maneras, como pieza intermedia con cola. La presencia de aglutinación sugiere la existencia de una causa inmunológica de la esterilidad, pero no es evidencia suficiente para probarlo.

A la adherencia de espermatozoides inmóviles o móviles con filamentos de mocos, con células que no son espermatozoides o con detritos no se la considera aglutinación y no se la debe anotar como tal. En este caso se habla de pseudoaglutinación. La aglutinación se determinó en 10 campos microscópicos elegidos al azar informándose la presencia y el tipo de aglutinación.

Se considera que existe un factor inmunológico cuando más del 50% de los espermatozoides móviles de un eyaculado tienen adheridos anticuerpos antiespermatozoide.

Viabilidad de los espermatozoides:

La viabilidad o vitalidad espermática refleja la proporción de los espermatozoides totales que están vivos de acuerdo al criterio de exclusión de algún colorante vital (Eliasson *et. al.*, 1971) o mediante la expresión de su capacidad osmorreguladora cuando se los expone a condiciones hiposmóticas (Jeyendran *et. al.*, 1984). La vitalidad puede servirnos como evaluación de los resultados de motilidad. Esto es así, porque el tanto por ciento de espermatozoides viables siempre debe ser igual o superior al de espermatozoides móviles. El objetivo es diferenciar entre los espermatozoides muertos y los espermatozoides vivos pero inmóviles.

En nuestro estudio la técnica utilizada para determinar la viabilidad espermática fue la Tinción supravital. Esta técnica se basa en el principio de que las células muertas cuyas membranas plasmáticas están dañadas, permiten la entrada de colorante. Un espermatozoide con la membrana celular intacta no se tiñe con eosina, mientras que un espermatozoide muerto absorbe el colorante rojo. Para ello se mezclaron 50µl de semen con dos gotas del colorante de **eosina Y** al 1% y a los 30 segundos se le añadieron tres gotas de nigrosina al 10% mezclándose bien. Posteriormente se hizo una extensión y se dejó secar al aire.

A continuación se observó al microscopio. Se contaron 200 espermatozoides con el microscopio electrónico (Nikkon) diferenciando a los espermatozoides vivos (no coloreados) de los muertos (coloreados). Si sólo se tiñe la zona del cuello o la cabeza tiene una ligera coloración rosa, se considera que el espermatozoide está vivo. El resultado se expresa en porcentaje. Se consideraron valores normales cuando el porcentaje de espermatozoides vivos fue del 58% o superior. Cuando todos los espermatozoides presentes en la muestra están muertos se denomina a la muestra **necrozoospermia**.

Morfología:

La morfología espermática representa una prueba global de la función espermática y está directamente relacionada con la capacidad fecundante del semen. Para el estudio de la morfología espermática se aplicó el protocolo de la OMS (OMS, 2010), siguiendo el conocido criterio *estricto de Kruger* (Menkveld, 1990). Según este criterio, se considera un espermatozoide morfológicamente normal cuando presenta las siguientes características (ver Figura 3.5):

Cabeza: Los espermatozoides normales deben tener una sola cabeza oval, perfectamente regular o ligeramente ahusada en la zona de la región postacrosómica, con un acrosoma bien definido que ocupe entre el 40 y 70% del área de la cabeza. La longitud de la cabeza deberá variar entre 5 y 6 micras, y su anchura entre 2,5 y 3,5 micras.

Pieza intermedia: La pieza intermedia será estrecha, unida axialmente a la cabeza y con una anchura inferior a una micra; su longitud deberá ser aproximadamente 1,5 veces la longitud de la cabeza. No debe haber ningún residuo citoplasmático de tamaño superior a la mitad del área de la cabeza.

Materiales y métodos

Cola: deberá ser recta o no presentar angulaciones bruscas que sugieran rotura, ligeramente más estrecha que la pieza intermedia, sin restos citoplasmáticos y con una longitud de 45 micras aproximadamente.

Restos citoplasmáticos: El área de los restos citoplasmáticos debe ser menor a 1/3 de la cabeza.

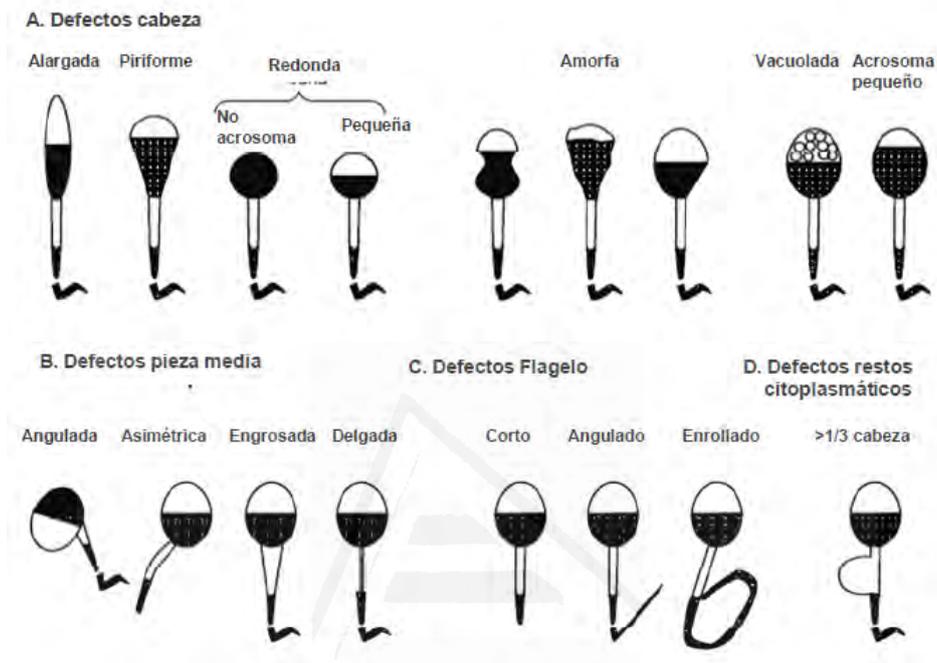


Figura 3.5 Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides. (OMS, 2010).

Está claro que muy pocos espermatozoides cumplen estas características, por lo que al utilizar el criterio estricto, no solo se habla de espermatozoides normales, sino también de casi-normales. Algunos espermatozoides pueden presentar más de un defecto simultáneamente. Al utilizar este criterio, en cada espermatozoide se cuenta solo una anomalía, la más importante, siendo el orden de importancia cabeza>pieza intermedia>cola.

Solo se cuentan las células reconocibles como espermatozoides, aunque las cabezas aisladas se toman como formas anormales. Se saca el porcentaje de cada tipo de defecto y de formas normales.

La morfología de los espermatozoides se evaluó utilizando un microscopio electrónico (Nikkon). Para la tinción se pueden utilizar el método de Giemsa, la tinción de Diff Quick o la técnica de Papanicolaou modificada para espermatozoides. La tinción de Papanicolaou es la más extendida por la mayoría de los laboratorios de andrología y es la técnica que hemos utilizado en el presente trabajo.

Los valores normales son los que presentan un 14% o más de formas normales o casi normales considerándose un buen pronóstico de fertilidad, mientras que por debajo del 14% de formas normales la tasa de fertilización *In Vitro* disminuye, llegando a ser poco probable

por debajo del 4%. El quinto manual de la OMS establece un valor para el límite inferior de referencia para la morfología espermática del 4%.

Como en técnicas anteriores, una vez obtenidos los resultados hay que evaluarlos utilizando la tabla del intervalo de confianza del 95% para diferencias de dos porcentajes. Si el error es mayor, no será necesario repetir las dos preparaciones como en el caso de la concentración, pero sí que se tendrá que repetir el conteo de ambas.

3.3 Análisis estadísticos de los datos

El análisis se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Para las variables cuantitativas se han calculado: la media, la desviación estándar, los valores máximos y los mínimos. Para las variables cualitativas, el resumen de datos se ha hecho mediante tablas de frecuencias absolutas y porcentajes. Para comparar medias en las muestras independientes se ha utilizado la prueba t de Student. Cuando las variables no han seguido una distribución normal, se han utilizado las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney y *Pearson* (r de Pearson). Se ha considerado significación estadística valores de < 0.05 .



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4. Resultados



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4. RESULTADOS

4.1 FASE I. Desarrollo del método de análisis para la determinación de PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs) en suero humano.

Determinación de dl-PCBs en las muestras de suero.

A continuación se presentan los resultados de los niveles de dl-PCBs en el suero sanguíneo de los participantes. En la Tabla 4.1 se muestran los valores de la media aritmética (pg/g de lípido) y la desviación estándar (DE), los valores mínimos y máximos de los 12 PCBs cuantificados en las muestras procedentes de los 21 pacientes incluidos en esta fase, y la concentración total de dl-PCBs (Σ dl-PCBs) expresados en pg/g de lípido y en pg WHO-TEQ/g de lípido. Así como el porcentaje de muestras con valores cuantificables por encima del límite de detección (LOD). Todos los congéneres analizados fueron detectados en todas las muestras de suero sanguíneo, a excepción del PCB 81 que únicamente se detectó en 4 muestras. La concentración total de los dl-PCBs (Σ dl-PCBs) obtenida estuvo en un rango de 6.90 a 84.1 pg WHO-TEQ/g lípidos, con una media de valor de 20.3 pg WHO-TEQ/g lípidos.

Tabla 4.1 Niveles de concentración de los diferentes congéneres de dl-PCBs (pg/g lípido) y valor total de toxicidad (pg WHO-TEQ/g lípido) en muestras de suero sanguíneo

	Media	DE	Mínimo	Máximo	% LOD	WHO-TEQ%
PCB 77	230	254	18.7	1110	81	0.14
PCB 81	72.5	53.8	14.3	250	19	0.15
PCB126	138	156	41.2	638	57	65.6
PCB 169	211	232	56.1	1010	81	30.1
PCB 105	527	315	137	1040	100	0.11
PCB 114	147	100	34.2	387	76	0.03
PCB 118	2171	1270	462	5220	100	0.47
PCB 123	138	94.3	23.0	368	62	0.03
PCB 156	1080	716	196	2630	100	0.25
PCB 157	269	180	85.5	823	95	0.06
PCB 167	322	212	66.6	788	95	0.07
PCB 189	345	337	103	1690	95	2.95
Σdl-PCBs	5650	2780	2020	13200		
WHO-TEQ dl-PCBs	20.3	22.4	6.90	84.1		

DE: Desviación estándar. % LOD: porcentaje de valores medios por encima del límite de detección. Σ dl-PCBs: suma de los valores de concentración en pg/g lípido de los 12 PCBs. WHO-TEQ dl-PCBs: suma de los valores de equivalencia tóxica de cada PCB. WHO-TEQ%: contribución de cada congénere al valor total de equivalencia tóxica.

Los congéneres que presentaron mayores niveles de concentración fueron, en este orden, PCB 118, PCB 156 y PCB 105, con valores medios de concentración de 2170, 1080 y 527 pg/g lípidos, respectivamente (Ver Figura 4.1).

Resultados

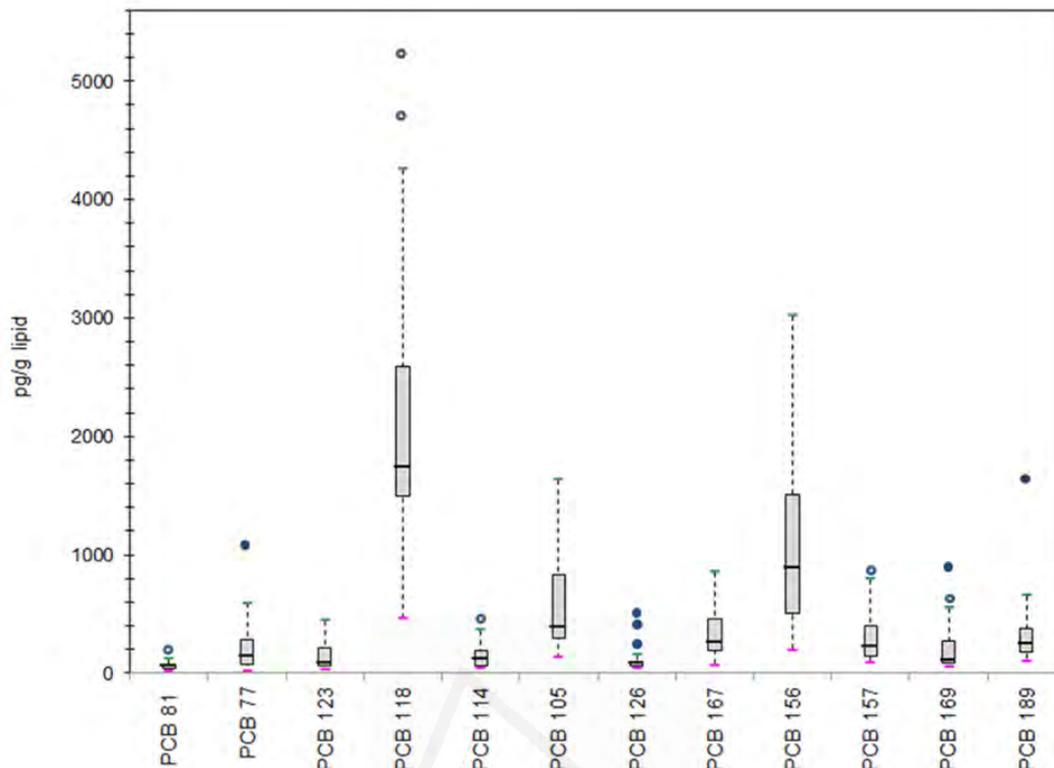


Figura 4.1 Boxplots de valores medios de concentración de dl PCBs.

La suma de estos tres PCBs contribuyó en un 67% al valor medio de los dl-PCBs en las muestras analizadas. Por otra parte, los congéneres PCB 126 y PCB 169 representan el 96 % del total de valor de WHO-TEQ, debido a sus altos niveles de toxicidad.

Estudio comparativo de los niveles de dl-PCBs entre grupos de sujetos en función de la edad y el Índice de masa corporal (IMC).

A fin de comprobar si existe alguna relación entre la edad y el IMC con los niveles de dl-PCBs determinados en suero, los sujetos de estudio fueron divididos en dos grupos según los siguientes rangos de edad: entre 30-40 años (10 sujetos) y entre 41-55 años (11 sujetos). A su vez, el índice de masa corporal (IMC) fue categorizado en dos grupos: IMC<25 y IMC 25-29.9 por lo que finalmente solo se establecieron dos categorías para el índice de masa corporal.

Al analizar las diferencias de las concentraciones de dl-PCBs en suero en relación a la edad de los sujetos, se observó que las concentraciones de dl-PCBs fueron superiores en el grupo de sujetos de mayor edad, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. En el caso del IMC, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos establecidos, pero sí se observó que los niveles de dl-PCBs fueron superiores en el grupo de sujetos que presentaban un peso normal (IMC <25) con respecto al grupo de sujetos con sobrepeso (IMC 25-29) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Concentraciones de dl-PCBs (pg WHO-TEQ /g lípido) en muestras de suero en función de la edad (años) y el IMC (kg/m²).

	Media±DE	Mínimo	Máximo
Edad (años)			
30-40	19.2±14.3	7.40	84.2
41-55	21.3±17.8	6.90	83.9
IMC (kg/m²)			
IMC<25	29.9±23.5	6.90	84.2
IMC 25-29	11.9±4.6	7.40	19.2

DE: Desviación estándar; NS: no significativo estadísticamente.

4.2 FASE II. Estudio de la influencia de las concentraciones de los PCBs similares a dioxinas sobre la calidad seminal.

Características de los sujetos de estudio

En el siguiente apartado se presentan los resultados obtenidos en el cuestionario sociodemográfico y clínico. Para las variables cualitativas, se calculó el valor de n y el porcentaje de frecuencia y, en algunas de ellas se categorizó según el número de valores que pudieran tomar. En los casos de variables cuantitativas se estimó la media, la desviación estándar (DE) y los valores máximos y mínimos para cada una de ellas.

La totalidad de los sujetos en este estudio eran de raza blanca y procedían del Norte de Europa, con un nivel socioeconómico medio-alto.

La edad media de los varones incluidos en el presente estudio fue de 38 años (± 5.01), con un mínimo de 30 y un máximo de 54 años respectivamente. La media de edad en función del grupo al que pertenecían los varones fue de 43.5 (±5.63) años para el grupo de baja calidad seminal, y de 39.5 (±6.01) para el grupo control. Cuando la edad de los sujetos fue comparada, no se observaron diferencias significativas entre los grupos .

La variable cuantitativa índice de masa corporal (IMC), fue calculada dividiendo el peso en kg entre la talla en metros, elevada al cuadrado (kg/m²). La media fue de 24.46 (± 2.28), lo que indica que los sujetos no presentaban sobrepeso según los valores de la OMS (OMS, 2000). Además, se analizó la distribución de los sujetos según su IMC tomando como referencia los rangos de IMC adoptados por la OMS, observándose que un 79.2% de los varones que presentaban baja calidad seminal se encontraban en los rangos correspondientes a peso normal (IMC<25), mientras que un 20.8 % presentaban sobrepeso (IMC 25-29).

Para analizar el efecto del tabaco en los parámetros seminales, a los sujetos se les preguntó sobre sus costumbres en cuanto al consumo de tabaco. En este estudio los sujetos de ambos grupos fueron expuestos de forma similar al tabaco. Aproximadamente el 83.3 % de los individuos que presentaban baja calidad seminal declaró no haber fumado en los últimos 3 meses, a pesar de que en el momento de la entrevista había menos fumadores en el grupo control (3.8 %).

Resultados

Durante la realización del cuestionario también se solicitó información sobre el lugar de residencia. Esta variable se categorizó considerando residencia rural a aquellas poblaciones con un número de habitantes menor o igual a 10.000 y residencia urbana a aquellas poblaciones con mas de 10.000 habitantes. En función de esta categorización, se encontró una distribución casi paritaria de los participantes.

Debido a que muchos estudios epidemiológicos han relacionado la ocupación laboral, específicamente en actividades industriales, con una disminución de la calidad seminal, se categorizó esta variable en tres categorías. La mayoría de los varones con problemas de fertilidad (79.2 %) se dedicaban a profesiones liberales y el resto a actividades administrativas (20.8 %). Es importante destacar que ninguno de los sujetos participantes declaró participar en actividades industriales, lo cual indica que no hubo exposición ocupacional específica a dl-PCBs .

En la Tabla 4.3 se muestran a modo de resumen los datos generales de la encuesta realizada de cada grupo.

Tabla 4.3. Datos biológicos y sociodemográficos entre los grupos estudiados

	Total (n= 50)	Grupo de baja calidad seminal (n= 24)	Grupo Control (n= 26)	<i>p-valor</i>
Edad (años) [Media ± DE]	38.01±5.01	43.5±5.63	39.5±6.01	n.s
IMC (kg/m²) [Media ± DE]	24.46 ± 2.28	24.44±1.79	24.47±1.59	n.s
IMC (kg/m2) [n (%)]				
Normal <25	38 (76%)	19 (79.2%)	19 (73.0%)	n.s
Sobrepeso 25-30	12 (24%)	5 (20.8%)	7 (26.9%)	n.s
Fumadores [n (%)]				
No fumador	42 (84%)	20 (83.3%)	22 (84.6%)	n.s
Ex-fumador	5 (10%)	2 (8.3%)	3 (11.5%)	n.s
Fumador	3 (6%)	2 (8.3%)	1 (3.8%)	n.s
Profesión [n (%)]				
*Profesión liberal	42 (84%)	19 (79.2%)	23 (88.5%)	n.s
Administrativo	8 (16%)	5 (20.8%)	3 (11.5%)	n.s
**Actividades Industriales	-	-	-	
Lugar de residencia [n (%)]				
Urbano	27 (54%)	13 (54.1%)	14 (53.8%)	n.s
Rural	23 (46%)	11 (45.8%)	12 (46.15%)	n.s

*En la categoría de Profesión Liberal se han incluido las siguientes profesiones declaradas: profesor, abogado, economista.

**En la categoría Actividades industriales se incluye la industria metalúrgica, química, trabajadores de incineradoras, etc.

n.s :no significativa

Resultados del seminograma

En la Tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos en los análisis de semen realizados a los dos grupos de estudio mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se muestran en forma de medias y desviaciones típicas.

Como podemos observar, cuando se analizaron las diferencias entre grupos en relación a la calidad seminal se encontraron diferencias altamente significativas para los siguientes parámetros seminales: concentración espermática ($10^6/\text{mL}$) ($p=0.000$), número total de espermatozoides por eyaculado (10^6) ($p=0.000$), motilidad progresiva (%) ($p=0.000$), la viabilidad (%) ($p=0.000$), y morfología espermática (%) ($p=0.000$). Siendo los valores medios de estos parámetros inferiores en los varones del grupo de baja calidad seminal cuando lo comparamos con los del grupo control.

Con respecto al volumen seminal (mL) y el pH, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos .

Tabla 4.4 Diferencias entre los parámetros seminales entre los grupos estudiados

Parámetros	Grupo de baja calidad seminal (n = 24)	Grupo Control (n = 26)	p-valor
	Media \pm DE	Media \pm DE	
pH	8.01 \pm 0.14	8.04 \pm 0.11	0.521
Volumen seminal (mL)	2.48 \pm 1.55	2.82 \pm 0.91	0.472
Concentración espermática ($10^6/\text{mL}$)	24.70 \pm 33.97	73.25 \pm 52.99	0.000*
Nº total de espermatozoides (10^6)	38.05 \pm 52.84	184.94 \pm 116.33	0.000*
Motilidad progresiva (%)	20.22 \pm 23.55	59.44 \pm 13.62	0.000*
Viabilidad (%)	62.28 \pm 21.93	86.81 \pm 6.79	0.000*
Morfología normal (%)	5.36 \pm 4.85	13.50 \pm 4.75	0.000*

DE: Desviación estándar

Diferencias significativas $p \leq 0.001$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Niveles de colesterol y triglicéridos en suero

En la Tabla 4.5 se muestra la distribución de los sujetos de estudio en función de sus valores de colesterol total y triglicéridos en sangre necesarios para expresar las concentraciones de PCBs en pg/g lípido y en pg WHO-TEQ/g de lípido.

El valor medio para colesterol total (195.07 mg/dL) y triglicéridos (133.78 mg/dL) en el grupo de sujetos con baja calidad seminal fue ligeramente mayor con respecto al grupo control. Sin embargo al analizar las diferencias entre ambos grupos no se encontraron diferencias significativas.

Resultados

Según la clasificación de la OMS los valores medios obtenidos de colesterol total y triglicéridos en ambos grupos se encuentran dentro de los límites establecidos (Colesterol total < 200 mg/dL y Triglicéridos < 200 mg/dL).

Tabla 4.5. Valores de colesterol total y triglicéridos en suero entre los grupos estudiados.

Parámetros	Grupo de baja calidad seminal (n = 24)	Grupo Control (n = 26)	
	Media ± DE	Media ± DE	p-valor
Colesterol total (mg/dL)	195.07 ± 22.96	192.75 ± 36.31	0.273
Triglicéridos (mg/dL)	133.78 ± 52.07	130.25 ± 55.22	0.972

Diferencias significativas $p \leq 0.05$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney

Estudio comparativo de los niveles dl-PCBs entre grupos de sujetos en función de los parámetros seminales.

Utilizando el método desarrollado en la primera fase se procedió a la determinación de la concentración de los dl-PCBs en suero expresados en pg/g de lípido. Al analizar las concentraciones de cada uno de los PCBs (Tabla 4.6) entre los dos grupos, aunque se observaron valores superiores en el grupo de sujetos con baja calidad seminal con respecto al grupo control, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el PCB mono-orto 105 ($p = 0.031$).

Tabla 4.6. Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de cada uno de los 12 dl-PCBs expresadas en pg/g de lípido en muestras de suero.

	Grupo de baja calidad seminal (n=24)	Grupo Control (n=26)	p-valor
PCBs no-orto	Media ± DE	Media ± DE	
PCB-77	492.61 ± 519.96	222.51 ± 331.34	0.109
PCB-81	71.22 ± 42.09	57.49 ± 24.07	0.294
PCB-126	152.47 ± 138.27	99.56 ± 81.37	0.224
PCB-169	233.18 ± 243.62	128.84 ± 83.48	0.147
PCBs mono-orto			
PCB-105	821.13 ± 506.29	451.38 ± 322.87	0.031*
PCB-114	189.12 ± 171.21	121.87 ± 108.36	0.220
PCB-118	2695.28 ± 1337.63	1877.31 ± 1135.20	0.085
PCB-123	192.28 ± 177.53	216.28 ± 419.79	0.837
PCB-156	1189.29 ± 786.62	874.68 ± 413.15	0.195
PCB-157	264.60 ± 163.69	228.23 ± 200.79	0.589
PCB-167	294.54 ± 261.99	275.31 ± 146.27	0.810
PCB-189	434.22 ± 392.76	252.46 ± 126.56	0.118

DE: Desviación estándar. Diferencias significativas $p \leq 0.05$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Habría que destacar que en el caso del PCB 123, este fue superior en los individuos del grupo control al compararlo con el grupo de sujetos que presentaban una baja calidad seminal.

Por otra parte, los PCBs presentes en mayor concentración entre los varones con baja calidad seminal y el grupo control fueron el PCB 118 (2695.28 vs. 1877.31 pg/g de lípido); PCB 156 (1189.29 vs. 874.68 pg/g de lípido) y PCB 105 (821.13 vs. 451.38 pg/g de lípido) respectivamente.

A continuación se compararon las diferencias entre las medias de los no-orto PCBs (77, 81, 126 y 169); mono-orto PCBs (105, 114, 123, 156, 157, 167, 189) y el total de los 12 dl-PCBs analizados. Cuando se analizaron las diferencias entre grupos en relación a las concentraciones de dl-PCBs se encontraron diferencias significativas como se puede observar en la Tabla 4.7 para las tres variables analizadas.

Tabla 4.7. Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de no-orto, mono-orto y concentración total de PCBs expresadas en pg/g de lípido en muestras de suero.

	Grupo de baja calidad seminal (n=24)	Grupo Control (n=26)	<i>p</i> -valor
	Media ± DE	Media ± D E	
Σno-orto PCBs	949.49 ± 624.96	508.40 ± 324.43	.020*
Σmono-orto PCBs	6080.46 ± 2754.89	4297.52 ± 2030.13	.043*
Σdl-PCBs	7029.96 ± 3023.97	4805.92 ± 2205.02	.028*

DE: Desviación estándar. Diferencias significativas $p \leq 0.05$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Σno-orto PCBs: Suma de los valores de concentración en pg/g lípido de los PCBs no-orto. Σmono-orto PCBs: Suma de los valores de concentración en pg/g lípido de los PCBs mono-orto. Σdl-PCBs: Suma de los valores de concentración en pg/g lípido de los 12 PCBs.

Aquellos sujetos con parámetros seminales alterados mostraron niveles significativamente más altos de los PCBs no-orto (949.49 ± 624.97 pg/g de lípido; $p=0.020$) y Σdl-PCBs (7029.96 ± 3023.97 pg/g de lípido; $p=0.028$) que los del grupo control (508.40 ± 324.44 pg/g de lípido y 4805.92 ± 2205.02 pg/g de lípido) respectivamente.

Además, en el caso de las concentración de los PCBs mono-orto los sujetos con baja calidad seminal presentaban concentraciones significativamente superiores (6080.46 ± 2754.89 pg/g de lípido) con respecto al grupo control (4297.52 ± 2030.13 pg/g de lípido) ($p=0.043$).

Con el objetivo de comparar el grado de toxicidad de las muestras analizadas entre el grupo de sujetos que presentaban una baja calidad seminal frente al grupo de sujetos que presentaban una buena calidad seminal, se calcularon los valores de equivalente tóxico para cada PCB (Tabla 4.8), multiplicando los valores de concentración de cada compuesto por el valor TEF correspondiente.

Resultados

Tabla 4.8 .Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de cada uno de los 12 dl-PCBs expresadas en WHO-TEQ pg/g de lípido en muestras de suero.

	WHO-TEF (2005)	Grupo de baja calidad seminal (n=24)	Grupo Control (n=26)	p-valor
PCBs no-orto		Media ± DE	Media ± DE	
PCB-77	0.0001	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.03	0.109
PCB-81	0.0003	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.294
PCB-126	0.1	15.25 ± 13.83	9.95 ± 8.14	0.224
PCB-169	0.03	6.99 ± 7.30	3.58 ± 2.50	0.147
PCBs mono-orto				
PCB-105	0.00003	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.031*
PCB-114	0.00003	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.220
PCB-118	0.00003	0.08 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.085
PCB-123	0.00003	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.837
PCB-156	0.00003	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.195
PCB-157	0.00003	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.589
PCB-167	0.00003	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.810
PCB-189	0.00003	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.118

DE: Desviación estándar. Diferencias significativas $p \leq 0.05$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Cuando se analizaron los niveles de toxicidad de cada uno de los 12 dl-PCBs determinados en suero, se observó que los PCB 126 y 169 eran los que presentaban mayores valores de equivalencia tóxica para ambos grupos, aunque estos valores fueron superiores en el grupo de sujetos que presentaban los parámetros seminales alterados (15.25 pg-WHO-TEQ/g de lípido y 6.99 pg-WHO-TEQ/g de lípido) respectivamente (Tabla 4.8). Con la suma de todos los TEQs de los distintos congéneres analizados en las muestras se obtuvo el valor de toxicidad equivalente total (WHO-TEQ total) y a su vez el valor de toxicidad equivalente de los PCBs mono-orto y no-orto. En la Tabla 4.9 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.9. Diferencias entre los grupos en función de las concentraciones de PCBs no-orto, mono-orto y Σ dl-PCBs expresadas en pg WHO-TEQ/g de lípido en muestras de suero

WHO-TEQ ^a	Grupo de baja calidad seminal (n=24)	Grupo Control (n=26)	p-valor
	Media ± DE	Media ± DE	
ΣNo-orto PCBs	22.31 ± 20.58	13.57 ± 9.31	0.226
ΣMono-orto PCBs	0.18 ± 0.08	0.12 ± 0.06	0.044*
Σdl-PCBs	22.49 ± 20.28	13.69 ± 9.29	0.143

DE: Desviación estándar. Diferencias significativas $p \leq 0.05$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

^aWHO-TEQ: Valor de equivalencia tóxica. Σ No-orto PCBs: Suma de los valores de equivalencia tóxica de los PCBs no-orto. Σ Mono-orto PCBs: Suma de los valores de equivalencia tóxica de los PCBs mono-orto. Σ dl-PCBs: Suma de los valores de equivalencia tóxica de cada uno de los 12 PCBs.

De esta manera, se observó que los niveles de concentración de equivalentes tóxicos totales de los dl-PCBs (Σ dl-PCBs) y de los PCBs no-orto (Σ No-orto PCBs) fueron superiores en el grupo de sujetos con baja calidad seminal, aunque tras la aplicación del test estas diferencias resultaron no ser estadísticamente significativas ($p=0.226$ y $p=0.143$) respectivamente. Sin embargo, el valor medio de los PCBs mono-orto en los sujetos con baja calidad seminal (0.18 ± 0.08 pg-WHO-TEQ/g de lípido) fue estadísticamente mayor cuando fue comparado con el valor medio del grupo control (0.12 ± 0.06 pg-WHO-TEQ/g de lípido) ($p<0.05$).

Estudio comparativo de los niveles de dl-PCBs entre grupos de sujetos en función de la edad y el Índice de masa corporal (IMC).

En esta segunda fase del estudio, también comprobamos si existía alguna relación entre la edad y el IMC con los niveles de dl-PCBs determinados en suero. En este caso los sujetos de estudio fueron divididos en dos grupos según los siguientes rangos de edad: entre 30-40 años (22 sujetos) y entre 41-54 años (28 sujetos). El índice de masa corporal (IMC) fue categorizado en dos grupos: IMC<25 y IMC 25-29.9 por lo que finalmente solo se establecieron dos categorías para el índice de masa corporal (Ver Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Concentraciones de dl-PCBs (pg WHO-TEQ /g lípido) en muestras de suero en función de la edad (años) y el IMC (kg/m²).

	Media \pm DE	p-valor
Edad (años)		
30-40	12.23 \pm 7.65	0.03
41-54	23.76 \pm 20.14	
IMC (kg/m²)		
IMC<25	16.69 \pm 13.61	N.S
IMC 25-29	12.34 \pm 9.02	

DE:Desviación estándar; NS:no significativo estadísticamente.

Diferencias significativas $p\leq 0.05$ (*) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Cuando analizamos las diferencias de las concentraciones de dl-PCBs en suero en relación a la edad de los sujetos, se observa que las concentraciones de dl-PCBs fueron superiores en el grupo de sujetos de mayor edad, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.03$). En el caso del IMC, se observó que los niveles de dl-PCBs fueron superiores en el grupo de sujetos que presentan un peso normal (IMC <25) con respecto al grupo de sujetos con sobrepeso (IMC 25-29), pero no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos establecidos.

4.2.1 Estudio de correlación entre las variables estudiadas

En este apartado se analiza el tipo de relaciones existentes entre todas las variables estudiadas. El estudio de correlaciones entre las variables y las concentraciones de dl-PCBs en suero se ha estudiado mediante la aplicación del test estadístico no paramétrico de correlación de *Pearson*.

Resultados

Relación entre las concentraciones de dl-PCBs y las características de los sujetos de estudio.

En la Tabla 4.11 se exponen los resultados de la relación existente entre las variables clínicas y sociodemográficas de los sujetos con las concentraciones de dl-PCBs.

Se encontró una correlación significativa con la edad ($p=0.027$), siendo los varones con concentraciones superiores de dl-PCBs en suero los de mayor edad.

También se encontró una correlación estadísticamente significativa con el índice de masa corporal (IMC) ($p=0.019$). En este caso, los niveles de dl-PCBs eran más elevados en aquellos sujetos que presentan un IMC menor.

Tabla 4.11. Correlación entre las concentraciones de dl-PCBs y las características de los sujetos

Variables	r Pearson	p-valor
Edad (años)	0.403*	0.027
IMC (kg/m ²)	-0.425*	0.019
Fumadores	0.101	0.594
Profesión	0.323	0.114
Lugar de residencia	-0.223	0.237

*La correlación es significativa para $p<0.05$.

Por otro lado, no se encontró una correlación significativa para las concentraciones de PCBs con el tabaquismo, la profesión y el lugar de residencia.

Relación entre las concentraciones de dl-PCBs y los parámetros seminales.

A continuación se muestra la correlación existente entre las concentraciones de congéneres individuales de PCBs, la concentración total de PCBs no-orto (Σ No-orto PCBs), la concentración total de PCBs (Σ dl-PCBs) y los parámetros seminales (Tabla 4.12).

Como puede observarse, la motilidad progresiva se correlaciona negativamente con el PCB 126 ($p=0.037$), PCB 189 ($p=0.024$) y con la concentración total de dl-PCBs ($p=0.050$). Es decir, los sujetos con concentraciones superiores de dl-PCBs en suero sanguíneo presentaban una disminución de la motilidad espermática.

Tabla 4.12. Correlación entre congéneres de PCBs, non-orto y total PCBs y los parámetros seminales

Concentración dl-PCBs	Motilidad progresiva(%)		Viabilidad (%)		Morfología (% normales)	
	r Pearson	p-valor	r Pearson	p-valor	r Pearson	p-valor
PCB 126	-0.382*	0.037	-0.557**	0.001	-0.220	0.244
PCB 169	-0.349	0.058	-0.542**	0.002	-0.357	0.052
PCB 123	0.067	0.727	0.042	0.825	0.373*	0.042
PCB 189	-0.411*	0.024	-0.581**	0.001	-0.441*	0.015
Σ Non-orto PCBs	-0.346	0.061	-0.505**	0.004	-0.249	0.185
Σ dl-PCBs	-0.455*	0.050	-0.413*	0.023	-0.183	0.334

*La correlación es significativa para $p<0.05$. ** La correlación es significativa para $p<0.01$

A su vez, respecto a la viabilidad de los espermatozoides, se observó una correlación negativa estadísticamente significativa entre la viabilidad y los PCBs: 126 ($p=0.001$), PCB 169 ($p=0.002$) y 189 ($p=0.001$). Además, también se observó una asociación negativa entre la viabilidad y la concentración de los PCBs no-orto ($p=0.004$) y la concentración total de dl-PCBs ($p=0.023$), siendo el porcentaje de espermatozoides vivos menor en aquellos varones con una mayor concentración de dl-PCBs en suero.

En cuanto a la morfología espermática, se observó una asociación estadísticamente significativa y negativa entre las formas normales y el PCB 189 ($p=0.015$). Por lo que aquellos sujetos con una mayor concentración de dl-PCBs presentaban un menor porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

Sin embargo, cabe destacar que la morfología espermática fue asociada positivamente con el PCB 123 ($p=0.042$), es decir, al aumentar la concentración de este contaminante también lo hacía el porcentaje de formas normales de espermatozoides. Este tipo de asociación podría en parte ser explicada a que en el caso del PCB 123, este fue superior en los individuos del grupo control al compararlo con el grupo de sujetos que presentaban una baja calidad seminal.

Por último, otros parámetros seminales como la concentración seminal, el volumen seminal y el número total de espermatozoides por eyaculado no mostraron ningún tipo de correlación con las concentraciones de dl-PCBs determinadas.

5. Discusión



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5. DISCUSIÓN

5.1 FASE I. Desarrollo del método de análisis para la determinación de PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs) en suero humano.

En los últimos años ha aumentado notablemente la preocupación por la presencia de PCBs similares a las dioxinas en el medio ambiente debido a su elevada toxicidad. Se han descrito en la bibliografía asociaciones de estos compuestos con un elevado número de posibles efectos tóxicos responsables de distintas patologías, en animales y humanos, principalmente en el sistema reproductor masculino (Leijds *et. al.*, 2014; Foster *et. al.*, 2010). A pesar de que la producción de estos contaminantes se prohibió hace más de 20 años en los países occidentales, estos compuestos están presentes en el organismo debido a su lenta biodegradación. Este hecho conlleva que aunque la exposición sea a dosis bajas, los niveles que pueden acumularse en un organismo sean lo suficientemente elevados como para provocar efectos perjudiciales a largo plazo, lo cual implica un evidente riesgo para la salud. Por todo ello, es importante desarrollar métodos de análisis precisos, robustos y económicos para identificar la presencia de dl-PCBs con el propósito de ayudar a prevenir efectos adversos en el sistema reproductivo provocados por la exposición a tales agentes.

De manera que en esta primera fase del presente trabajo, se desarrolló un método para el análisis de dl-PCBs en muestras humanas de suero. Esta técnica permitió simplificar notablemente el tratamiento de muestra en comparación con las técnicas tradicionales, lo cual supone una reducción en los costes de análisis (reduciendo el tiempo de análisis y el consumo de disolvente), proporcionando una alternativa para aquellos métodos que utilizan grandes volúmenes de disolvente o costosos procedimientos de extracción/Clean-up, además de ser un procedimiento ambientalmente sostenible (debido a la menor cantidad de residuos generados). El desarrollo de esta metodología ha permitido determinar dl-PCBs en pequeños volúmenes de muestra de suero (1 mL), constituyendo una gran ventaja, teniendo en cuenta que la mayor limitación cuando se trabaja con muestras de fluidos biológicos es la poca cantidad disponible de esta matriz. Permitiendo la optimización de la metodología llevar a cabo un estudio individualizado por paciente.

El método analítico desarrollado fue aplicado en el análisis de muestras de suero de 21 pacientes con problemas de fertilidad, demostrándose que la exposición a estos compuestos es importante debido a la identificación y cuantificación de 11 de los 12 congéneres en el 100% de las muestras de analizadas, a excepción del PCB 81. El hecho de que la mayoría de las muestras tuvieran niveles detectables de dl-PCBs es una muestra clara de la persistencia que poseen estos compuestos.

Las determinaciones realizadas permitieron conocer los niveles de exposición a estas sustancias químicas en nuestros sujetos de estudio, obteniéndose una media de 20.3 pg WHO-TEQ/g lípidos. Cuando comparamos nuestros resultados con los publicados en la literatura observamos que los niveles de dl-PCBs en sangre, hallados en nuestro estudio, fueron similares a los encontrados en España (País Vasco), donde se obtuvo una media de 20.47 pg WHO-TEQ g/ de lipido (Zubero *et. al.*, 2011). En contraste, en una revisión bibliográfica donde se incluyen estudios epidemiológicos realizados desde 1989 hasta 2010

Discusión

(Consonni *et. al.*, 2012) en población general no expuesta directamente a fuentes de emisión de estos compuestos, se cuantificó un TEQ medio total por dl-PCBs de aproximadamente 3.7 pg WHO-TEQ /g de lípido. Varios autores han evaluado la exposición a dl-PCBs en muestras de suero de poblaciones que viven cerca de áreas industriales o plantas incineradoras. Los autores compararon los niveles de dl-PCBs de diferentes poblaciones y encontraron que el valor medio de las concentraciones estaba en un rango de 4.1 y 15.6 pg WHO-TEQ g/ de lípido (Zubero *et. al.*, 2009). Siendo nuestros valores superiores a los encontrados en estos estudios.

Con respecto a la relación entre la edad con los niveles de dl-PCBs determinados en suero se observó que las concentraciones de dl-PCBs fueron superiores en el grupo de sujetos de mayor edad si bien es cierto que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Generalmente, las concentraciones de compuestos organoclorados en muestras humanas tiende a incrementar con la edad (Chen *et. al.*, 2013) atribuible a una mayor bioacumulación por exposición crónica (De Caprio *et. al.*, 2005; Arrebola *et. al.*, 2012).

El papel desempeñado por el IMC todavía no está bien establecido y existe controversia con respecto a la dirección de su asociación. Uno de los principales hallazgos es que los PCBs menos clorados son positivamente asociados con el IMC, mientras que los que presentan un alto grado de cloración muestran una asociación negativa (Ron *et. al.*, 2011). Existen estudios como los de Fernández *et. al.* que relacionan de forma positiva los niveles de PCBs con el IMC (Fernández *et. al.*, 2008). Sin embargo, en nuestro estudio al igual que otros autores como Cerná *et. al.* y Agudo *et. al.* los niveles de dl-PCBs fueron superiores en el grupo de sujetos que presentaban un peso normal con respecto al grupo de sujetos con sobrepeso (Agudo *et. al.*, 2009; Cerná *et. al.*, 2008).

En este estudio los PCB 126 y PCB 169 fueron los que aportaron la mayor parte, (96 %), del total de valor de WHO-TEQ, debido a que estos congéneres son los que tienen asignado un factor de equivalencia tóxica más alto (TEF). Los congéneres analizados en este estudio, que presentaron mayores niveles de concentración fueron, en este orden, PCB 118, PCB 156 y PCB 105 contribuyendo la suma de estos tres congéneres en un 67% al valor medio de los dl-PCBs en las muestras analizadas. En determinaciones de dl-PCBs llevada a cabo con muestras de suero provenientes de población no expuesta, la mayor incidencia en las muestras la tiene el PCB 118, PCB 156 y el PCB 167 (De Felip *et. al.*, 2008), mientras que en un estudio realizado en Canarias los PCB 156 y 167 son los que presentan mayores niveles de concentración (Henríquez-Hernández *et. al.*, 2011).

Con estos resultados podemos concluir, que el desarrollo de esta metodología y su aplicación en el análisis a nivel individual de dl-PCBs en varones con problemas de fertilidad, constituye una herramienta que nos permite valorar la significación clínica y sanitaria de las concentraciones de estos compuestos en suero.

5.2 FASE II. Estudio de la influencia de las concentraciones de los PCBs similares a dioxinas (dl-PCBs) sobre la calidad seminal.

En la actualidad muchos estudios han mostrado un declive en la calidad del semen humano y un riesgo incrementado de subfertilidad masculina (Carlsen *et. al.*, 1992; Swan *et. al.*, 2000). Se ha planteado como probable causa de este fenómeno los posibles efectos adversos que en el sistema reproductor masculino parecen tener algunos factores (Kidd *et. al.*, 2001; Rybar *et. al.*, 2011).

El tabaquismo, la contaminación ambiental, la obesidad o una edad elevada son factores que pueden afectar a la producción y la calidad seminal y aunque la literatura al respecto es controvertida, si existe una mayoría de autores que los consideran dañinos para la salud reproductiva (Li *et. al.*, 2011). Algunos de estos factores pueden conducir a la obtención de conclusiones no apropiadas, por lo cual se tuvieron en cuenta en el momento de diseño de este trabajo.

En nuestro estudio la edad media de los varones incluidos fue de 38 años (± 5.01), con un mínimo de 30 y un máximo de 54 años respectivamente. Cuando la edad de los sujetos fue comparada en función de la calidad seminal, no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Otros autores tampoco observan el descenso en los parámetros seminales con la edad (Krause *et. al.*, 2000). Aunque una revisión de conjunto realizada entre enero de 1980 y diciembre de 1999 de todos los trabajos publicados en lengua inglesa concluye que el peso de la evidencia sugiere que la elevada edad masculina va relacionada con el decremento de los parámetros analizados, con variaciones de entre un 3 y 22% en el volumen seminal, de un 3 y 37% en la motilidad seminal y un 4 y 18% en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, cuando se comparan varones de 30 y 50 años (Kidd *et. al.*, 2001).

De entre las variables de estilo de vida más frecuentemente descritas y asociadas con los parámetros seminales, se encuentra el hábito de consumo de tabaco. Muchos estudios han demostrado que el consumo de tabaco afecta los parámetros seminales, algunos autores han encontrado alteraciones en cuanto a la concentración, motilidad progresiva y /o morfología (Braga *et. al.*, 2012; Kunzle *et. al.*, 2003; Ozgur *et. al.*, 2005; Taha *et. al.*, 2012); por el contrario otros trabajos han concluido que este hábito no afecta los parámetros seminales (Li *et. al.*, 2009; Pasqualotto *et. al.*, 2008; Trummer *et. al.*, 2002). En el presente estudio no se observaron diferencias significativas que nos puedan indicar una relevancia clínica del efecto del tabaco sobre la calidad seminal.

Con respecto a la obesidad, se conoce que puede asociarse al desarrollo de disfunción sexual eréctil, enfermedad vascular y demás componentes del síndrome metabólico. Sin embargo, en las publicaciones que intentan vincular la obesidad masculina con alteraciones en la calidad seminal, los resultados son contradictorios y controvertidos a la vez. En este sentido, algunos autores (Braga *et. al.*, 2012; Kort *et. al.*, 2006) muestran que individuos con un índice de masa corporal (IMC) $> 25 \text{ kg/m}^2$ cursan con una disminución significativa de la motilidad y la morfología espermática respecto a individuos con peso normal. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con estos datos, debido a que no se encontraron diferencias significativas en cuanto al IMC cuando comparamos los dos grupos. Esto podría deberse a

Discusión

que nuestros sujetos de estudio presentaban una media de 24,46 kg/m² lo que indica que los sujetos presentaban un peso normal según los valores de la OMS (OMS, 2000). Coincidiendo con nuestros resultados, otros autores (Eskandar *et. al.*, 2011; Relwani *et. al.*, 2011) no han encontrado una correlación entre el IMC y algunos de los parámetros de calidad seminal, como los porcentajes de motilidad, formas normales y concentración espermática.

Se plantea que al menos la mitad de los casos de la esterilidad de causa desconocida del varón, podrían atribuirse o relacionarse con distintas exposiciones ambientales u ocupacionales (Jungwirth *et. al.*, 2012). Son numerosos los trabajos que han vinculado exposiciones a disruptores endocrinos con un deterioro de la función reproductiva masculina en los últimos 50 años (Bonde *et. al.*, 2014; Hauser *et. al.*, 2003; Mendiola *et. al.*, 2010; Mocarelli *et. al.*, 2011; Wyrobek *et. al.*, 1997). Sin embargo, pocos estudios han investigado el impacto de la exposición a dl-PCBs sobre los parámetros seminales en el ser humano. Así pues, y apoyándonos en estos estudios previos, en esta fase se llevó a cabo un estudio donde analizamos la influencia de las concentraciones de los dl-PCBs sobre la calidad seminal.

Los resultados obtenidos en esta fase muestran que las concentraciones de dl-PCBs fueron significativamente mayores en el grupo de varones con baja calidad seminal con respecto al grupo control. Así mismo en cuanto a los valores de equivalencia tóxica los valores fueron mayores en los individuos con baja calidad del semen, aunque solo estadísticamente significativo para los mono-orto PCBs. Estos resultados sugieren que el deterioro de la calidad seminal como consecuencia de la exposición a disruptores endocrinos, como los dl-PCBs, es biológicamente plausible.

En línea con nuestros resultados, en el estudio de Rozati *et. al.* se encontraron PCBs en el plasma seminal de varones de parejas infértiles mientras que no se hallaron en los controles (parejas de mujeres embarazadas) (Rozati *et. al.*, 2002). La relación entre exposición medioambiental a compuestos similares a dioxinas y calidad seminal también ha sido estudiada por otros autores (Hauser *et. al.*, 2005; Galimova *et. al.*, 2015). Los resultados encontrados, por estos autores, indican una menor motilidad, y una disminución de la concentración y porcentaje de espermatozoides con morfología normal entre los sujetos expuestos a compuestos similares a dioxinas.

Al comparar los resultados de esta segunda fase de nuestro estudio, con los obtenidos en estudios epidemiológicos, podemos apreciar que en nuestro caso, la media de dl-PCBs (22.49 pg WHO-TEQ/g de lípido) fue similar a los niveles encontrados en el suero de poblaciones de otros países (De Felip *et. al.*, 2008; 2014; Zubero *et. al.*, 2011). En cambio, fue superior a la media de los valores obtenidos en otras poblaciones (Costopoulou *et. al.*, 2006; Arisawa *et. al.*, 2011; Harden *et. al.*, 2004; 2007; Henríquez-Hernández *et. al.*, 2011; Jiménez *et. al.*, 1996; Olivera *et. al.*, 2011; Zubero *et. al.*, 2009). En la Tabla 5.1 se comparan las concentraciones de medias de dl-PCBs en suero expresadas como pg WHO-TEQ/g de lípido obtenidas en nuestro estudio con artículos de la literatura revisada.

Tabla 5.1. Comparativa de el valor medio de dl-PCBs (pg WHO-TEQ/g de lípido) en muestras de suero con los publicados en la literatura.

País	Período	n	ΣWHO-TEQs (pg/g)	Referencia
España(Madrid)	1993	-	7.03	Jiménez <i>et. al.</i> (1996)
Australia	1996-2003	9090	9.2	Harden <i>et. al.</i> (2007)
España(Canarias)	1998	607	0.11	Henríquez-Hernández <i>et. al.</i> (2011)
Japón	2000-2007	1656	16	Arisawa <i>et. al.</i> (2011)
Grecia (Atenas)	2002-2004	105	3.2	Costopoulou <i>et. al.</i> (2006)
Australia	2003	-	4.1	Harden <i>et. al.</i> (2004)
Bélgica	2003	63	7	Fierens <i>et. al.</i> (2003)
Italia (Valpiano)	2005-2006	74	21.2	De Felip <i>et. al.</i> (2008)
España (País Vasco)	2006	322	15.59	Zubero <i>et. al.</i> (2009)
España (País Vasco)	2008	8	20.47	Zubero <i>et. al.</i> (2011)
Argentina	2009-2011	220	13.3	Olivera <i>et. al.</i> (2011)
Italia	-	850	23.9	De Felip <i>et. al.</i> (2014)
Norte de Europa	2012-2014	50	22.49	Nuestro estudio

Estas diferencias en los niveles de dl-PCBs pueden atribuirse a variaciones en la dieta entre las diferentes poblaciones. En la población general, exceptuando a los individuos laboralmente expuestos, se ha considerado a la dieta como la fuente principal de aporte de estas sustancias (Hanaoka *et. al.*, 2002). Siendo el pescado la fuente más relevante de los PCBs para los seres humanos (Bocio *et. al.*, 2007; Gomara *et. al.*, 2005;Freels *et. al.*, 2007). Debido a su carácter lipofílico, los dl-PCBs se acumulan principalmente en productos con un alto contenido en grasas. Los varones de nuestro estudio provenían del norte de Europa la cual se caracteriza por su elevado consumo de pescado graso (Welch *et. al.*, 2002) lo cual podría explicar las concentraciones de PCBs observada en el presente trabajo. En un estudio de dieta donde se estimaron las ingestas por grupos de alimentos en poblaciones de países como Suecia, los resultados mostraron que el 70-80% de la ingesta de PCBs similares a las dioxinas tiene su origen en el consumo de pescado graso (Livsmedelsverket 2012; 2013; Darnerud *et. al.*, 2006).

En cuanto a la relación de la exposición de dl-PCBs con los hábitos de vida, únicamente la edad, y el IMC mostraron alguna asociación estadística significativa.

Una de las conclusiones importantes del estudio es que los niveles de dl-PCBs, al igual que en la primera fase de nuestro estudio, muestran una asociación positiva con la edad ($p=0.027$) y que los niveles de dl-PCBs eran más elevados en los varones que pertenecían al grupo de mayor edad ($p=0.03$). Coincidiendo con nuestros resultados otros autores (Aurrekoetxea *et. al.*, 2011; Porta *et. al.*, 2006; 2010) también han encontrado una asociación positiva, de esto se desprende que la edad es un factor determinante de los niveles de compuestos organoclorados en el organismo (Ibarluzea *et. al.*, 2011).

Discusión

El IMC se asoció negativamente con los niveles de dl-PCBs, es decir a mayor índice de masa corporal menores niveles de estos compuestos ($p=0.019$). La asociación inversa entre los PCBs y la masa corporal ha sido ya descrita en la primera fase del presente trabajo y por otros estudios (Glynn *et. al.*, 2007; Ibarluzea *et. al.*, 2011). Wolf *et. al.* sugieren que la mayor cantidad de grasa en aquellas personas con un mayor índice de masa corporal supondría un factor de dilución en la fase de exposición al COP y, sin embargo, que en exposiciones alejadas en el tiempo la metabolización y eliminación de los organoclorados sería más lenta (Wolff *et. al.*, 2005). En todo caso, el IMC debería tenerse siempre en cuenta al valorar la exposición a sustancias lipofílicas (Carreño *et. al.*, 2007).

La exposición laboral constituye otra de las posibles fuentes de exposición a PCBs en la cual el ingreso se produce, a diferencia de la exposición ambiental, a través de la vía respiratoria y cutánea (Georgieva *et. al.*, 2002). Varios estudios han asociado la exposición ocupacional o accidental a dl-PCBs con la fertilidad masculina (Jensen *et. al.*, 2006; Spira *et. al.*, 1998), mientras que los resultados hallados en otros trabajos son más contradictorios, por ejemplo se ha descrito una asociación negativa entre exposición y calidad seminal en el estudio llevado a cabo por Heacock *et. al.*, pero no se halló tal asociación en otro realizado por Henriksen *et. al.* (Heacock *et. al.*, 1998; Henriksen *et. al.*, 1996). En nuestro estudio, los niveles de dl-PCBs no mostraron asociación con la ocupación laboral, debido a que ninguno de los sujetos participantes declaró participar en actividades industriales. Tampoco se encontraron asociaciones con el consumo de tabaco y el lugar de residencia, ello apunta a que la fuente de exposición más probable de los varones de nuestro estudio sea a través de la dieta.

Para comprobar la hipótesis de que los PCBs tienen un impacto negativo sobre la calidad del semen decidimos estudiar las relaciones existentes entre las concentraciones de cada PCB determinadas en suero con los parámetros más significativos del seminograma como la concentración, la motilidad, la morfología y la viabilidad.

En nuestro estudio, encontramos una correlación negativa de la motilidad con los PCBs: 126 ($p=0.037$), 189 ($p=0.024$) y Σ dl-PCBs ($p=0.050$). Además, la viabilidad fue negativamente correlacionada con los PCBs non-orto 126 ($p=0.001$) y 169 ($p=0.002$), el PCB 189 ($p=0.001$), los mono-orto PCBs ($p=0.004$) y la concentración total de PCBs ($p=0.023$). Por otra parte, también encontramos una asociación negativa entre la morfología espermática y el PCB 189 ($p=0.015$).

Sin embargo, mientras en varias investigaciones se han hallado evidencias que relacionan la concentración de dl-PCBs en suero con una disminución de la morfología normal (Bush *et. al.*, 1986; Guo *et. al.*, 2000; Faure *et. al.*, 2014; Hauser *et. al.*, 2002; Van Waelegheem *et. al.*, 1996), nosotros hemos encontrado, una correlación positiva entre la morfología espermática y el PCB123 ($p=0.042$). Resultados similares sobre los efectos de los PCB en la morfología del espermatozoide han sido publicados previamente (Dallinga *et. al.*, 2002). En este estudio se evaluó la correlación entre niveles de PCBs y la calidad seminal. Contrariamente a lo esperado, los autores observaron que los varones normozoospermicos presentaban mayores niveles de estos compuestos en plasma seminal que los varones con alteraciones en sus parámetros seminales, y a su vez los niveles de PCBs correlacionaban positivamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Sin embargo, los autores

también encontraron una correlación negativa entre los metabolitos de estos compuestos y algunos parámetros seminales como la motilidad y la concentración.

Pensamos que esto puede deberse a diferencias estructurales entre los PCBs. Dependiendo de la orientación espacial de los átomos de cloro y del grado de cloración ciertos congéneres tienen actividad estrogénica, algunos actividad antiestrogénica y otros antiandrogénica, aunque no se conocen muy bien las implicaciones sobre el sistema reproductivo masculino de estos efectos (Schnellmann *et. al.*, 1985; Svobodová *et. al.*, 2009). En general, el grado de toxicidad aumenta a medida que se incrementa el contenido de cloro; lo mismo ocurre con los productos de la oxidación de los PCB, los que pueden ser mucho más tóxicos que los propios PCBs (Grimm *et. al.*, 2015; Kato *et. al.*, 1980; Matthews *et. al.*, 1975; McKinney *et. al.*, 1985; Mills *et. al.*, 1985). Por lo que, las diferencias basadas en el metabolismo y el patrón de metabolitos de cada congéneres podrían expresar una variedad de efectos tóxicos sobre los biomarcadores de la célula espermática. Son necesarios más estudios en los cuales sería conveniente, si es posible, medir las concentraciones de los metabolitos de PCBs y no solo los PCBs como hemos realizado en este estudio.

A pesar de que varios autores (Hauser *et. al.*, 2002; Mocarelli *et. al.*, 2008; 2011; Rozati *et. al.*, 2002) han correlacionado la exposición a compuestos similares a dioxinas con la concentración espermática, nosotros no la hemos observado. Curiosamente, la falta de asociación entre los niveles de dl-PCBs en suero y la concentración de espermatozoides fue similar a los obtenidos en otros mamíferos como ratas macho adultas, en el que la exposición a dl-PCBs /TCDD a dosis relativamente altas provoca una reducción del peso de los órganos dependientes de andrógenos (vesículas seminales, epidídimo) sin afectar a la espermatogénesis (Johnson *et. al.*, 1992). Del mismo modo, estudios realizados en varones adultos sugieren que no hay relación entre la actividad de compuestos similares a las dioxinas y la concentración de espermatozoides (Henriksen *et. al.*, 1996; Toft *et. al.*, 2007). En cambio, otros autores si encontraron una disminución en la concentración de espermatozoides en varones jóvenes sanos expuestos a dl-PCBs (Guo *et. al.*, 2000; Van Waelegheem *et. al.*, 1996; Mocarelli *et. al.*, 2011).

A la luz de estos resultados, el nivel de exposición, la edad en el momento de la exposición, el período de duración y otros factores endógenos o ambientales pueden jugar un papel importante en los efectos observados. Además, esto podría explicar, en parte, la falta de efecto de estos tóxicos ambientales sobre la espermatogénesis en el sistema reproductivo en varones durante la etapa adulta (Mocarelli *et. al.*, 2008; Foster *et. al.*, 2010; Jacobson-Dickman *et. al.*, 2009).

Estos resultados confirman lo expuesto por algunos autores (Kuladip *et. al.*, 2012), los cuales plantean que la exposición a PCBs parece afectar a la diferenciación de las espermátidas (espermiogénesis) y la maduración en el epidídimo, que a su vez se manifestarían como una disminución de la motilidad espermática y morfología normal.

A partir de estudios experimentales se han sugerido diferentes mecanismos de acción por los cuales los compuestos organoclorados podrían tener un impacto negativo en la fertilidad masculina (Ohsako *et. al.*, 2001; 2002; Mably *et. al.*, 1992a,b; Faqi *et. al.*, 1998). Si bien los estudios epidemiológicos no pueden explorar los mecanismos con precisión, esto no impide

Discusión

proponer algunas hipótesis. Varios estudios señalan al estrés oxidativo, inducido por tóxicos ambientales, como uno de los principales factores que contribuye a la infertilidad masculina (Aitken *et. al.*, 2013; Gagnon, 1988; Tremellen, 2008; Wong *et. al.*, 2011). Es conocido que los espermatozoides, son particularmente vulnerables al estrés oxidativo ya que su membrana plasmática es rica en ácidos grasos poliinsaturados (Agarwal *et. al.*, 2014). Aunque se requieren pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (EROs) para el funcionamiento normal de espermatozoides, su exceso de producción puede causar la alteración de la membrana celular por el proceso denominado peroxidación lipídica (PL) (Kothari *et. al.*, 2010), lo cual se traduce en alteraciones en la motilidad y morfología del espermatozoide (Bansal *et. al.*, 2010; Gharagozloo *et. al.*, 2011; Schiffer *et. al.*, 2014). Durante la espermatogénesis y el almacenamiento en el epidídimo, los espermatozoides no están en contacto con los antioxidantes del plasma seminal y dependen para su protección de los antioxidantes del epidídimo y de los testículos, y de su capacidad intrínseca antioxidante. Los espermatozoides son, por lo tanto vulnerables al daño oxidativo durante el tránsito epididimal (Fraczek *et. al.*, 2007; Tremellen, 2008).

Como ya se ha señalado, los dl-PCBs activan el receptor de aril hidrocarburos (AhR) (Hansen *et. al.*, 2014; Sorg *et. al.*, 2013), lo que afecta indirectamente a la función de los receptores estrogénicos y androgénicos de las células del epidídimo (Cai *et. al.*, 2015; Elzanaty *et al.*, 2002; Enmark *et. al.*, 1997; Richthoff *et al.*, 2002; Rignell-Hydbom *et. al.*, 2005). Algunos estudios en animales han mostrado una disminución de la producción de las enzimas antioxidantes presentes en el epidídimo y por ende un incremento del estrés oxidativo después de la exposición a compuestos similares a dioxinas (Mates *et.al.*, 2010; Schultz *et. al.*, 2003).

Por otra parte, el estrés oxidativo causado por estos contaminantes, puede provocar la disfunción de las células de Sertoli, con la alteración del desarrollo y maduración del espermatozoide (Wong *et. al.*, 2011).

Lo que nos invita a pensar basándonos en los resultados de nuestro estudio que la exposición a los dl-PCBs afectaría particularmente a los eventos de maduración post-testicular debido a la inducción de estrés oxidativo. Quizá sería interesante realizar futuros estudios que incluyan la medición de biomarcadores de estrés oxidativo en la sangre de los pacientes, con el objetivo de analizar su relación con la exposición a dl-PCBs, y a su vez profundizar en el mecanismo que tiene lugar.

En resumen, los resultados de nuestro trabajo indican, que los efectos negativos de los dl-PCBs se producen en las últimas etapas de la espermatogénesis (durante la espermiogénesis) y/o la maduración del epidídimo causando un mayor número de espermatozoides con morfología anormal, una disminución de la motilidad y daños en la integridad de la membrana del espermatozoide.

Todo lo anterior confirmaría tanto la teoría de la disrupción endocrina, como los resultados obtenidos en animales de laboratorio, los cuales han mostrado que estas sustancias pueden ejercer efectos tóxicos, sobre el sistema reproductivo masculino.

A la vista de nuestros resultados y teniendo en cuenta que al menos la mitad de los casos de esterilidad de etiología desconocida del varón podrían atribuirse a exposiciones profesionales y/o ambientales a contaminantes químicos, nos parece necesario incluir la determinación de estos compuestos en la evaluación del varón infértil.

Si bien es cierto que no es posible considerar mediante este tipo de análisis una relación causa-efecto entre la exposición y la aparición de determinadas alteraciones, ya que la medición de la exposición y la enfermedad se realizan de forma simultánea, sí se puede establecer una asociación entre el hecho de estar expuesto a los dl-PCBs y tener un estudio seminal anormal, así como valorar el contacto con estos compuestos químicos como un posible factor de riesgo de infertilidad.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6. Conclusiones



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6. CONCLUSIONES

- 1) Se ha puesto a punto un método analítico para la determinación de dl-PCBs en muestras de suero de 1 mL, con límites de detección (1 pg/g lípido), siguiendo en todo momento los criterios de calidad exigidos por el método de la EPA 1668C (United States Environmental Protection Agency, 2010) para el análisis de dl-PCBs en muestras biológicas (límite de detección, análisis de blancos, reproducibilidad).
- 2) Los PCBs no ortho (PCB126 y PCB169), fueron los que presentaron los niveles de toxicidad más elevados en las muestras analizadas.
- 3) Los PCBs más abundantes en las muestras fueron el 118, 156 y 157.
- 4) La optimización de la metodología nos ha permitido llevar a cabo un estudio individualizado por paciente.
- 5) Las concentraciones de dl-PCBs fueron significativamente mayores en el grupo de varones con baja calidad seminal con respecto al grupo control. Indicando que el deterioro de la calidad seminal como consecuencia de la exposición a disruptores endocrinos, como los dl-PCBs, es biológicamente plausible.
- 6) Cuando se determinaron los niveles de toxicidad de los PCBs no-ortho, mono-ortho y el total, estos fueron mayores en los sujetos con los parámetros seminales alterados.
- 7) La edad y el IMC son factores antropométricos a considerar en la determinación de la concentración de dl-PCBs en suero
- 8) La ocupación laboral, el consumo de tabaco y el lugar de residencia no mostraron asociación con los niveles de dl-PCBs.
- 9) La dieta es la principal fuente de exposición ambiental a los dl-PCBs en los varones de nuestro estudio.
- 10) La concentración total de dl-PCBs en suero sanguíneo afecta negativamente a la motilidad, viabilidad y morfología de los espermatozoides humanos. Sin embargo ni la concentración, ni el número total de espermatozoides se observan alterados.
- 11) Al hacer el análisis de cada congénere, fueron los PCBs 126, 169 y 189, los que correlacionaron negativamente con la viabilidad, la motilidad y la morfología espermática.
- 12) La optimización del método y los resultados obtenidos nos han permitido incluir la determinación de los dl-PCBs, en el estudio de la esterilidad del factor masculino y/o femenino, para un mejor diagnóstico y tratamiento de los problemas de fertilidad.

7.Referencias



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

7. REFERENCIAS

Ábalos M, Parera J, Abad E, Rivera J. 2008. PCDD/Fs and DL-PCBs in feeding fats obtained as co-products or by-products derived from the food chain. *Chemosphere* 71:1115–1126.

Ábalos M, Parera J, Rivera J, Abad E. 2010. PCDD/F and DL-PCB levels in meat from broilers and rabbits fed with fish-oil enriched feeds. *Chemosphere* 78:175–184.

Abel J, Haarmann-Stemmann T. 2010. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *J Biol Chem* 391: 1235–1248.

Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 32:1–17.

Agudo A, Goñi F, Etxeandia A, Vives A, Millán E, *et.al.* 2009. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: determinants of serum concentrations. *Environ Res* 109: 620–628.

Ahlborg UG, Hanberg A, Kenne K. 1992. Risk Assessment of Polychlorinated Biphenyls Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm.

Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Luliis GN. 2013. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16:31–8.

Amann RP, Howards SS. 1980. Daily spermatozoa production and epidymal spermatozoa reserves of the human male. *J Urol* 124:211–215.

Andersson P. 2003. Functional role of constitutively active dioxin/Ah receptor in a transgenic mouse model. Estocolmo; Karolinska University Press.

Arisawa K, Uemura H, Hiyoshi M, Kitayama A, Takami H, *et. al.* 2011. Dietary patterns and blood levels of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in 1656 Japanese individuals. *Chemosphere* 82: 656–662

Arrebola JP, Fernández MF, Molia-Molina JM, Freire C, Fernández M, *et. al.* 2010. Exposición humana a compuestos con actividad disruptora endocrina en la población española. *ARS Pharm.* 51.Suplemento 3: 811–822.

Arrebola JP, Cuellar M, Claire E, Quevedo M, Antelo SR, *et. al.* 2012. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. *Environ Res* 112:40–47.

ATSDR. 2000. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Referencias

- ATSDR. 2011. Addendum to the toxicological profile for polychlorinated biphenyls. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Audí L, Fernández-Cancio M. 2014. Etiopatogenia del Hipospadias. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 5:53–68
- Aurrekoetxea AJ, Zubero MB, Jiménez GC, *et. al.* 2011. Plaguicidas y PCBs en suero en población general de Barakaldo posiblemente expuesta al hexaclorociclohexano entre 1947 y 2002. *Rev Esp Salud Pública, Madrid* 85:189–204.
- Avkhimenko M. 2000. Medical and ecological consequences of environmental contamination with PCBs, in: *Polychlorinated Biphenyls-Supertoxicants of XXI Century*, VINITI Pres, Moscow: 14–30.
- Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Giwercman A. 2011. No secular trend over the last decade in sperm counts among Swedish men from the general population. *Hum Reprod* 26:1012–6.
- Aylward LL, Green E, Porta M, Toms LM, Den Hond E, *et. al.* 2014. Population variation in biomonitoring data for persistent organic pollutants (POPs): an examination of multiple population-based datasets for application to Australian pooled biomonitoring data. *Environ Int* 68:127–38.
- Bansal AK, Bilaspuri GS. 2010. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet Med Int* 2011.
- Bassas L. 2009. Exploracion de la función testicular. *Endocrinol Nutri* 56:18–31.
- Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expression* 18: 207–250.
- Bejarano F. 2004. Guía ciudadana para la aplicación del Convenio de Estocolmo. México.
- Bentle GR, Mascie-Taylor C. Editors. 2000. *Infertility in the modern world: present and future prospects*. Cambridge: University Press.
- Bernard A, Hermans C, Broeckaert F, de Poorter G, de Cock A, *et al.* 1999. Food contamination by PCBs and dioxins. *Nature* 401:231–232.
- Birnbaum LS. 1994. The mechanism of dioxin toxicity: The relationship to risk assessment. *Environ Health Perspect* 102:157–167.

Björndahl L. 2003. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod BioMed Online* 7:440–448.

Bocio A, Domingo JL, Falco´ G, Llobet JM. 2007. Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in fish and seafood from the Catalan (Spain) market: estimated human intake. *Environ Int* 33:170–175.

Bock KW, Kohle C. 2009. The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver. *J Biol Chem* 390:1225–1235.

Bonde JP, Giwercman A. 2014. Environmental xenobiotics and male reproductive health. *Asian J Androl* 16:3–4.

Bonefeld-Jorgensen EC, Andersen HR, Rasmussen TH, Vinggaard AM. 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158:141–153.

Braga DP, Halpern G, Figueira RC, *et. al.* 2012. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* 97:53–9.

Breivik K, Sweetman A, Pacyna JM, Jones KC. 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – a mass balance approach. 1. Global production and consumption. *Sci Total Environ* 290:181–198.

Breivik K, Sweetman A, Pacyna JM, Jones KC. 2007. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners — a mass balance approach: 3.An update. *Sci Total Environ* 377:296–307.

Burns LH. 2007. Psychiatric aspects of infertility and infertility treatments. *Psychiatr Clin N Am* 30:689–716.

Bush B, Bennett AH, Snow JT. 1986. Polychlorobiphenyl congeners, p, p'-DDE, and sperm function in humans. *Arch Environ Contam Toxicol* 15:333–341.

Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS. 2007. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization :involvement in sperm-zona pellucida interaction.*Biol Reprod* 77:848–854.

Cai JL, Sun LB, Guo ZZ, Jiang XM, Zheng GC, *et. al.* 2015. Decrease in prosaposin in spermatozoon is associated with polychlorinated biphenyl exposure.*Int J Clin Exp Pathol* 8:2436–48.

Campbell TC, Friedman L. 1966. *J Assoc Offic Anal Chem* 49:824.

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

Referencias

Carpenter DO. 2006. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Rev Environ Health* 21:1–23.

Carpenters DO. 2015. Exposure to and health effects of volatile PCBs. *Reviews on Environ Health* 30: 81-92. ISSN (Online) 2191-0308, ISSN (Print) 0048–7554.

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

Cerna M, Maly M, Grabic R, Batariova´ A, Smid J, Benes B. 2008. Serum concentrations of indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere* 72:1124–1131.

Clermont Y. 1966. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat* 118: 509–529.

Colborn T, Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine –disrupting Chemical in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378–384.

Čonka K, Drobná B, Kočan A, Petřík J. 2005. Simple solid-phase extraction method for determination of polychlorinated biphenyls and selected organochlorine pesticides in human serum. *J Chromatogr A* 1084: 33–38.

Consonni D, Sindaco R, Bertazzi PA. 2012. Blood levels of dioxins, furans, dioxin-like PCBs, and TEQs in general populations: A review, 1989–2010. *Environment International* 44:151–162 .

Costopoulou D, Vassiliadou I, Papadopoulos A, Makropoulos V, Leondiadis L. 2006. Levels of dioxins, furans and PCBs in human serum and milk of people living in Greece. *Chemosphere* 65: 1462–9.

Chen QX, Jiang XH, Hedgeman E , Knutson K, Gillespie B, *et. al.* 2013. Estimation of age- and sex-specific background human serum concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the UMDES and NHANESpopulations. *Chemosphere* 91: 817–823.

Dallinga JW, Moonen EJ, Dumoulin JC, Evers JL, Geraedts TJ, *et. al.* 2002. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Hum Reprod* 17: 1973–1979.

Darnerud PO, Atuma S, Aune M, Bjerselius R, Glynn A, *et. al.* 2006. Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data. *Food Chem Toxicol* 44:1597–606.

De Caprio AP, Johnson GW, Tarbell AM, Carpenter DO, Chiarenzelli JR, *et. al.* 2005. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure assessment by multivariate statistical analysis of serum congener profiles in an adult Native American population. *Environ Res* 98: 284–302

De Felip E, Abballe A, Casalino F, Di Domenico A, Domenici P, *et. al.* 2008. Serum levels of PCDDs, PCDFs and PCBs in non-occupationally exposed population groups living near two incineration plants in Tuscany, Italy. *Chemosphere* 72: 25–33.

De Felip E, Bianchi F, Bove C, Cori L, D'Argenzio A, *et. al.* 2014. Priority persistent contaminants in people dwelling in critical areas of Campania Region, Italy (SEBIOREC biomonitoring study). *Sci Total Environ* 487: 420–35.

De Jager C, Farias P, Barraza-Villarreal AD, Bailey JL, Ávila MH, *et. al.* 2006. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p, p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: across-sectional study. *J Androl* 27: 16–27.

De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reprod* 13: 1–8.

Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, *et. al.* 2015. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int.* 84: 154–60.

Denison MS, Nagy SR. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309–34.

De Rooij D, Russell L. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21: 776–798.

Dewailly É, Weber JP, Gingras S, Laliberté C. 1991. Coplanar PCBs in human milk in the Province of Québec, Canada: Are they more toxic than dioxin for breast fed infants? *Bull Environ Contam Toxicol* 47: 491–498.

Dhanabalan S, Jubendradass R, Latha P, Mathur PP. 2011. Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 30: 567–78.

Dhooge W, van Larebeke N, Koppen G, Nelen V, Schoeters G, *et. al.* 2006. Serum dioxin-like activity is associated with reproductive parameters in young men from the general Flemish population. *Environ Health Perspect* 114: 1670–1676.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, *et. al.* 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30: 293–342.

Dohle GR, Daimer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z, *et. al.* 2010. Guidelines on male infertility. Rotterdam: European Association of Urology.

Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, *et. al.* 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14: 269–277.

EC (European Commission). 2006. Identification, assessment and prioritisation of EU measures to reduce releases of unintentionally produced/released Persistent Organic Pollutants. REFERENCE:O7.010401/2005/419391/MAR/D4. FINAL REPORT.

Referencias

- EC (European Commission). 2007. Endocrine disrupters. What is endocrine disruption?: European Commission.
- Eliasson R, Treschl L. 1971. Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril* 22: 134–37.
- Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. 2002. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reprod* 17: 2904–2911.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, *et al.* 1997. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4258–4265.
- ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology). 2014. ART fact sheet. Assisted reproductive technology in Europe 2014: results generated from European registers by ESHRE.
- Eskandar M, Al-Asmari M, Babu Chaduvula S, Al-Shahrani M, Al-Sunaidi M, *et al.* 2011. Impact of male obesity on semen quality and serum sex hormones. *Adv Urol* 2012: 407–601.
- Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I. 1998. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol* 150: 383–392.
- Faure AC, Viel JF, Bailly A, Blagosklonov O, Amiot C, *et al.* 2014. Evolution of sperm quality in men living in the vicinity of a municipal solid waste incinerator possibly correlated with decreasing dioxins emission levels. *Andrologia* 46: 744–752.
- Fawcett DW, Bloom W. 1995. *Tratado de Histología*. 12 Ed. Ed Interamericana.
- Fernández MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, *et al.* 2012. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl*. 35:1–10.
- Fernández MF, Kiviranta H, Molina-Molina JM, Laine O, López-Espinosa MJ, *et al.* 2008. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxyPCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere* 71: 1196–1205.
- Fernández MF, Olea N. 2006. Sustancias químicas y repercusión en salud: disruptores endocrinos. L'Aula de l'Aigua, Centre de Documentació, artículo 1274. [<http://hdl.handle.net/10481/24892>]
- Fernández MF, Olmos B, Olea N. 2007. Exposure to endocrine disruptors and male urogenital tract malformations (cryptorchidism and hypospadias). *Gac Sanit* 21: 500–14.
- Fernández MF, Pedarza U, Olea N. 1998. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection? *Cancer J* 11:11–17.

- Fierens S, Mairesse H, Heilier JF. 2007. Impact of iron and steel industry and waste incinerators on human exposure to dioxins, PCBs and heavy metals, results of a cross-sectional study in Belgium. *J Toxicol Environ Health* 70: 222–6.
- Firestone D, Ress J, Brown NL, Barron RP, Daminco JN. 1972. *J Assoc Offic Anal Chem* 55: 85.
- Fish H, Goluboff ET, Olson JH. 1996. Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25 year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 65: 1009–1014.
- Foster WG, Maharaj-Briceno S, Cyr DG. 2010. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. *Environ Health Perspect* 118: 458–464.
- Fraczek M, Kurpisz M. 2007. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 28: 325–333.
- Frame GM, Wagner RE, Carnahan JC, Brown JF, May RJ, *et. al.* 1996. Comprehensive, quantitative, congener-specific analyses of eight Aroclors and complete PCB congener assignments on DB-1 capillary GC columns. *Chemosphere* 33: 603–623.
- Freels S, Chary LK, Turyk M, Piorkowski J, Mallin K, *et. al.* 2007. Congener profiles of occupational PCB exposure versus PCB exposure from fish consumption. *Chemosphere* 69: 435–443.
- Frenette G, Girouard J, D'Amours O, Allard N, Tessier L, *et. al.* 2010. Characterization of two distinct populations of epidymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. *Biol Reprod* 83: 473–480.
- Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T, Kuwabara M. 2005. Study Group for Yusho. Overview of Yusho. *J Dermatol Sci Suppl* 1, S3–S10.
- Gagnon C. 1988. The role of environmental toxins in unexplicated male infertility. *Semin Reproduct Endocrinol* 6: 369–76.
- Galimova EF, Amirova ZK, Galimov Sh. 2015. Dioxins in the semen of men with infertility. *Environl Sci and Pollut Res* 22: 14566–14569.
- Gauger KJ, Giera S, Sharlin DS, Bansal R, Iannacone E, *et. al.* 2007. Polychlorinated biphenyls 105 and 118 form thyroid hormone receptor agonists after cytochrome P4501A1 activation in rat pituitary GH3 cells. *Environ Health Perspect* 115: 1623–30.
- Georgieva T, Michailova A, Panev T, Popov T. 2002. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. *Int Arch Occup Environ Health* 75 Suppl: S21–6.
- Gharagozloo P, Aitken RJ. 2011. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 26: 1628–1640.

Referencias

- Glynn A, Aune M, Darnerud PO, Cnattingius S, Bjerselius R, *et. al.* 2007. Determinants of serum concentrations of organochlorine compounds in Swedish pregnant women: a cross-sectional study. *Environ Health* 6: 2.
- Gomara B, Bordajandi LR, Fernández MA, Herrero L, Abad E, *et. al.* 2005. Levels and trends of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/ furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Spanish commercial fish and shellfish products, 1995–2003. *J Agric Food Chem* 53: 8406–13.
- Gray LE, Ostby J, Marshall R, Andrews J. 1993. Reproductive and thyroid effects of low level polychlorinated biphenyl exposure. *Fundam Appl Toxicol* 20:288–94.
- Gregoraszczyk E. 2002. "Dioxin exposure and porcine reproductive hormonal activity". *Cad. Saude Publica* 18: 453–462.
- Grimalt JO, Carrizo D, Garí M, Font-Ribera L, Ribas-Fito N, *et. al.* 2010. An evaluation of the sexual differences in the accumulation of organochlorine compounds in children at birth and at the age of 4 years. *Environ Res* 110: 244–250 .
- Grimm F, Hu D, Kania-Korwell M. 2015. Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Crit Rev Toxicol* 45: 245–272
- Grootegoed JA. 2000. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14: 331–343.
- Guillette LJ. 2006. Endocrine disrupting contaminants--beyond the dogma. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1: 9–12.
- Guo YL, Hsu PC, Hsu CC, Lambert GH. 2000. Semen quality after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Lancet* 356: 1240–1241.
- Guyot E, Chevallier A, Barouki R, Coumoul X. 2013. The AhR twist: ligand dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discovery Today* 18: 479–486.
- Hanaoka T, Takahashi Y, Kobayashi M. 2002. Residuals of beta hexachlorocyclohexane, dichlorodiphenyltrichloroethane, and hexachlorobenzene in serum, and relations with consumption of dietary components in rural residents in Japan *Sci Total Environ* 286: 119–127.
- Hansen DA, Esakky P, Drury A, Lamb L, Moley KH. 2014. The aryl hydrocarbon receptor is important for proper seminiferous tubule architecture and sperm development in mice. *Biol Reprod* 90: 8.
- Harden F, Müller J, Toms L, Gaus C, Moore M, *et. al.* 2004. Determination of the levels of dioxin in the Australian population by analysis of blood serum. *Organohalogen Compounds* 66: 2853–8.

- Harden FA, Toms LM, Paepke O, Ryan JJ, Muller JF. 2007. Evaluation of age, gender and regional concentration differences for dioxin-like chemicals in the Australian population. *Chemosphere* 67: 318–324.
- Harrad S, Hazrati S, Ibarra C. 2006. Concentrations of polychlorinated biphenyls in indoor air and polybrominated diphenyl ethers in indoor air and dust in Birmingham, United Kingdom: implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 40: 4633–4638.
- Hauser R, Altshul L, Che L, Ryan L, Overstreet J, *et. al.* 2002. Environmental organochlorines and semen quality: results of a pilot study. *Environ Health Perspect* 110: 229–233.
- Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L. 2003. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect* 111: 1505–1511.
- Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. 2006. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 17: 682–691
- Hauser R, Williams P, Altshul L, Calafat AM. 2005. Evidence of Interaction between Polychlorinated Biphenyls and Phthalates in Relation to Human Sperm Motility. *Environ Health Perspect* 113: 425–430.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, McMahon M. 2009. Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci* 111:199–201.
- Heacock H, Hogg R, Marion SA, Hershler R, Teschke K, *et. al.* 1998. Fertility among a cohort of male sawmills workers exposed to chlorophenate fungicides. *Epidemiology* 9: 56–60.
- Henriksen GL, Michalek JE. 1996. Serum dioxin, testosterone and gonadotropins in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 7: 454–455.
- Henríquez-Hernández LA, Luzardo OP, Almeida-González M, Álvarez-León EE, Serra-Majem L, *et al.* 2011. Background levels of polychlorinated biphenyls in the population of the Canary Islands (Spain). *Environ Res* 111: 10–16
- Homan GF, Davies M, Norman R. 2007. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Human Reprod Update* 13: 209–23.
- Huidobro C. 2010. Male Infertility. *Rev Med Clin Condes* 21: 368–375.
- IARC. 2013. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 107. Polychlorinated and polybrominated biphenyls. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Referencias

- Ibarluzea J, Alvarez-Pedrero M, Guxens M, Santa Marina L, Basterrechea M, *et. al.* 2011. Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere* 82: 114–120.
- Irvine D, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, *et. al.* 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21: 33–44.
- Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Br Med J* 312: 467–471.
- Jacobson-Dickman E, Lee MM. 2009. The influence of endocrine disruptors on pubertal timing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16: 25–30.
- Jensen TK, Bonde JP, Joffe M. 2006. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med* 56: 544–53.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Peláez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219–28.
- Jiménez B, Hernández LM, Eljarrat E, Rivera J, González MJ. 1996. Estimated intake of PCDDs, PCDFs and co-planar PCBs in individuals from Madrid (Spain) eating an average diet. *Chemosphere* 33: 1465–1474.
- Johanisson E, Campana A, Luthi R. 2000. Evaluation of round cells in semen analysis: a comparative study. *Human Reprod* 6: 404–414.
- Johnson L, Dickerson R, Safe SH, Nyberg CL, Lewis RP, *et. al.* 1992. Reduced Leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin without a significant effect on spermatogenesis. *Toxicology* 76: 103–118.
- Jones RC. 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *International J Androl* 22: 57–67.
- Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F. 2001. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 16: 1012–9.
- Jørgensen N, Carlsen E, Nermoen I, Punab M, Suominen J, *et. al.* 2002. 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* 17: 2199–208.
- Jørgensen N, Joensen UN, Jensen TK, Jensen MB, Almstrup K, *et. al.* 2012. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* 2. doi:10.1136/bmjopen-2012-000990

- Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, *et al.* 2011. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl* 34: e 37–48.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, *et al.* 2012. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 62: 324–332.
- Kato S, McKinnney JD, Matthews HB. 1980. Metabolis of symmetrical hexachlorobiphenyl isomers in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 5: 389–98.
- Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. 2001. "Effects of male age on semen quality and fertility: A review of the literature". *FertilSteril* 75: 237.
- Kitajima M, Khan KN, Fujishita A, Masuzaki H, Koji T, *et al.* 2004. Expression of the arylhydrocarbon receptor in the peri-implantation period of the mouse uterus and the impact of dioxin on mouse implantation. *Arch Histol Cytol* 67: 465–474.
- Kitamura S, Jinnoa N, Suzukia T, Sugihara K, Ohta S, *et al.* 2005. Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 208: 377–387.
- Kiviranta H, Hallikainen A, Ovaskaiens ML, Kumpulainen J, Vartiainen T. 2001. Dietary intakes of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in Finland. *Food Add Contam* 18: 945–953.
- Konishi Y, Kitagawa M, Akutsu K, Tanaka Y. 2006. Surveillance of polychlorinated biphenyl congeneric patterns in human breast milk from 1973 to 2000 in Osaka, Japan. *Environ Health Prev Med* 11: 38–44.
- Kort H, Massey J, Elsner CW, Leff-Mitchel D, Shapiro DB, *et al.* 2006. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 27: 450–2.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. 2010. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 48: 425–435.
- Krause W, Habermann B .2000. "No change with age in semen volume, sperm count and sperm motility in individual men consulting an infertility clinic". *Urol Int* 64: 139
- Kruse K, Lauver D, Hanson K. 2003. Clinical implications of DES. *Nurse Pract* 28: 26–32.
- Kuladip J, Parimal CS. 2012. Environmental Toxicants Induced Male Reproductive Disorders: Identification and Mechanism of Action, Toxicity and Drug Testing, Prof. Bill Acree (Ed.), InTech, DOI:10.5772/29649.
- Kunzle R, Muelles MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, *et al.* 2003. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 79: 287–91.

Referencias

- Leijds MM, Van der Linden LM, Koppe JG, Olie K, Van Aalderen WMC. **2014**. The influence of perinatal and current dioxin and PCB exposure on reproductive parameters (sex-ratio, menstrual cycle characteristics, endometriosis, semen quality, and prematurity): a review *Biomonitoring* 1: 1–15.
- Liem AKD, Hoogerbrugge R, Kootstra PR, Van der Velde EG, De Jong AP. 1991. Occurrence of dioxins in cow's milk in the vicinity of municipal waste incinerators and a metal reclamation plant in the Netherlands. *Chemosphere* 23: 1675–1684.
- Lilienthal H, Heikkinen P, Andersson PL, Viluksela M. 2013. Sexually dimorphic behavior after developmental exposure to characterize endocrine-mediated effects of different non-dioxin-like PCBs in rats. *Toxicology* 311:52–60
- Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. 1987. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 80 :281–285.
- Livsmedelverket . 2012. Market Basket 2010 – chemical analysis, exposure estimation and health-related assessment of nutrients and toxic compounds in Swedish food baskets. Report no. 7.
- Livsmedelverket . 2013. Risk and benefit assessment of herring and salmonid fish from the Baltic Sea area. Report no 21.
- Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. 2011. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 95: 116–23.
- Li Y, Lin H, Ma M, Li L, Cai M, Zhou N, et al. 2009. Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China. *Human Reprod* 24: 459–69.
- Llobet JM, Bocio A, Domingo JL, Teixido A, Casas C, Müller L. 2003. Levels of Polychlorinated Biphenyls in Foods from Catalonia Spain: Estimated Dietary Intake. *J Food Prot* 66: 479–484.
- Long WP, Pray-Grant M, Tsai JC, Perdew GH. 1998. Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 53: 691–700.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. 1998. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69: 528–32.
- López N, Palacios S, Lago M, Chinchilla N, Beunza M. 2011. Retraso de la edad de la procreación e infertilidad. El recurso a la reproducción asistida y selección de embriones. El problema intergeneracional. *Cuad. Bioét.* XXII 2: 325–40.
- Lucena RA, Allam MF, Costabeber IH, Villarejo ML, NavajasJ. 2001. Breast cancer risk factors: PCBs congeners. *Eur J Cancer Prev* 10: 117–9.

Lui WY, Mruk D, Lee WM. 2003. Adherens junction dynamics in the testis and spermatogenesis. *J Androl* 24 : 1–14.

Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. 1992a. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol* 114:118–126.

Mably TA, Moore RW, Peterson RE. 1992b. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Effects on androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 114:97–107.

Mackay D, Shiu WY, Ma KC. 1992. In: *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*, E. 2 Lewis Publishers, Michigan 429–560.

Makler A. 1980. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 33: 337–38.

Malisch R. 2000. Increase of PCDD/F-contamination of milk and butter in Germany by use of contaminated citrus pulps as component in feed. *Chemosphere* 40: 1041–1053.

Mann T. 1946. Fructose as a normal constituent of seminal plasma: site of formation and function of fructose in semen. *Biochem J* 40: 481–491.

Martínez JM, Afshari CA, Bushel PR, Masuda A, Takahashi T, *et. al.* 2002. Differential toxicogenomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells. *Toxicol Sci* 69: 409–23.

Masuda Y. 1996. Approach to risk assessment of chlorinated dioxins from Yusho PCB poisoning. *Chemosphere* 32: 583–594.

Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. 2010. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radic Biol Med* 49: 1328–1341.

Mathews HB, Anderson MW. 1975. Effect of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls. *Drug Metab Dispos* 3: 371–80.

Matorras R, Crisol L. 2011. “Epidemiología de la infertilidad”. En Remohí J, Baleesteros A, Matorras R, Bellever J, Pellicer A. “Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos 4 ed”. Editorial Panamericana, Madrid (in press).

Matorras R, Hernández J. 2007. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción, Madrid: Adalia

Referencias

- McKinney JD, Chae K, McConnelit EE, Birnbaum LS. 1985. Structure–induction versus structure–toxicity relationships for polychlorinated biphenyls and related aromatic hydrocarbons. *Environ Health Perspect* 60: 57–68.
- MMA, 2001. Ministerio de Medio Ambiente. Plan Nacional de Descontaminación y Eliminación de PCB y PCT y aparatos que los contengan (2001-2010).
- Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2097–113.
- Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, *et. al.* 2010. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect* 118: 1286–1291.
- Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, Sarabia-Cos, López Espín JJ, *et. al.* 2013. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology* 1: 408–13.
- Mendiola J, Meeker JD, Jørgensen N, Andersson AM, Liu F, *et. al.* 2012. Urinary concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: Pooled analysis of fertile and infertile men. *J Androl* 33: 488–498.
- Mendiola J, Torres-Cantero A, Agarwal A. 2009. Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review. *Arch Med Sci* 5: S3–12.
- Menkveld R, Stander ESH, Kotze TJ, *et. al.* 1990. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to the stricter criteria. *Hum Reprod* 5: 586–592.
- Mills RA, Millis CD, Dannan GA, Guengerich FP, Aust SD. 1985. Studies on the structure-activity relationships for the metabolism of polybrominated biphenyls by rat liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 78: 96–104.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619: 263–268.
- Mocarelli P, Gerthoux PM, Needham LL, Patterson DG Jr, Limonta G, *et. al.* 2011. Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality. *Environ Health Perspect* 119: 713–718.
- Mocarelli P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Milani S, Limonta G, *et. al.* 2008. Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ Health Perspect* 116: 70–77.

Mohr S, Schwanz TG, Wagner R. 2011. Determinação de Bifenilos policlorados em soro de cordão umbilical através de extração por hidrólise ácida seguida de cromatografia a gás acoplada a um microdetector de captura de elétrons. *Quim Nova* 34: 444–449.

Moller H. 1998. Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *APMIS* 106: 232–239.

Moreno E, Núñez A. 2012. Disruptores endocrinos, un posible riesgo tóxico en productos de consumo habitual. *Unirevista.es*, 1.

Moser GA, McLachlan MS. 2001. The influence of dietary concentration on the absorption and excretion of persistent lipophilic organic pollutants in the human intestinal tract. *Chemosphere* 45: 201–211.

NATO/ CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society). 1988a. Inventory of regulations/statutes concerning dioxins and related compounds. Report No. 169.

NATO/ CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society). 1988b. International toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No. 176.

Nef S, Parada LF. 2000. Cryptorchidism in mice mutant for *Ins 13*. *Nat Genet* 22: 295–299.

Newbold RR, McLachlan JA. 1985. Diethylstilbestrol associated defects in murine genital tract development. In McLachlan JA (ed); *Estrogens in the Environment, IP Influences on Development*. New York: Elsevier.

Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, *et. al.* 2001. Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol Sci* 60: 132–143.

Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Ishimura R, Kakeyama M, *et. al.* 2002. Developmental stage-specific effects of perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on reproductive organs of male rat offspring. *Toxicol Sci* 66: 283–92.

Olea N. 2000. Disruptores endocrinos: Posibles medidas de intervención. La perspectiva europea. *Quadern CAPS* 29: 36–42.

Olea N, Fernández MF, Araque P, Olea-Serrano F. 2002. Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit* 16: 250–56.

Olea N, Fernández MF, Martín-Olmedo P. 2001a. Endocrine Disrupters. The Case of oestrogenic xenobiotics. *Rev Salud Ambient* 1: 6–11.

Referencias

Olea N, Fernández MF, Martín-Olmedo P. 2001b. Endocrine Disrupters. The Case of oestrogenic xenobiotics II: Synthetic o estrogens. *Rev Salud Ambient* 1: 64–72.

Oliva A, Spira A, Multigner L. 2001. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reprod* 16: 1768–1776.

Olivera NM, Rodríguez Girault ME, Quiroga PN, Álvarez G, Sassone AH, *et. al.* 2011. Biomarcadores de exposición ambiental Bifenilos Policlorados y equivalentes tóxicos en población adulta e infantil de Argentina. *Actas 7º Congreso Regional Latinoamericano de Toxicología Forense – TIAFT, Cochabamba, Bolivia.*

OMS (World Health Organization). 1999. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 4th Edition. Cambridge: University Press.

OMS (World Health Organization). 2000. WHO Manual for the Standardised Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge: Cambridge University Press.

OMS (World Health Organization). 2010. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and processing of human semen. 5th ed .Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Ozgun K, Isikoslo M, Seleker M, Donmez L. 2005. Semen quality of smoking and nonsmoking in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet* 271: 109–12.

Parada L. 2006. Infertilidad y pareja: construcciones narrativas como horizonte para la intervención. *Revista Diversitas-Perspectivas en Psicología* 2: 149–58.

Pasqualotto FF, Umezu FM, Salvador M, Porger E, Sobreiro BP, Pasqualotto EB. 2008. Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 90: 278–83.

Patterson Jr DG, Welch SM, Turner WE, Sjödin A, Focant JF. 2011. Cryogenic zone compression for the measurement of dioxins in human serum by isotope dilution at the attogram level using modulated gas chromatography coupled to high resolution magnetic sector mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218: 3274–3281.

Paulozzi L, Erickson JD, Jackson RJ. 1997. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100: 831–834.

Paulsen CA, Berman NG, Wang C. 1996. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril* 65: 1015–1020.

Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. 1993. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 23:283–335.

Phillips DL, Pirkle JL, Burse VW, Bernert Jr JT, Henderson LO, *et al.* 1989. Arch Environ Contam Toxicol 18: 495–500.

Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. 1998. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. J Clin Endocrinol Metab 83: 3110–4.

Ping-Chi Hsu, Yueliang Leon Guo, Mei-Hui Li. 2004. Effects of acute postnatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on sperm function and hormone levels in adult rats. Chemosphere 54: 611–618.

PNUMA. 2002. Transformadores y condensadores con PCB: desde la gestión hasta la reclasificación y eliminación. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

PNUMA. 2004. Manual de Chile sobre el manejo de Bifenilos Policlorados. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

Pocar P, Fisher B, Klonish T, Hombach-Klomis S. 2005. Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. Reprod 129 : 379–89.

Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, Sunyer J, Ribas-Fitó. 2002. Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish general population: a puzzle without pieces and the protection of public health. Gac Sanit 16: 257–66.

Porta M, Ballester F, Ribas-Fitó N, Puigdomènech E, Selva J. 2006. Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish general population. Criteria for a diagnosis of the present situation. Gac Sanit 20: 233–38.

Porta M, Gasull M, Puigdomènech E, Garí M, de Basea MB, *et al.* 2010. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Catalonia. Environ Int 36: 655–64.

Prinz B, Krause GHM, Radermacher L. 1993. Standards and guidelines for PCDD/PCDF - an integrated approach with special respect to the control of ambient air pollution. Chemosphere 27: 491–500.

Punab M, Zilaitiene B, Jorgensen N, Horte A, Matulevicius V, *et al.* 2002. Regional differences in semen qualities in the Baltic region. Int J Androl 25: 243–52.

Quilter CR, Svennevi EC, Serhal P, Ralph D, Bahadur G, *et al.* 2003. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males. Fertil Steril 79: 301–307.

Quinete N, Schettgen T, Bertram J, Kraus T. 2014. Occurrence and distribution of PCB metabolites in blood and their potential health effects in humans: a review. Environ Sci Pollut Res Int Jun 19.

Referencias

Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. 2000. Testicular tumors with endocrine manifestations. In De Grost, L.J. and Jameson J.L. (eds.) *Endocrinology*, 4th edn. Saunders, Philadelphia, chapter 175.

Rantakokko P, Kiviranta H, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Vartiainen T, *et. al.* 2009. A simple and fast liquid-liquid extraction method for the determination of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) and 1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)-ethylene (*p,p'*-DDE) from human serum for epidemiological studies on type 2 diabetes. *J Chromatogr A* 1216: 897–901.

Rappe C. 1987. Global Distribution of Polychlorinated Dioxins and Dibenzofurans; In: *Solving Hazardous Waste Problems*, ACS Symposium Series 338, Chapter 2.

Relwani R, Berger D, Santoro N, Hickmon C, Nihsen M, *et. al.* 2011. Semen parameters and unrelated to BMI but vary with SSRI use and prior urological surgery. *Reprod Sci* 18:391–7.

Richthoff J, Spano M, Giwercman YL, Frohm B, Jepson K, *et. al.* 2002. The impact of testicular and accessory sex gland functions on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Human Reprod* 17: 3162–3169.

Rignell-Hydbom A, Rylander L, Elzanaty S, Giwercman A, Lindh Ch, *et. al.* 2005. Exposure to persistent organochlorine pollutants and seminal levels of markers of epididymal and accessory sex gland functions in Swedish men. *Human Reprod* 20: 1910–1914.

Roca M, Yusà V. 2013. *Biomonitorización Humana de contaminantes ambientales*. NEMUS 3.

Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. 2013. 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* 28: 462–70.

Ronn M, Lind L, van Bavel B, Salihovic S, Michaelsson K, *et al.* 2011. Circulating levels of persistent organic pollutants associate in divergent ways to fat mass measured by DXA in humans. *Chemosphere* 85: 335–343.

Ross M, Kaye GI, Pawlina W. 2005. *Histología*, 4^ª edición; Ed. Panamericana.

Rozati R, Reddy PP, Reddanna PA, Mujtaba R. 2002. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril* 78: 1187–1194.

Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. 2011. Males obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia* 43: 286–91.

Safe S. 2001. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides as potential endocrine disruptors. In: Metzler M (ed), *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part L, Chapter 8, Endocrine Disruptors*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Safe S. 2003. Toxicology and risk assessment of POPs. In: Fiedler H (ed), *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part O, Chapter 8, Persistent Organic Pollutant*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Safe S, Bandiera S, Sawyer T, Robertson L, Safe L, *et. al.* 1985. PCBs: Structure function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* 60: 47–56.
- Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A. 1998. Ah receptor agonist as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett* 102-103:343–347.
- Salihovica S, Mattioli L, Lindströma G, Lindb L, Lindc M, *et. al.* 2012. A rapid method for screening of the Stockholm Convention POPs in small amounts of human plasma using SPE and HRGC/HRMS. *Chemosphere* 86: 747–753.
- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 12.
- Schiffer C, Muller A, Egeberg DL, Alvarez L, Brenker C, *et. al.* 2014. Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO Rep* 15: 758–765.
- Schmidt JV, Bradfield CA. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55–89.
- Schnellmann RG, Vickers AEM, Sipes IG. 1985. Metabolism and disposition of polychlorinated biphenyls. In: Hodgson EBJR, Philpot RM, editors. *Rev in Bioch Toxicol*. New York, Asterdam, Oxford: Elsevier.
- Schultz R, Suominen J, Varre T, Hakovirta H, Parvinen M, *et. al.* 2003. Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology* 144: 767–776.
- Serrano T, Chevrier C, Multigner L, Cordier S, Jégou B. 2013. International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum Reprod* 28: 1974–86.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 6: 139–48.
- Sharpe RM. 2003. The estrogen hypothesis: where do we stand now? *Int J Androl* 26: 2–15.
- Sharpe RM. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 1697–1712.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. 1993. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392–1395.

Referencias

- Sigman M, Lipshultz IL, Howards SS. 2009. Office evaluation of the subfertile male. In: Infertility in the male. 4th ed. Larry I Lipshultz, Stuart S Howards and Craig S Niederberger by Cambridge University Press 153.
- Sikka SC, Wang R. 2008. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl* 10: 134–145.
- Silver R. 2000. What is the etiology of hypospadias? A review of recent research. *Del Med J* 72 : 343–7.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reprod* 16: 972–8.
- Sorg O. 2013. AhR signalling and dioxin toxicity. *Toxicol Lett* 230: 225–33.
- Soto A, Sonnenschein C. 1996. Environmental sex hormones mimics and antagonists. *Comments Toxicol* 5: 329–346.
- Spira A, Multigner L. 1998. The effect of industrial and agricultural pollution on human spermatogenesis. *Hum Reprod* 13: 2041–2042.
- Srogi K. 2008. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review. *Environ Chem Lett* 6: 1–28.
- Stevens JT, Gfeller W, Machemer L, Heinz-Leist K. 1998. Adequacy of required regulatory hazard testing for the detection of potential hormonal activity of crop protection chemicals. *J Toxicol Environ Health* 1 :59–79.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56: 602–7.
- Svobodová K, Plačková M, Novotná V, Cajthaml T. 2009. Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in vitro yeast assays. *Sci Total Environ* 407: 5921–5925.
- Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, et al. 2003. Study For Future Families Research Group, Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* 111: 414–20.
- Swan SH, Elkin EP, Fenster L. 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 105: 1228–32.
- Swan SH, Elkin EP, Fenster L. 2000. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934–1996. *Environ Health Perspect* 108: 961–66.

- Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostaza T, *et. al.* 2012. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidation stress, zins in fertile men. *Urology* 80: 822–5.
- Tevi-Benissam C, Belec L, Levy M, Schneider-Fauveau V, Si Mohamed A, *et. al.* 1997. In vivo semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 367–374.
- Tielemans E, Burdorf A, te Velde ER, Webber RF, van Kooij RJ, *et. al.* 1999. Occupationally related exposures and reduced semen quality: a case-control study. *Fertil Steril* 71: 690–6.
- Toft G, Long M, Kruger T, Hjelmberg PS, Bonde JP, *et. al.* 2007. Semen quality in relation to xeno-hormone and dioxin-like serum activity among Inuits and three European populations. *Environ Health Perspect* 115: 15–20.
- Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, Shvets M, Giwercman A, *et. al.* 2006. Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology* 17:450–458.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P. 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104: 741–803.
- Toro-Montoya AL. 2009. Espermograma. *Med Lab* 15: 149–69.
- Tremellen K. 2008. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reprod Update* 14: 243–258.
- Trummer H, Habemann H, Haas J, Pummer K. 2002. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human Reprod* 17: 1554–59.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 2001. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes .
- US EPA (U. S. Environmental Protection Agency). 2010. Method 1668 C: Chlorinated byphenil congeners in water, soil, sediment, biosolid and tissue by HRGC/HRMS. United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC.
- US EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2014. Evaluation of health hazards by exposure to Polychlorinated biphenyls (PCB) and proposal of a health-based quality criterion for soil. The Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, Denmark.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunström B, Cook P, *et. al.* 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106: 775–792.
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, *et. al.* 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 93: 223–241.

Referencias

- Van Leeuwen FX, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, *et.al.* 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* 40: 1095–1101.
- Van Waeleghem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. 1996. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Human Reprod* 11: 325–329.
- Vásquez RF, Vásquez Echeverri D. 2012. Espermograma y su utilidad clínica. *Rev Cient Salud Uninorte* 23: 220–30.
- Viso AC, Casteleyn L, Biot P, Eilstein D. 2009. Human biomonitoring programmes and activities in the European Union. *J Epidemiol Community Health* 63: 623–624.
- Welch AA, Lund E, Amiano P, Dorronsoro M, Brustad M, *et. al.* 2002. Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 5: 1273–1285.
- Wolff MS, Britton JA, Teitelbaum SL, Eng S, Deych E, *et. al.* 2005. Improving organochlorine biomarker models for cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2224–36.
- Wong EWP, Cheng CY. 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci* 32: 290–9.
- Woodruff TJ, Janssen SJ, Guillette LJ, Giudice LC. 2010. Environmental impacts on reproductive health and fertility .Cambridge University Press.
- Wyrobek AJ, Schrader SM, Perreault SD, Fenster L, Huszar G, *et. al.* 1997. Assessment of reproductive disorders and birth defects in communities near hazardous chemical sites. III Guidelines for field studies of male reproductive disorders. *Reprod Toxicol* 11: 243–59.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, *et. al.* 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology. *Human Reprod* 24: 2683–2687.
- Zubero MB, Ibarluzea JM, Aurrekoetxea JJ, Rivera J, Parera J, *et. al.* 2009. Serum levels of polychlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans and PCBs in the general population living near an urban waste treatment plant in Biscay, Basque Country. *Chemosphere* 76: 784–91.
- Zubero MB, Aurrekoetxea JJ, Ibarluzea JM, Rivera J, Parera J, *et. al.* 2011. Evolution of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in the general adult population living close to a MSW incinerator. *Sci Total Environ* 411: 241–247.

8. Anexos



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ANEXO I. Cuestionario complementario

Este cuestionario forma parte de un proyecto científico. Por favor, lea atentamente y responda con sinceridad a las preguntas que le vamos a formular.

DATOS CLÍNICOS

1-Edad..... años

2-Altura..... m

3-Peso..... kg

4-IMC..... kg/m²

5- ¿Cuánto tiempo intentaron usted y su pareja que quedara embarazada antes de que fueran a tratamiento?

Menos de 2 años 2-5años más de 5 años

6-¿Tienes hijos? (indica el nº)

SI Tengo Hijo/s

No

ANTECEDENTES

Algunas de las preguntas siguientes se refieren a aspectos importantes de su infancia y al periodo en que su madre estaba embarazada de usted (si es posible pregunte directamente a su madre)

1-¿Cuándo nació?

Día, mes y año:...../.../19...

2-¿Dónde vivía su madre mientras estaba embarazada de usted?.....

Anexos

3-¿Cuánto tiempo vivió usted allí?.....

4-¿Donde nació su madre?

5-¿Donde nació su padre?.....

6-¿Fumaba su madre mientras estaba embarazada de usted?

Si No

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre:

7-¿Trabajó su madre mientras estaba embarazada de usted?

Si No

Si contesto SI, qué tipo de trabajo?

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre:

8-¿Nos interesa saber si su nacimiento ocurrió tras 9 meses de embarazo?

Si

No, pretérmino..... ¿en qué semana?.....

No, postérmino..... ¿en qué semana?

No lo sabe.....

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre:

9-¿Cuáles fueron sus medidas al nacer?

Peso:.....gramos

Longitud:.....cm

No lo sabe:

10-¿Durante su infancia fue alimentado con leche materna?

SI NO

11-Si la respuesta anterior es afirmativa ¿Durante cuánto tiempo fue alimentado con leche materna?

4 meses 6 meses 1 año más de 1 año

Marque aquí si obtuvo la información directamente de su madre:

HÁBITOS DE VIDA

1-¿Consumes bebidas alcohólicas? SI No
-Si ha contestado que si, especifique la frecuencia

- A diario
 Fines de semana
 Esporádicamente

¿Qué cantidad ingería en cada toma?

2-¿Fuma?

No

Si, cigarrillos número por día

Si, otros , qué tipos y cuántos al día?

3-Si no fumas actualmente, ¿fumabas antes de forma regular?

No

Si aproximadamente cigarrillos al día

a)-¿Cuántos años seguidos ha fumado? (si hubo periodos en los que no fumo, dedúzcalos y si nunca fumo ponga 0)

Años.

4-¿Consumes de forma habitual algún tipo de drogas?

No.

Sí. Tipo:

5-¿Realiza ejercicio físico? Si.
No

a)-¿De qué tipo?

Andar aproximadamente 1 hora

Gimnasio

Deporte intenso al aire libre, en equipo

Otros ¿Cuál?

Anexos

b)-¿Con que frecuencia?

Diaria

Cada 2-3días

Semanal

Esporádicamente

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

1-Raza Blanca Negra Asiática

2-País de nacimiento:

3-Nivel de Estudios: E. Primaria ()

E. Secundaria/Bachiller ()

Universidad ()

4-Estatus Social

Alto.....

Medio.....

Bajo.....

5-Profesión:

a)-¿Cuál es su profesión?:

b)-¿Su profesión o puesto de trabajo conlleva estar en contacto con pesticidas, plaguicidas, sustancias químicas, desinfectantes, pinturas, productos industriales, u otro tipo de sustancias tóxicas?

Si No

c)-¿Qué tipo de sustancia?.....

d)-¿Con que frecuencia está en contacto con esa sustancia?

Diaria Semanal Mensual

e)-¿Cómo es la exposición a esa sustancia?

Por inhalación

Por contacto directo

DATOS AMBIENTALES

1-Lugar de nacimiento:.....

Población:.....

2-Residencia familiar:..... Población:..... Provincia:.....

3-Zona.....Urbana Rural

4-¿Cerca de su hogar hay alguna industria química que trabaje con productos tóxicos?

Si No

5-¿Está en contacto con alguna de estas sustancias?:

Pesticidas, plaguicidas, desinfectantes, sustancias químicas, pinturas, productos industriales, fundiciones u otro tipo de sustancias tóxicas

Si No

a) ¿Qué tipo de sustancia ?.....

b) ¿Con que frecuencia está en contacto con esa sustancia?

Diaria semanal Mensual

c) ¿Cómo es la exposición a esta sustancia?

Por inhalación Por contacto directo

ANEXO II. Seminograma

SEMINOGRAMA

Nº HC:	Fecha:
Apellidos, Nombre Paciente:	Fecha de nacimiento:
Apellidos, Nombre Cónyuge:	Fecha de nacimiento:

Análisis semen en fresco:	Valores de referencia:	Valores de referencia:
Volumen:	$\geq 1,5 \text{ mL}$	Licuefacción: <i>Completo</i>
pH:	7,9 - 8,2	Células redondas: $< 1 \text{ Mill/mL}$
Viabilidad:	$\geq 58\%$	Viscosidad: <i>Normal</i>
MAR Test:	<i>negativo</i> $\leq 50\%$	Aglutinación: <i>Aislada</i>

Concentración:	$\geq 15 \text{ Mill Spz/mL}$
Concentración total (Volumen * Concentración):	$39 \text{ Mill Spz/Eyaculado}$

Motilidad:	Motilidad progresiva: $\geq 32\% \text{ Motil. Progr. (PR)}$ Motilidad no progresiva: Inmóviles:
-------------------	--

Morfología:	Formas normales: $\text{Formas Normales (\%)}: \geq 4$ Formas anormales: Defectos de cabeza: Defectos pieza intermedia: Defectos de flagelo: Gota citoplasmática:
--------------------	--

Capacitación:	Volumen:	Concentración:	Motilidad Progresiva:
----------------------	----------	----------------	-----------------------

Diagnóstico:

Notas:

%SEMEN_ANALYSIS1.COMMENT%

Los parámetros seminales se analizan según el "Manual de la Organización Mundial de la Salud para el examen y procesamiento de muestras seminales humanas" (Organización Mundial de la Salud, 5ª edición, 2010).

ANEXO III. Informe

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Profile - Serum

Patient: Not Provided

Date collected

Code: PCV10

Age: 46

Date Received:

Sex: Male

Race: White

Methodology: Serum High Resolution Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry.

Summary of Toxins found at or above the reference range (NHANES Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, CDC, 2015)

Elevations found at or above the reference range: PCB 126; PCB 169

Cholesterol 182 <=200 mg/dL
 Triglycerides 121 35-160 mg/dL
 Total Lipids (cal.) 5.9 g/ml Phillips et al (1989)

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) - Serum

PCBs	Results (Lipid Adjusted) ng/g lipid	^{††} Geometric arithmetic mean (ng/g lipid)
PCB 77	0.03	†
PCB 81	0.06	-
PCB 126	0.21*	0.069
PCB 169	0.25*	0.041
PCB 105	1.02	6
PCB 114	0.22	†
PCB 118	4.3	37.8
PCB 123	0.22	†
PCB 156	0.24	14.1
PCB 157	0.40	3.80
PCB 167	0.71	3.94
PCB189	0.59	1.51

^{††} These levels provide a reference range to determine whether an individual has been exposed to higher levels of toxicants than found in the general population. (NHANES Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, CDC, 2015)

†Not calculated: proportion of results below limit of detection was too high to provide a valid result
 n.d =not detected



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante