

Ingesta de alcohol y calidad seminal en jóvenes varones sanos

Alcohol consumption and semen quality in young healthy men

A ingestão de álcool e qualidade do sêmen em homens jovens saudáveis

Lidia Mínguez-Alarcón^a, Miriam Moñino-García^a, María-Esperanza Portillo-Sánchez^a, Jaime Mendiola^a, Alberto M. Torres-Cantero^{a,b,c}

^a Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España.

^b Servicio de Medicina Preventiva, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia, España.

^c Campus Regional de Excelencia Mare Nostrum, Universidad de Murcia, España.

Cita: Lidia Mínguez-Alarcón, Miriam Moñino-García, María-Esperanza Portillo-Sánchez, Jaime Mendiola, Alberto M. Torres-Cantero. *Rev.salud ambient.* 2014;14(2):87-97.

Recibido: 23 de enero de 2014. **Aceptado:** 30 de julio de 2014. **Publicado:** 15 de diciembre de 2014.

Autor para correspondencia: Dra. Lidia Mínguez-Alarcón.

Correo e: minguezalarcon@gmail.com

Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, España. Tel: +34 868-88-7149

Financiación: Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología, Región de Murcia y Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

En los últimos 50 años se ha sugerido una disminución global de la concentración espermática humana, siendo los hábitos de vida uno de los principales determinantes señalados. El objetivo de este estudio es describir el consumo de alcohol y la calidad seminal en jóvenes varones universitarios e investigar las asociaciones entre ambas características. Se trata de un estudio transversal que se llevó a cabo en la Región de Murcia (España) entre 2010 y 2011. Los participantes fueron jóvenes universitarios sanos entre 18 y 23 años. Doscientos nueve varones cumplimentaron cuestionarios sobre hábitos de vida y alimentación, se sometieron a un examen físico y andrológico y proporcionaron una muestra seminal. Los estadísticos descriptivos se muestran como datos crudos. Para analizar las asociaciones entre consumo de alcohol y calidad seminal se realizaron análisis de regresión lineal múltiple. Los valores de la mediana y rango intercuartil (RIC) de los parámetros seminales analizados fueron los siguientes: $42,9 \times 10^6/\text{mL}$ (RIC: 21,9-72,2 $\times 10^6/\text{mL}$) de concentración espermática, 8,9 % (RIC: 6,0-13,9 %) de espermatozoides morfológicamente normales, y 57,2 % (RIC: 50,7-63,8 %) de movilidad espermática (progresiva y no progresiva). No se encontraron asociaciones significativamente estadísticas entre el consumo de alcohol y los distintos parámetros seminales. Nuestros resultados no respaldan la hipótesis de que la ingesta de alcohol esté relacionada con la calidad seminal, probablemente debido al bajo rango de consumo de alcohol en nuestra población de estudio. En conclusión, el consumo moderado de alcohol no está relacionado con la calidad seminal en jóvenes universitarios sanos de la Región de Murcia.

Palabras clave: calidad seminal; ingesta de alcohol; toxicidad.

Abstract

Over the past 50 years it has been suggested a worldwide decline in human semen quality, probably being lifestyles one of the main factors concerned. Our objectives are to describe semen quality and alcohol consumption in young university students and to explore the associations between alcohol intake and semen quality in young healthy men. A cross-sectional study was carried out between 2010 and 2011 in the Murcia Region (Spain) and included healthy young university students between 18-23 years of age. Two hundred and nine men completed questionnaires on lifestyle and diet, undertook a physical and andrological examination and provided a semen sample. Descriptive statistics are presented using untransformed data. Multiple linear regression analyses

were performed to analyze the associations between alcohol intake and semen quality in young men. The median (interquartile range: IQR) values for semen parameters were $42.9 \times 10^6/\text{mL}$ (IQR: $21.9\text{-}72.2 \times 10^6/\text{mL}$) for sperm concentration, 8.9 % (IQR: 6.0-13.9 %) for morphologically normal sperm, and 57.2 % (IQR: 50.7-63.8 %) for sperm motility (progressive and non-progressive). There were no significant associations between alcohol consumption and any sperm parameters. Our results do not support the hypothesis that alcohol intake is related with sperm quality parameters probably due to the low alcohol consumption range in our population of healthy, unselected young men. In conclusion, moderate alcohol consumption is not associated with semen quality in young university students of Murcia Region (Spain).

Key words: alcohol consumption; semen quality; toxicity.

Resumo

Nos últimos 50 anos tem sugerido uma diminuição global da concentração de esperma humano e os estilos de vida foram identificados com um dos principais determinantes. O objetivo deste estudo é descrever o consumo de álcool e a qualidade do sêmen em jovens universitários e investigar as associações entre estas duas características. Trata-se de um estudo transversal realizado na Região de Múrcia (Espanha) entre 2010 e 2011. Os participantes foram estudantes universitários saudáveis, com idades compreendidas entre os 18 e os 23 anos. Duzentos e nove rapazes responderam aos questionários sobre hábitos de vida e alimentação; submeteram-se a um exame físico e andrológico e forneceram uma amostra de sêmen. Os resultados da estatística descritiva foram apresentados com dados brutos. Para analisar as associações entre o consumo de álcool e a qualidade do sêmen, realizou-se a análise através de regressão linear múltipla. Os valores de mediana e o intervalo interquartil (IQR) em parâmetros do sêmen analisados foram os seguintes: $42,9 \times 10^6/\text{mL}$ (IQR, $21,9\text{-}72,2 \times 10^6/\text{mL}$) de concentração de espermatozoides, de 8,9 % (IQR, 6,0-13,9 %) de espermatozoides morfológicamente normais e 57,2 % (IQR, 50,7-63,8 %) da motilidade de espermática (progressiva e não progressiva). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o consumo de álcool e os vários parâmetros do esperma. Os nossos resultados não apoiam a hipótese de que o consumo de álcool esteja relacionado com a qualidade do sêmen, provavelmente devido ao baixo consumo de álcool na população em estudada. Conclui-se que o consumo moderado de álcool não está relacionado com a qualidade do sêmen nos jovens saudáveis da universidade da Região de Murcia.

Palavras-chave: qualidade do sêmen; ingestão de álcool; toxicidade.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 50 años múltiples publicaciones han sugerido que la concentración seminal humana ha descendido globalmente¹⁻⁴. No obstante, es un tema controvertido que sigue siendo objeto de estudio y debate⁵.

Factores medioambientales y hábitos de vida podrían encontrarse entre los principales determinantes del descenso de la calidad seminal durante las últimas décadas⁶⁻¹⁰. El hábito tabáquico y el abuso de sustancias se han relacionado con la afectación de la función reproductiva masculina¹¹. En especial, el consumo de alcohol se ha asociado con el decrecimiento de la concentración seminal^{10,12-14}. Sin embargo, existe una gran controversia sobre este tema debido a los dispares resultados obtenidos al respecto¹⁵⁻²¹.

El consumo de alcohol es una de las áreas prioritarias en salud pública. Su consumo está relacionado con múltiples enfermedades que lo convierten en el tercer factor de riesgo en años de vida perdidos y/o vividos con incapacidad, provocando un 4,5% de la carga mundial de morbilidad^{22,23}. El patrón de consumo más extendido

entre los jóvenes se produce con un Consumo Episódico Excesivo de Alcohol (CEEAA) o Consumo Intensivo de Alcohol (CIA), lo que puede agravar cualquier tipo de riesgo para la salud²⁴. La ingestión de bebidas alcohólicas se destaca como uno de los factores más frecuentes de disminución de la fertilidad y causante de alteraciones de la espermatogénesis²⁵.

El alcohol puede actuar a cualquier nivel del eje endocrino, en el metabolismo hepático de las hormonas sexuales y aumentando la síntesis de SHBG (globulina fijadora de hormonas sexuales) en ese órgano. Además, es relevante la acción de su principal metabolito, el acetaldehído, sustancia más tóxica que el propio alcohol, modificando la esteroidogénesis testicular²⁶. De hecho, estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que el etanol tiene efectos tóxicos sobre las células de Leydig, afectando a los niveles de testosterona así como el tamaño de dichas células²⁷. Por tanto, en relación con la calidad seminal humana, la ingesta de alcohol podría tener una asociación con la subinfertilidad masculina. Un trabajo llevado a cabo con varones que acudían a clínicas de infertilidad en la India estudió la relación entre el CIA y la producción y morfología espermática¹⁰. Este estudio prospectivo concluyó que el progresivo deterioro en la calidad

seminal se relaciona con un incremento de la ingesta de alcohol. Otro estudio llevado a cabo en Japón investigó las asociaciones entre hábitos de vida y calidad seminal en 271 varones infértiles y 251 voluntarios sanos, mostrando que el consumo de alcohol fue significativamente más común en varones infértiles (92 %) que en controles (80 %) ($p < 0,01$)²⁸. Además, resultados similares se han mostrado en varones infértiles alemanes²⁹. Sin embargo, en un trabajo reciente en el Reino Unido se reclutaron varones mayores de 18 años de 14 clínicas de infertilidad en un estudio de casos (baja concentración espermática móvil, $n=939$) y controles ($n=1310$). En este caso no se observaron asociaciones significativas entre el consumo de alcohol y calidad seminal reducida²¹.

No obstante, entre poblaciones de varones fértiles (o sin conocimiento de su fertilidad), los resultados se han mostrado distintos^{12,14,17,19,30-34}. Por ejemplo, en EE.UU. se analizaron las relaciones entre la ingesta de alcohol y la morfología espermática en 86 varones voluntarios sanos (rango 18-35 años), sin encontrarse una relación significativa entre ambos parámetros³⁰. En otro estudio transversal llevado a cabo en Singapur se estudiaron 243 varones con fertilidad probada (rango 19-47 años), concluyendo que la ingesta de alcohol no se relacionó con una afectación de la calidad seminal en esta población de estudio¹⁷. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en Finlandia examinó la calidad seminal en 195 varones sanos entre 35 y 69 años¹². Este estudio concluyó que la ingesta moderada de alcohol podría afectar la calidad seminal más a menudo de lo que se pensaba previamente, mientras que el consumo alto de alcohol podría incluso estar asociado con serios desórdenes de la producción espermática¹². Recientemente, se ha evaluado también la relación entre el consumo de alcohol y tabaco y la calidad seminal por Joo et ál.¹⁴ en Seúl (Corea del Sur). Se recolectaron muestras seminales de 62 varones sanos, con una edad alrededor de 20 años, que fueron clasificados de acuerdo a su consumo de alcohol y tabaco. La ingesta alta de alcohol ($\geq 15,4$ g/día) se asoció con un incremento significativo de la morfología espermática anormal¹⁴.

La mayoría de trabajos han estudiado la relación entre ingesta de alcohol y calidad seminal en hombres infértiles o subfértiles. No obstante, en este tipo de población, otros factores podrían estar influenciando negativamente la producción espermática. Por otro lado, en los estudios en hombres sin problemas de fertilidad (o voluntarios) los rangos de edad son muy amplios, y además, se ha descrito que la calidad seminal del varón podría declinar con la edad. Hasta donde conocemos, solo un estudio previo en el norte de Europa ha explorado

las asociaciones entre la ingesta de alcohol y la calidad seminal en jóvenes varones sanos no seleccionados y sin conocimiento de su estatus fértil³². Así pues, el objetivo de este estudio es investigar dichas asociaciones en jóvenes varones sanos del sureste español.

MATERIAL Y MÉTODO

Este trabajo se engloba dentro del Estudio de Hombres Jóvenes de Murcia [Murcia Young Men's Study (MYMS)]. Se trata de un estudio transversal en estudiantes universitarios jóvenes (rango 18-23 años) con buen estado de salud llevado a cabo en la Región de Murcia (España). El periodo de reclutamiento se extendió de octubre de 2010 a noviembre de 2011. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes y la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia aprobó dicho estudio.

Se distribuyeron anuncios por todos los campus universitarios para invitar a los estudiantes a participar en este estudio con el mensaje: "Se buscan hombres jóvenes sanos universitarios para proyecto de investigación". Para ser incluidos en MYMS los sujetos tenían que ser estudiantes universitarios, nacidos en España después del 31 de Diciembre de 1987, y poder contactar con sus madres para que éstas cumplimentaran un cuestionario. Doscientos cuarenta estudiantes contactaron con los investigadores, 17 de los cuales tenían alguno de los criterios de exclusión (no haber nacido en España: 5, no haber nacido en una fecha posterior al 31 de diciembre de 1987: 9, y no tener la posibilidad de contactar con sus madres: 3). Por lo tanto, 223 estudiantes (92,9 %) cumplían los criterios de inclusión y se les citó para formar parte del estudio y asistir a la sesión clínica. Posteriormente, 215 (89,6 %) estuvieron de acuerdo en participar en el estudio. Además, se excluyeron 6 jóvenes porque argumentaron tener una ingesta calórica no creíble, dejando un total de 209 hombres sanos incluidos en nuestros análisis.

El día de la sesión clínica se les realizó un examen físico y andrológico, obtuvieron una muestra seminal y completaron cuestionarios sobre estilo de vida, frecuencia alimentaria y exposición a tabaco. Los participantes fueron recompensados por su participación con una tarjeta regalo de 50€.

EXAMEN FÍSICO

El peso corporal y la talla fueron medidos usando una báscula digital (Tanita SC 330-S) y un tallímetro telescópico, con un cursor abatible con una exactitud en milímetros. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. El tamaño testicular se valoró usando

un orquidímetro de Prader (Andrology Australia, Clayton, Victoria, Australia). La presencia de varicocele u otras anomalías escrotales fueron también evaluadas, así como el vello púbico utilizando los estadios de Tanner. La presencia de varicocele fue clasificada como: no varicocele, solamente detectado durante la maniobra de Valsalva, palpable o visible.

MEDICIÓN DE INGESTA DE ALCOHOL

Usamos un cuestionario de frecuencia alimentaria semi-cuantitativo (CFA) para evaluar la ingesta diaria habitual de alimentos y nutrientes (disponible en: <http://bibliodieta.umh.es/files/2011/07/CFA101.pdf>). El CFA incluía 101 ítems de alimentos para captar las principales fuentes de alimentos y nutrientes. Este cuestionario es una versión modificada a partir de un CFA previo basado en el cuestionario de Harvard³⁵, el cual fue desarrollado y validado usando los registros dietéticos de cuatro semanas en una población adulta en Valencia (sureste de España)³⁶. Los coeficientes de correlación de validez y la reproducibilidad (ajustados por ingesta energética) fueron desde 0,38 para la reproducibilidad de los carotenoides hasta 0,44 para la validez de la vitamina C³⁶. Estos valores se encuentran dentro de rangos similares a los de otros cuestionarios dietéticos³⁷ y también mostró satisfactoriamente la validez bioquímica cuando se comparó con niveles plasmáticos de vitaminas³⁸.

A los participantes en el estudio se les preguntó con qué frecuencia, de media, consumían cada uno de los 101 ítems de alimentos en base al año anterior. Se especificaron los tamaños de las raciones para cada ítem alimenticio en el CFA. El cuestionario admitía nueve respuestas posibles, desde "nunca o menos de una vez al mes" a "seis veces o más al día". Cada categoría de la frecuencia de alimentos para cada ítem alimenticio se convirtió en ingesta diaria de ese alimento: "1" nunca o menos de una vez al mes; "2" 1-3 veces al mes; "3" una vez a la semana; "4" 2-4 veces a la semana; "5" 5-6 veces a la semana; "6" una vez al día; "7" 2-3 veces al día; "8" 4-5 veces al día, y "9" 6 o más veces al día. El bloque de bebidas alcohólicas incluyó los siguientes ítems: vino tinto, vino rosado o blanco; jerez, vino seco o vermut; cerveza; licores, y un último ítem que abarcaba brandy, ginebra, whisky, ron y vodka.

Los valores nutricionales se obtuvieron principalmente de las publicaciones de las tablas de composición de alimentos del Departamento de Agricultura de EE.UU., así como otras fuentes publicadas para los alimentos españoles y los tamaños de las porciones^{39,40}. Para el cálculo de los gramos de alcohol ingeridos diariamente por cada sujeto de estudio, se multiplicó la frecuencia

de consumo de cada ítem especificado en el CFA por la cantidad del alcohol que contenía dicho ítem.

ANÁLISIS SEMINAL

Se aconsejó un periodo de abstinencia eyaculatoria de, al menos, 48 horas. No obstante, los sujetos no fueron excluidos si no habían mantenido dicho periodo de abstinencia (n=30). El tiempo de abstinencia fue registrado como el tiempo entre la eyaculación actual y la previa a partir de la información proporcionada por los sujetos del estudio. Los hombres recogieron las muestras seminales por masturbación en la sesión clínica. El volumen eyaculado fue estimado a partir del peso de la muestra, asumiendo una densidad del semen de 1,0 g/mL. La concentración espermática fue evaluada utilizando un hemocitómetro (Improved Neubauer; Hauser Scientific Inc., Horsham, PA, USA). Para la estimación de la concentración espermática, las muestras fueron diluidas en una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0,6 M y formaldehído al 0,4 % en agua destilada. La cámara del hemocitómetro se cargó con la dilución y al menos 200 espermatozoides en dos réplicas fueron contados. Los espermatozoides fueron clasificados según si eran móviles o inmóviles⁴¹ para establecer el porcentaje de espermatozoides móviles (con movimiento progresivo y no progresivo). Brevemente, el procedimiento consistió en lo siguiente. Se colocó una alícuota de semen bien mezclado de 10 µL en un portaobjetos limpio que fue guardado a 37 °C y cubiertos con un cubreobjetos de 22x22 mm. La preparación fue colocada en la platina caliente del microscopio a 37 °C e inmediatamente examinada a 400x. El recuento espermático total se calculó como el producto entre el volumen y la concentración espermática. La determinación de la morfología se llevó a cabo tras dejar secar la muestra mediante exposición al aire ambiental, y fue fijada y teñida siguiendo el protocolo de Papanicolaou. La morfología se evaluó usando el criterio estricto de Kruger⁴². La misma bióloga especializada llevó a cabo todos los análisis espermáticos. Para incrementar la consistencia y la comparabilidad de nuestros análisis (variabilidad inter-laboratorios), cinco sets de muestras de semen duplicadas fueron enviadas durante el periodo de estudio desde el Departamento de Desarrollo y Reproducción de la Universidad de Copenhague a nuestro Laboratorio de Andrología.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis descriptivos sobre características demográficas, examen físico, análisis seminal e ingesta de alcohol de la muestra de estudio. Para los análisis posteriores, el volumen seminal, la concentración y morfología espermática, y el recuento total espermático

se transformaron logarítmicamente usando el logaritmo natural (ln) ya que no mostraron una distribución normalizada. Tras dicha transformación estas variables mostraron una distribución normal.

La confusión fue medida usando un método híbrido que combina el conocimiento previo usando gráficos acíclicos directos (DAGs)⁴³ y un método estadístico de punto de cambio estimado, en el cual la posible covariable permanecía en los modelos si cambiaba el coeficiente β más de un 10 %. Usando dicho método, los modelos finales fueron ajustados por las covariables siguientes: IMC (kg/m²), tabaquismo (fumador vs. no fumador), tiempo de abstinencia (horas), presencia de varicocele (sí/no), ingesta de cafeína (mg/día), ingesta calórica (kcal/día) y otras fuentes de macro y micronutrientes (g/día). Los modelos para movilidad espermática fueron además ajustados por tiempo de comienzo de análisis seminal (minutos).

En primer lugar, se realizaron modelos de regresión lineal múltiple ajustados por las covariables retenidas en los modelos finales, para analizar la asociación entre los diferentes parámetros de calidad seminal (variables dependientes) y las diferentes bebidas alcohólicas (variables independientes), expresadas en coeficientes β e intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %). Los modelos cumplieron con los criterios de linealidad, independencia, normalidad, homocedasticidad y no-colinealidad. Los residuales de los modelos fueron normales y se inspeccionaron y verificaron los gráficos de residuales. En segundo lugar, se analizó la asociación entre los diferentes parámetros de calidad seminal y la ingesta de alcohol medida en gramos, que se presenta en este trabajo en forma de figuras. Los varones fueron divididos en cuartiles en función del nivel de ingesta de alcohol, siendo los varones en el cuartil más bajo considerados el grupo de referencia. El método de regresión lineal múltiple fue utilizado para examinar la asociación de cada categoría de alcohol con los parámetros de calidad seminal (p de tendencia). Los modelos de regresión lineal fueron llevados a cabo usando la mediana de los valores de las categorías de alcohol en cada cuartil como una variable continua y los parámetros seminales como variable dependiente. Se utilizó también un análisis de covarianza (ANCOVA) para calcular los valores de los parámetros de calidad seminal en cada cuartil ajustados por las covariables retenidas en los modelos finales. Los coeficientes de regresión para los resultados fueron transformados anti-logarítmicamente (volumen, concentración, recuento total y morfología espermática) para permitir la representación de las medias e IC 95 % ajustados en las escalas en las que fueron originalmente medidas. Dichos modelos de

ANCOVA fueron creados utilizando los parámetros seminales como variables dependientes continuas, y la ingesta de alcohol (g/día) y covariables como variables independientes. Además, también se realizaron diversos análisis de modificación del efecto e interacción, y sensibilidad, para diversas variables importantes (tiempo de abstinencia, IMC, tabaquismo) en la relación entre ingesta de alcohol y parámetros seminales. Del mismo modo, también se consideraron otras distribuciones poblacionales como tertiles o quintiles para explorar las relaciones anteriormente descritas. Se estimó una significación estadística de 0,05 y los modelos fueron llevados a cabo con el paquete estadístico SPSS 19,0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

RESULTADOS

Los sujetos participantes eran jóvenes, mediana 20,4; rango intercuartil (RIC) 18,1-22,8, principalmente caucásicos (97,6 %) y con una mediana de IMC de 23,7; RIC 19,4-30,0 kg/m² (Tabla 1). Un tercio de los sujetos era fumador y todos consideraron su estado de salud como bueno o excelente.

Tabla 1. Principales características descriptivas de los sujetos del estudio (n=209)

Variable	Media (DE)	Mediana (5-95)
Edad (años) ^a	19,2 (5,5)	20,4 (18,1-22,8)
IMC (kg/m ²)	24,0 (3,4)	23,7 (19,4-30,0)
Tiempo de abstinencia (horas) ^b	79,3 (37,4)	71,0 (39,0-136)
Tamaño, testículo izquierdo (mL) ^c	20,7 (3,6)	20,0 (14,0-25)
Tamaño, testículo derecho (mL) ^c	22,0 (3,4)	22,0 (15,0-27)
Presencia de varicocele (%)	15,0	-
Fumadores (%)	31,6	-

DE: desviación estándar; (5-95): percentil 5 -95.

^aEdad calculada como la diferencia entre el día de cita del estudio y el que ellos anotaron como su fecha de nacimiento en el cuestionario.

^bPeriodo de abstinencia de eyaculación calculado como la diferencia entre el tiempo actual de eyaculación y el que ellos anotaron como última eyaculación.

^cTamaño testicular medido por palpamiento.

La mediana;RIC de valores para los parámetros seminales fueron los siguientes (Tabla 2): 44,0x10⁶/mL; 8,9-129 para concentración espermática; 121x10⁶; 17,8-400 para recuento total espermático; 9,0 %; 2,8-23 para formas espermáticas normales y 57,2 %; 28,9-74 para movilidad progresiva y no progresiva. Sólo alrededor de la mitad de los sujetos (54,9%) presentaron todos los parámetros espermáticos por encima de los valores recomendados por la OMS⁴¹. Casi un 55 % presentaron una ingesta, al

menos 1 vez a la semana, de licor; un 26 % de vino tinto y un 80 % de cerveza. En la Tabla 3 se muestran los resultados de los análisis multivariantes entre la ingesta de bebidas alcohólicas y los parámetros seminales de los sujetos. No se encontraron asociaciones significativamente estadísticas entre el consumo de bebidas alcohólicas y los distintos parámetros seminales. Además, tampoco se observaron asociaciones significativas entre la ingesta alcohólica (g/día) y los parámetros de calidad seminal (Figuras 1 y 2). Los valores medios ajustados; IC 95 % de concentración espermática para los hombres del primer, segundo, tercer y cuarto cuartil de ingesta de alcohol total fueron: $33,2 \times 10^6/\text{mL}$; $24,9-44,4$, $51,0 \times 10^6/\text{mL}$; $39,0-66,7$, $36,6 \times 10^6/\text{mL}$; $28,1-47,8$ y $31,0 \times 10^6/\text{mL}$; $22,9-41,8$, respectivamente. Para la morfología normal espermática fueron 8,6 %; 7,1-10,5, 9,1 %; 7,6-10,9, 8,2 %; 6,9-9,8 y 9,0 %; 7,3-11,0. En el caso del recuento total espermático se observaron valores de 112×10^6 ; $85,6-147$, 131×10^6 ; $102-169$, 115×10^6 ; $90-147$ y $86,9 \times 10^6$; $65,9-114$. Y finalmente los valores de la movilidad total espermática fueron 56,2 %; $52,9-59,4$, 58,8 %; $55,8-61,8$, 56,4 %; $53,5-59,4$ y 56,2 %; $52,9-59,5$. Los análisis de modificación del efecto e interacción, y sensibilidad, en la relación entre ingesta de alcohol y parámetros seminales no mostraron ningún cambio significativo en los resultados obtenidos. Del mismo modo, los modelos teniendo en cuenta otras distribuciones poblacionales como tertiles o quintiles tampoco cambiaron los resultados observados.

Tabla 2. Parámetros seminales y consumo de alcohol de los sujetos del estudio (n=209)

variable	Media (DE)	Mediana (5-95)
Volumen seminal (mL)	3,3 (1,7)	3,0 (1,0-6,4)
Concentración espermática ($10^6/\text{mL}$)	52,1 (37,1)	44,0 (8,9-129)
% Movilidad espermática (P+NP) ^a	56,5 (10,9)	57,2 (38,9-74,0)
% Morfología normal espermática	10,3 (6,3)	9,0 (2,8-23)
Recuento total espermático (10^6)	154 (120)	121 (17,8-400)
Vino tinto ^b (1 vaso, 125 cc)	1,9 (1,2)	2,0 (1,0-5,0)
Vino rosado o blanco ^b (1 vaso, 125 cc)	1,2 (0,5)	1,0 (1,0-2,0)
Jerez, vino seco, vermut ^b (1 copa, 50 cc)	1,1 (0,9)	1,0 (1,0-2,0)
Cerveza ^b (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	3,8 (2,2)	4,0 (1,0-7,0)
Licores (20-25°) ^b (1 copa, 50 cc)	1,1 (1,3)	1,0 (1,0-2,0)
Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka ^b (1 copa, 50 cc)	2,8 (1,7)	3,0 (1,0-5,0)
Ingesta de alcohol (g) ^c	9,4 (8,9)	6,8 (0,1-24,8)

DE: Desviación estándar; (5-95): percentil 5-95.

^aP+PN: Movimiento progresivo y no progresivo.

^b Los valores representan la media (o mediana) anual de consumo de items específicos, con los siguientes valores numéricos y categoría de consumo: "1" nunca o menos de una vez al mes; "2" 1-3 veces al mes; "3" una vez a la semana; "4" 2-4 veces a la semana; "5" 5-6 veces a la semana; "6" una vez al día; "7" 2-3 veces al día; "8" 4-5 veces al día, y "9" 6 o más veces al día.

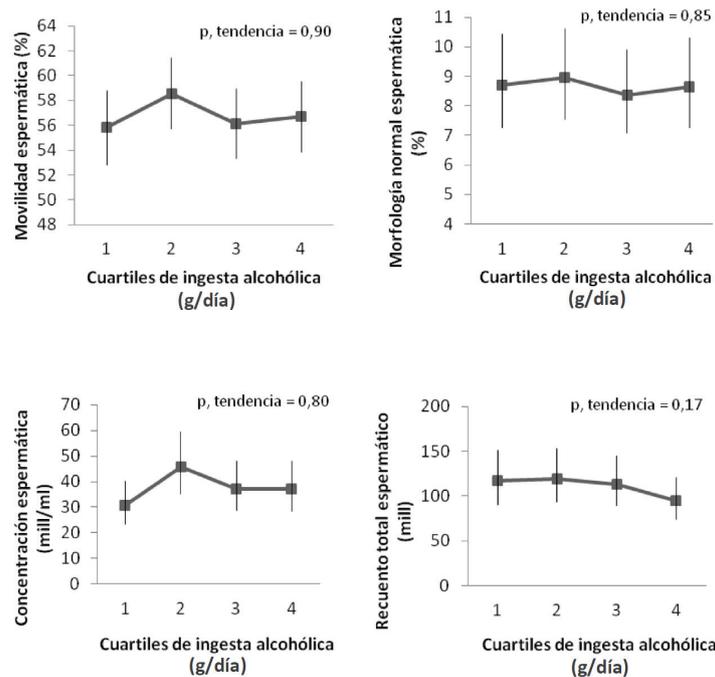
^c La ingesta de alcohol fue ajustada por la ingesta total energética usando el método de residuales de nutrientes (Willett, 1998). Se muestra la media (o mediana) diaria de ingesta de alcohol en la dieta (en gramos).

Tabla 3. Regresión lineal múltiple entre el consumo de diferentes bebidas alcohólicas y parámetros seminales de los sujetos del estudio (n=209)

	Vino tinto		Vino blanco o rosado		Vino seco o vermut		Cerveza		Licores		Brandy, ginebra, ron, whiskey, vodka	
	β	IC 95%	β	IC 95%	β	IC 95%	β	IC 95%	β	IC 95%	β	IC 95%
Volumen seminal (mL)	-0,02	-0,09;0,05	-0,01	-0,17;0,16	-0,02	-0,12;0,08	0,01	-0,03;0,04	0,04	-0,02;0,10	0,01	-0,06;0,05
Movilidad espermática (P+NP) (%)	0,34	-0,84;1,50	0,80	-1,95;3,55	-0,36	-2,01;1,30	0,19	-0,43;0,82	-0,22	-1,28;0,83	0,03	-0,81;0,88
Morfología espermática normal (%)	-0,02	-0,09;0,06	-0,14	-0,31;0,03	-0,01	-0,11;0,10	-0,01	-0,04;0,03	0,02	-0,04;0,09	0,02	-0,03;0,07
Concentración espermática ($10^6/\text{mL}$)	0,02	-0,09;0,13	0,16	-0,09;0,41	-0,05	-0,20;0,11	0,05	-0,01;0,11	-0,03	-0,13;0,07	0,01	-0,07;0,09
Recuento total espermático (10^6)	0,01	-0,10;0,11	0,13	-0,11;0,37	-0,06	-0,20;0,09	0,02	-0,03;0,08	-0,01	-0,10;0,09	-0,02	-0,09;0,05

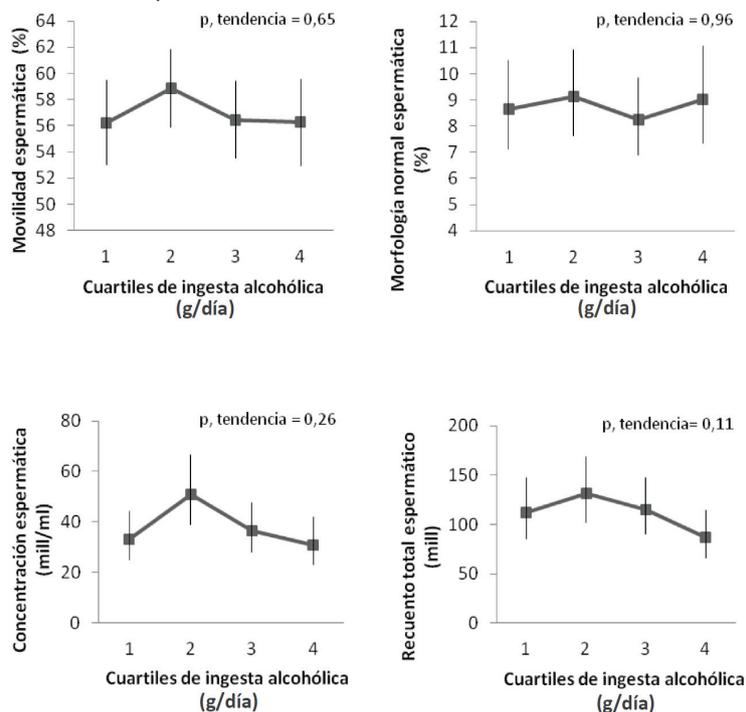
Nota: Se muestran los coeficientes β y los intervalos de confianza al 95% (IC 95%). Los datos fueron ajustados por IMC (kg/m^2), tabaquismo (fumador vs. no fumador), periodo de abstinencia (horas), presencia de varicocele (sí/no), ingesta de cafeína ($\text{mg}/\text{día}$), ingesta calórica ($\text{kcal}/\text{día}$) y otras fuentes de macro y micronutrientes ($\text{g}/\text{día}$). Los modelos para movilidad espermática fueron además ajustados por el tiempo de comienzo hasta el análisis seminal (minutos).

Figura 1. Asociaciones entre cuartiles de ingesta de alcohol y parámetros de calidad seminal (no ajustadas o crudas)



Los modelos de tendencia lineal fueron llevados a cabo usando la mediana de ingesta de alcohol en cada cuartil como variable continua en cada regresión lineal para cada parámetro seminal. Se muestran los valores medios y los intervalos de confianza al 95% para los diferentes parámetros seminales. Los rangos de ingesta de alcohol para cada cuartil fueron: 1° [0-3,02], 2° [3,06-6,70], 3° [6,76-13,53] y 4° [13,66-68,49].

Figura 2. Asociaciones entre cuartiles de ingesta de alcohol y parámetros de calidad seminal ajustadas por covariables en el modelo de regresión lineal múltiple



Las medias y los intervalos de confianza al 95% para los diferentes parámetros seminales mostrados en las figuras fueron ajustados por IMC (kg/m²), tabaquismo (fumador vs. no fumador), periodo de abstinencia (horas), presencia de varicocele (si/no), ingesta de cafeína (mg/día), ingesta calórica (kcal/día) y otras fuentes de macro y micronutrientes (gr/día). Los modelos para movilidad espermática fueron además ajustados por tiempo hasta el comienzo del análisis seminal (minutos). Los modelos de tendencia lineal fueron llevados a cabo usando la mediana de ingesta de alcohol en cada cuartil como variable continua en cada regresión lineal múltiple para cada parámetro seminal. Los rangos de ingesta de alcohol para cada cuartil fueron: 1° [0-3,02], 2° [3,06-6,70], 3° [6,76-13,53] y 4° [13,66-68,49].

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la ingesta de bebidas alcohólicas o alcohol (g/día) no se asocia con la calidad seminal en nuestra población de varones jóvenes sanos no seleccionados. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que explora esta cuestión en el sur de Europa, y solo otro estudio más ha investigado este tema en el norte de Europa³². Por tanto, nuestro trabajo expande el conocimiento actual existente acerca de la relación entre consumo de alcohol y calidad seminal en varones jóvenes sin conocimiento de su estatus de fertilidad.

Varios trabajos previos han estudiado la relación entre la ingesta de alcohol y la calidad seminal mostrando resultados dispares. Algunos han informado de una relación entre consumo de alcohol y parámetros seminales disminuidos^{10,12-14,28}, mientras que otros no han encontrado tales asociaciones^{11,16,17,19-21,30}. Estos hallazgos inconsistentes podrían deberse a las diferencias en la valoración de la ingesta de alcohol y el nivel de exposición entre los sujetos.

Se sabe que un consumo entre moderado y alto de alcohol podría estar asociado con serios desórdenes de la producción espermática^{10,12-14}. Por otro lado, en general, el estrés oxidativo está relacionado por múltiples vías con el deterioro molecular y celular que puede conducir a desórdenes y muerte celular⁴⁴. No obstante, una ingesta de alcohol moderada podría tener efectos aparentemente protectores sobre los parámetros seminales debido al efecto antioxidante de los polifenoles, que forman parte de algunas bebidas, con contenido alcohólico, como los vinos^{18,45,46}.

Otra razón por la que no observamos una relación entre consumo de alcohol y calidad seminal podría ser que la cantidad de alcohol que consumen nuestros sujetos fuera insuficiente para detectar un desenlace significativo. Nuestros varones presentaron una media diaria de consumo de alcohol de 9 gramos, y esta cantidad es algo menor a la que contiene un vaso de vino o de cerveza. Una Unidad de Bebida Estándar (UBE) equivale a 10 g de alcohol puro, de modo que tanto un vaso de vino (100 mL) como una caña de cerveza (250 mL) representarían una UBE^{47,48}. Si conocemos que un consumo de riesgo implica una ingesta de alcohol diaria en varones superior a 40 g de etanol o 5 UBEs⁴⁹, aproximadamente, podemos concluir que el consumo de alcohol de estos jóvenes ni se aproxima a un abuso de alcohol que pudiera acabar en un bebedor de riesgo. Algunos estudios sugieren que con un consumo de alcohol menor a 40 g/día, a un bebedor de riesgo,

dificulta la probabilidad de que el alcohol pueda jugar un papel fundamental en la causa de una baja calidad seminal^{12,30}. Nuestros resultados están de acuerdo con los presentados por López-Teijón et al³⁴. Este trabajo se llevó a cabo en Barcelona (España) e incluyó 1005 varones voluntarios entre 18 y 65 años (media de 33,5 años). Los sujetos cumplimentaron un cuestionario validado sobre estilos de vida y salud y donaron una muestra seminal. De los 967 sujetos que rellenaron el cuestionario el 55 % presentaron un consumo diario de alcohol. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros seminales del grupo que consumía alcohol diariamente y el que no. Además, encontramos otro ejemplo similar en el estudio llevado a cabo por Chia et al¹⁷. En este caso se exploraron las asociaciones entre la ingesta de alcohol y la calidad seminal en 243 varones jóvenes fértiles de Singapur. Los principales hallazgos fueron que un consumo entre bajo y moderado de alcohol pareció no estar asociado con la calidad seminal en esa población de estudio. También, se encontraron resultados similares en un estudio posterior de casos y controles llevado a cabo por el mismo grupo de investigación⁵⁰.

Por último, el único estudio, hasta donde conocemos, que ha estudiado estas asociaciones en población similar (347 varones jóvenes no seleccionados) del norte de Europa³², mostró una tendencia hacia inferiores parámetros espermáticos a ingestas altas de alcohol durante los últimos 5 días previos a la recogida de la muestra seminal, aunque no se encontró una asociación dosis-respuesta estadísticamente significativa. Con respecto a nuestro estudio la valoración del consumo de alcohol fue claramente distinta, pero que no se hallara un patrón claro dosis-respuesta pone en entredicho la hipótesis de relación entre la ingesta de alcohol y la afectación de la calidad seminal, como sugieren nuestros resultados.

Nuestro estudio también presenta algunas limitaciones. Como es sabido el diseño transversal representa una limitación para inferir causalidad. No obstante, no encontramos asociaciones significativas en nuestro estudio, lo que podría deberse también a un relativo pequeño tamaño muestral, con lo cual el error tipo II podría ser relevante para nuestros resultados. Sin embargo, el estudio presentó una potencia adecuada (80 %) para detectar asociaciones entre consumo de alcohol y calidad seminal en magnitudes mostradas previamente en otros estudios similares. Los sujetos sólo recogieron una muestra seminal, y esto podría ser una limitación, no obstante, hay evidencias que demuestran que una sola muestra puede ser suficiente para describir la calidad seminal de los participantes

en estudios sobre epidemiología reproductiva^{51,52}. El error de medida podría estar presente, debido a que un cuestionario de frecuencia alimentaria también presenta sus limitaciones a la hora de valorar la dieta, pero es una de las herramientas más utilizadas actualmente. Por otra parte, los jóvenes también podrían infradeclarar la ingesta de alcohol por considerar un cierto consumo como reproducible socialmente. No obstante, nuestro CFA ha sido adaptado, validado^{36,38} y utilizado en otras poblaciones adultas de la geografía española⁵³. Además, cualquier sesgo en la valoración de la dieta sería no diferencial. La OMS indica que consumos esporádicos de cantidades superiores a 60 g de alcohol implican un consumo de riesgo²³ y, posiblemente este tipo de consumo podría afectar a la calidad seminal de estos jóvenes. No obstante, en nuestro estudio no se preguntó sobre el CIA. Con respecto a otras drogas de abuso, el consumo de marihuana no mostró ser una variable confusora en las asociaciones estudiadas, sin embargo el consumo de cocaína o éxtasis no fue evaluado, con lo cual no podemos descartar la posibilidad de confusión residual debido a este hecho. Por último, podría existir un sesgo de selección, pero el proyecto no se publicitó como un estudio de fertilidad y los varones jóvenes participantes eran voluntarios (no seleccionados), los cuales desconocían su potencial fértil.

En conclusión, una ingesta de alcohol moderada no se asoció con los parámetros de calidad seminal de nuestra población de estudio. No obstante, son necesarios más estudios longitudinales para conocer y entender mejor estas asociaciones y valorar la potencial importancia de este tema en salud pública.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Profesores J. Vioque y E.M. Navarrete-Muñoz la valoración de la ingesta alcohólica a través del cuestionario de frecuencia alimentaria (CFA) y el apoyo de las siguientes entidades para la consecución de este trabajo: Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología, Región de Murcia (08808/PI/08) y Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (PI10/00985).

BIBLIOGRAFÍA

1. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992; 305:609-13.
2. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ. Health Perspect*. 2000;108(10):961-6.
3. Rolland M, Le Moal J, Wagner V et ál. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum. Reprod*. 2013; 28(2):462-70.
4. Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, et ál. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology* 2013; 1(3):408-13.
5. Bonde JP, Ramlau-Hansen CH, Olsen J. Trends in sperm counts: the saga continues. *Epidemiology* 2011; 22(5):617-9.
6. Braga DP, Halpern G, Figueira Rde C, et ál. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil. Steril*. 2012; 97(1):5-9.
7. Gaskins AJ, Mendiola J, Afeiche M, et ál. Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men. *Br. J. Sports. Med*. Published Online First: [12/11/2014] doi:10.1136/bjsports-2012-091644.
8. Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, et ál. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. *Hum. Reprod*. 2012; 27(9):2807-14.
9. Mendiola J, Meeker JD, Jørgensen N, et ál. Urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: pooled analysis of fertile and infertile men. *J. Androl*. 2012; 33(3):488-98.
10. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J. Pathol. Microbiol*. 2010; 53(1):35-40.
11. Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: reproductive health consequences and clinical implications. *Crit. Rev. Toxicol*. 2010; 40(7):633-52.
12. Pajarinen J, Karhunen PJ, Savolainen V, et ál. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 1996;20(2):332-7.
13. Kalyani R, Basavaraj PB, Kumar ML. Factors influencing quality of semen: a two year prospective study. *Indian J Pathol. Microbiol*. 2007; 50(4):890-5.
14. Joo KJ, Kwon YW, Myung SC, Kim TH. The effects of smoking and alcohol intake on sperm quality: light and transmission electron microscopy findings. *J. Int. Med. Res*. 2012; 40(6):2327-35.
15. Oldereid NB, Rui H, Purvis K. Life styles of men in barren couples and their relationship to sperm quality. *Int. J. Fertil*. 1992; 37(6):343-9.
16. Goverde HJ, Dekker HS, Janssen HJ, et ál. Semen quality and frequency of smoking and alcohol consumption--an explorative study. *Int. J. Fertil. Menopausal. Stud*. 1995; 40(3):135-8.
17. Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum. Reprod*. 1998;13(12): 3394-8.

18. Marinelli D, Gaspari L, Pedotti P, Taioli E. Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2004; 207(3):185-92.
19. Martini AC, Molina RI, Estofán D, et ál. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil. Steril.* 2004; 82(2):374-7.
20. De Jong AM, Menkveld R, Lens JW, et ál. Effect of alcohol intake and cigarette smoking on sperm parameters and pregnancy. *Andrologia.* 2011;589-96.
21. Povey AC, Clyma JA, McNamee R, et ál. Participating Centres of Chaps-uk. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study. *Hum. Reprod.* 2012; 27(9):2799-806.
22. WHO. Global status report on alcohol and health. World Health Organization, Geneva. 2011.
23. WHO. Mortality and burden of disease estimates for WHO member states in 2004. World Health Organization, Geneva. 2009.
24. WHO. Regional Office for Europe: European Action Plan to reduce the harmful use of alcohol in 2012-2020. Copenhagen, Denmark. 2011.
25. De Kretser DM. Male infertility. *The Lancet.* 1997; 349:787-90.
26. Enzo Devoto C, Marcia Madariaga A, Ximena Lioi C. Causes of male infertility. The contribution of endocrine factors. *Rev. Méd. Chile* 2000; 128(2):184-92.
27. Van Thiel DH, Gavaler JS, Cobb CF, et ál. Ethanol, a Leydig cell toxin: evidence obtained in vivo and in vitro. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1983; 18(Suppl. 1):317-23.
28. Tsujimura A, Matsumiya K, Takahashi T, et ál. Effect of lifestyle factors on infertility in men. *Arch. Androl.* 2004; 50(1):15-7.
29. Gerhard I, Lenhard K, Eggert-Kruse W, Runnebaum B. Clinical data which influence semen parameters in infertile men. *Hum. Reprod.* 1992; 7(6):830-7.
30. Vine MF, Setzer RW Jr, Everson RB, Wyrobek AJ. Human sperm morphometry and smoking, caffeine, and alcohol consumption. *Reprod. Toxicol.* 1997; 11(2-3):179-84.
31. Donnelly GP, McClure N, Kennedy MS, Lewis SE. Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. *Andrologia.* 1999; 31(1):43-7.
32. Hansen ML, Thulstrup AM, Bonde JP, et ál. Does last week's alcohol intake affect semen quality or reproductive hormones? A cross-sectional study among healthy young Danish men. *Reprod. Toxicol.* 2012; 34(3):457-62.
33. Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil. Steril.* 2005; 84(4):919-24.
34. López Teijón M, Garcia F, Serra O, et ál. Semen quality in a population of volunteers from the province of Barcelona. *Reprod. Biomed. Online.* 2007; 15(4):434-44.
35. Willett WC, Sampson L, Stampfer MJ, et ál. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am. J. Epidemiol.* 1985; 122:51-65.
36. Vioque J. Validez de la evaluación de la ingesta dietética. In Serra-Majem L, Aranceta J y Mataix J (eds) *Nutrición y Salud Pública. Métodos, Bases Científicas y Aplicaciones.* Masson, Barcelona, Spain. 1995.
37. Willett W, Lenart E. Reproducibility and validity of food frequency Questionnaires. In: Willett W, editor. *Nutritional epidemiology.* 3ª edn. New York: Oxford University Press; p. 96-141. 2013.
38. Vioque J, Weinbrenner T, Asensio L, et ál. Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects. *Br. J. Nutr.* 2007; 97:977-86.
39. Palma I, Farran P, Cervera P. *Tablas de composición de Alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España: CESNID.* 4th edn, 2008. McGraw Hill, Spain.
40. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service 2010 National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. *Nutrient Data Laboratory,* 2010. [Citado en: 23 de enero de 2014] Accesible en: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
41. WHO. World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn, WHO Press, Geneva, Switzerland. 2010.
42. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, et ál. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum. Reprod.* 1990; 5:586-92.
43. Weng HY, Hsueh YH, Messam LL, Hertz-Picciotto I. Methods of covariate selection: directed acyclic graphs and the change-in-estimate procedure. *Am. J. Epidemiol.* 2009; 169:1182-90.
44. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res.* 2009; 129(4):357-67.
45. Crispo JA, Ansell DR, Piche M, et ál. Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2010; 88(4):429-38.
46. Basli A, Soulet S, Chaher N, et ál. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012; 2012: 805762.
47. Rodríguez-Martos A, Gual A, Llopis JJ. La unidad de bebida estándar como registro simplificado del consumo de bebidas alcohólicas y su determinación en España, *Medicina Clínica* 1999; 112(12):446-50.
48. Echeburúa E. *Abuso de Alcohol.* Madrid. ES: Síntesis. 2001.
49. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Tenth special report to the US Congress on alcohol and health. Bethesda MD: National Institutes of Health; 2000.

- 
50. Chia SE, Lim ST, Tay SK, Lim ST. Factors associated with male infertility: a case-control study of 218 infertile and 240 fertile men. *BJOG* 2000; 107(1):55-61.
 51. Carlsen E, Swan SH, Petersen JH, Skakkebaek NE. Longitudinal changes in semen parameters in young Danish men from the Copenhagen area. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 942-9.
 52. Stokes-Riner A, Thurston SW, Brazil C, et al. One semen sample or 2? Insights from a study of fertile men. *J. Androl.* 2007; 28(5):638-43.
 53. Guxens M, Ballester F, Espada M, et al; INMA Project. Cohort Profile: the INMA--Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *Int. J. Epidemiol.* 2012; 41(4):930-40.