

## Determinantes asociados a la variabilidad del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en varones sanos: un estudio de seguimiento

### *Determinants associated with the variability of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation index in healthy men: A follow-up study*

### *Determinantes associados à variabilidade do índice de fragmentação do ácido desoxirribonucleico espermático em homens saudáveis: um estudo de seguimento*

Consuelo Pérez-Palazón<sup>1,2</sup>, José J. López-Espín<sup>3</sup>, José Damián Román-Arias<sup>1</sup>, Jaime Mendiola<sup>2,4</sup>, Alberto M. Torres-Cantero<sup>2,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Centro Ginecológico de Reproducción y Genética, Murcia.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Operativa. Universidad Miguel Hernández, Elche.

<sup>4</sup>CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), ISCIII, Madrid.

<sup>5</sup>Campus Regional de Excelencia "Mare Nostrum", Universidad de Murcia, Murcia.

<sup>6</sup>Servicio de Medicina Preventiva, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia.

**Cita:** Pérez-Palazón C, López-Espín JJ, Román-Arias JD, Mendiola J, Torres-Cantero AM. Determinantes asociados a la variabilidad del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en varones sanos: un estudio de seguimiento. Rev. salud ambient. 2016;16(1):25-32.

**Recibido:** 20 de octubre de 2015. **Aceptado:** 21 de marzo de 2016. **Publicado:** 15 de junio de 2016.

**Autor para correspondencia:** Consuelo Pérez Palazón.

Correo e: [mreproductivac@gmail.com](mailto:mreproductivac@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:** Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (FIS) (PI10/00985); Fundación Séneca de la Región de Murcia (08808/PI/08); y Centro Ginecológico de Reproducción y Genética S.L.

**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

El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático en una cohorte de varones sanos y analizar los factores asociados a dicha variabilidad, incluyendo hábitos de vida y exposiciones ambientales. Se trata de un estudio prospectivo llevado a cabo durante 1 año evaluando múltiples muestras seminales (obtenidas aproximadamente cada 4-6 semanas) procedentes de 19 varones voluntarios sanos. Los sujetos cumplieron encuestas epidemiológicas sobre hábitos de vida y exposiciones ambientales en cada una de las entrevistas. Los individuos se clasificaron en dos grupos según sus respuestas acerca de determinados hábitos de vida o exposiciones ambientales ("sí" vs. "no"). Se calculó el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de variación intraindividual (CVi) del índice de fragmentación del ADN espermático y se examinaron sus diferencias estadísticas con respecto a sus respuestas a los factores estudiados. Los CV del índice de fragmentación del ADN espermático fueron significativamente distintos para todas las variables estudiadas, a excepción de la exposición a tóxicos ambientales (similar CV) y el ejercicio físico ligero (similar CVi). Dicho índice también se relacionó positivamente con el número de horas empleadas en actividades sedentarias (p-valor = 0,05). Como ocurre con el análisis de los parámetros seminales convencionales, un único análisis de fragmentación del ADN espermático podría ser poco fiable para determinar dicho parámetro en el varón. Este estudio muestra que determinados factores o características del varón podrían estar relacionadas con una mayor o menor variabilidad de su índice de fragmentación del ADN espermático.

**Palabras clave:** Coeficiente de variación; exposiciones medioambientales; fragmentación del ADN espermático; hábitos de vida.

## Abstract

The aim of this work was to study the variability of the sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in a cohort of healthy men and to analyze the determinants and associated factors related to that variability, including sexual habits, lifestyle and environmental exposures. This is a prospective study which was carried out for 1 year evaluating multiple semen samples (obtained approximately every 4-6 weeks) from 19 healthy male volunteers. The subjects completed epidemiological questionnaires on lifestyle and environmental exposures in each of the interviews. Individuals were divided into two groups depending on their responses to several lifestyle and environmental exposure questions ("yes" vs. "no"). The coefficient of variation (CV) and the intra-subject coefficient of variation (CVi) of the sperm DNA fragmentation index were calculated and their statistical differences examined with regard to their responses to the studied factors. The CVs of the the sperm DNA fragmentation index were significantly different for all the studied variables, with the exception of the exposure to environmental toxicants (similar CV) and light physical exercise (similar CVi). That index was also positively correlated to the number of hours spent doing sedentary activities ( $p$ -value = 0.05). As with the analysis of conventional semen parameters, a single analysis of the sperm DNA fragmentation might be scarcely reliable to determine that parameter in men. Our study shows that certain male factors or characteristics may be related to a higher or lower variability of the sperm DNA fragmentation index.

**Keywords:** Coefficient of variation; environmental exposures; sperm DNA fragmentation; lifestyle.

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade do índice de fragmentação do ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático numa coorte de homens saudáveis e analisar os fatores associados a essa variabilidade, incluindo estilos de vida e exposições ambientais. Este é um estudo prospectivo, realizado por 1 ano, avaliando várias amostras de sêmen (obtidas aproximadamente a cada 4-6 semanas) a partir de 19 voluntários saudáveis do sexo masculino. Os sujeitos preencheram questionários epidemiológicos sobre estilos de vida e exposição a fatores ambientais em cada uma das entrevistas. Os indivíduos foram classificados em dois grupos de acordo com suas respostas sobre determinados estilos de vida ou exposições ambientais ("sim" vs. "não"). Calculou-se o coeficiente de variação (CV) e o coeficiente de variação intra-individual (CVI) do índice de fragmentação do ADN do esperma e analisaram-se as diferenças estatísticas relativamente às respostas aos fatores estudados. Os VC do índice de fragmentação do ADN do esperma foram significativamente diferentes para todas as variáveis estudadas, com exceção da exposição a tóxicos ambientais (CV similar) e do exercício físico ligeiro (VCi similar). O índice também se relacionou positivamente com o número de horas gastas em atividades sedentárias (valor- $p$  = 0,05). Tal como acontece com a análise dos parâmetros seminais convencionais, uma única análise de fragmentação de ADN espermático pode ser pouco fiável para determinar este parâmetro no homem. Este estudo mostra que determinados fatores ou características do indivíduo podem estar relacionados com uma maior ou menor variabilidade do seu índice de fragmentação do ADN espermático.

**Palavras-chave:** Coeficiente de variação; exposições ambientais; fragmentação do ADN espermático; estilos de vida.

## INTRODUCCIÓN

Un genoma espermático en buen estado es esencial para la capacidad reproductiva del varón<sup>1</sup>. En la última década, diversos estudios han establecido una relación entre las roturas en la cadena del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los espermatozoides y los problemas de infertilidad masculina<sup>2-6</sup>.

Enfermedades o exposiciones como el cáncer<sup>7</sup>, las radiaciones o la quimioterapia<sup>8,9</sup>, el aumento de la temperatura escrotal<sup>10</sup>, el tabaco<sup>11-15</sup>, la contaminación del aire<sup>16</sup>, o los plaguicidas<sup>17-19</sup>, provocan daño en la estructura de la cromatina espermática<sup>20</sup>. La exposición ambiental a otras sustancias o compuestos como pegamentos, disolventes, siliconas, plásticos o metales, entre otros, se ha relacionado con la infertilidad masculina<sup>21</sup>, aunque no se conoce bien su influencia o posible efecto sobre

la fragmentación del ADN espermático. Otros factores estudiados por su posible relación con la fragmentación del ADN espermático son por ejemplo el ejercicio físico<sup>22</sup>, el consumo de alcohol<sup>15,23</sup> o la cafeína<sup>24</sup>. Los hábitos sexuales reflejados en la frecuencia de eyaculación o la abstinencia sexual podrían influir en el índice de fragmentación del ADN espermático<sup>25,26</sup>.

Diversos autores coinciden en que la evaluación de la integridad del ADN espermático se considera un buen indicador de la calidad seminal y de la capacidad reproductiva masculina, y se trata de un estudio complementario de utilidad en la evaluación de los parámetros de recuento, movilidad y morfología espermática<sup>27-30</sup>.

La variabilidad intraindividual en los parámetros seminales tradicionales<sup>31-35</sup> es bien conocida, pero

apenas se ha estudiado con respecto a la fragmentación del ADN espermático. Estudios previos sugieren que la variabilidad del índice de fragmentación de ADN espermático es menor que la de los parámetros seminales tradicionales<sup>36,37</sup>. Otros autores, no obstante, describen una moderada variabilidad del índice de fragmentación de ADN espermático entre varias muestras seminales en varones potencialmente infértiles<sup>38,39</sup>.

Una elevada variación del índice de fragmentación del ADN espermático intraindividual sería relevante para la evaluación clínica del varón, al dificultar el diagnóstico de su capacidad fértil a partir de una única muestra. Además, de existir una variabilidad importante en la medida del daño del ADN espermático sería conveniente conocer qué factores están relacionados con dicha variación. El objetivo de este trabajo es estudiar la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático en una cohorte de varones sanos y analizar los factores o determinantes asociados a dicha variabilidad, incluyendo hábitos de vida y exposiciones ambientales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### POBLACIÓN DE ESTUDIO Y CUESTIONARIOS

Se trata de un estudio prospectivo y de seguimiento que se llevó a cabo evaluando muestras seminales procedentes de varones voluntarios y sanos que contactaron o acudían a un centro de reproducción humana ubicado en la ciudad de Murcia (España). Se reclutaron 24 varones (16 por su interés en el programa de donación de semen y 8 sujetos parejas de pacientes de ginecología, no de fertilidad, de la propia clínica), de los cuales se excluyeron 5 (1 por azoospermia y 4 por abandono voluntario del estudio). Finalmente se realizó un seguimiento de la calidad seminal de 19 individuos (18-40 años) durante un periodo de 1 año (2012/13) para registrar la variabilidad de la integridad del ADN espermático en cada uno. De ellos, 11 tenían fertilidad probada (hijos/as) y 8 no presentaban descendencia, principalmente porque aún no habían considerado la posibilidad de paternidad. Las recogidas de muestras seminales fueron aproximadamente cada 4-6 semanas y los varones cumplimentaron encuestas epidemiológicas sobre datos demográficos, exposiciones medioambientales y hábitos de vida, y se sometieron a una exploración andrológica. Cada participante aportó entre 6 y 14 muestras seminales (un sujeto: 6 muestras; un sujeto: 7 muestras; un sujeto: 12 muestras; un sujeto: 14 muestras, y 15 sujetos: 10 muestras seminales) repartidas durante un periodo de 12 meses. El número total de muestras seminales analizadas fue de 189, de las cuales 46 fueron de

donantes y 143 del resto de sujetos. Los participantes fueron recompensados por su participación con una tarjeta regalo de 100 €. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes y la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia aprobó este estudio. Todos los sujetos realizaron un cuestionario inicial que incluyó datos sobre edad, nivel de estudios, ocupación, antecedentes clínicos previos y actuales, desarrollo sexual, estilo de vida, hábitos sexuales y situaciones extraordinarias en los 3 meses anteriores al inicio del estudio. Posteriormente, tras cada obtención de muestra, los varones cumplimentaban encuestas de seguimiento registrando datos de estilos de vida, exposiciones medioambientales y hábitos sexuales durante las 4 semanas previas.

### ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y EXPLORACIÓN FÍSICA

Todas las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en un frasco estéril de plástico de boca ancha (Deltalab 150 mL PP B/I) etiquetado y atemperado a temperatura ambiente, en la sala para obtención de muestras del centro de reproducción humana. El tiempo de abstinencia se registró como el número de horas desde la obtención de la muestra hasta la eyaculación anterior. En cada análisis, los sujetos informaban de la frecuencia de eyaculación en los 15 días previos. Las muestras seminales se analizaron siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud<sup>31</sup>. Todas las muestras se atemperaron a 37 °C y se licuaron dentro de los 30 minutos post-eyaculación. Una vez licuada cada muestra seminal, inmediatamente se congeló una alícuota en criotubos (CryoTube Vials 4,5 mL Thermo Scientific) sin crioprotector a -20 °C, y posteriormente fueron almacenados en un congelador a -80 °C hasta su análisis<sup>40</sup>. Se descongelaron las alícuotas con los espermatozoides mediante inmersión 30 s en agua a 37 °C. En algunos casos, fue necesario, diluir con PBS hasta una concentración de 5-10\*10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Inmediatamente tras la descongelación, se procesaron las muestras según el test Halotech Dna (Halosperm) basado en la técnica SCD (Sperm Chromatin Dispersion)<sup>41,42</sup>. Tras el procesamiento de las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (SYBR®Green II RNA Gel Stain, Invitrogen™, Life Technologies Corporation, Paisley, Reino Unido). El índice de fragmentación se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados. En cada alícuota se estudiaron 300 espermatozoides. La misma bióloga especializada realizó todos los análisis microscópicos (CP-P). En la exploración física se recogieron datos

antropométricos y se evaluó el tamaño testicular usando un orquidómetro de Prader (Andrology Australia, Clayton, Victoria, Australia) y la presencia o no de varicocele u otras anomalías escrotales.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis descriptivos sobre características demográficas, examen físico y fragmentación del ADN espermático. Se calculó el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de variación intraindividual (CVi) de los datos diferenciado por grupos de interés según variables relativas a hábitos de vida y exposiciones ambientales. Además, se estudió la significación estadística de la diferencia de resultados entre los grupos mediante la prueba de Miller y Feltz<sup>43</sup>. Para distinguir grupos de interés se utilizaron las variables independientes dicotómicas (sí/no): tabaquismo, consumo de vino, cerveza, café, o licores, exposición a tóxicos o contaminantes, estrés, práctica de ejercicio ligero, moderado o intenso y de ejercicio moderado/intenso conjuntamente. Tabaquismo, consumo de vino, cerveza, licores y café, reflejaban la exposición durante el mes anterior a alguna de estas sustancias. Se registró el número de cigarrillos, número de copas de vino y licores, número de tercios de cerveza, y el número de tazas de café semanales. En cuanto a la exposición a tóxicos o contaminantes se consideró el contacto (al menos 1 hora a la semana) con sustancias tales como metales, plaguicidas, pinturas, disolventes, desengrasantes u otros. Las variables de consumo se separaron por la mediana, y se consideró al sujeto en el grupo del "sí" si registró más de la mitad de las respuestas afirmativas en los cuestionarios de seguimiento (consumidor habitual o regular), excepto para la exposición a tóxicos o contaminantes, en la cual se consideró al sujeto en el grupo del "sí" si había estado en contacto en alguna ocasión durante el periodo de estudio con estas sustancias. En el caso del estrés, se tuvieron en cuenta los acontecimientos personales, familiares, y situaciones difíciles experimentadas durante el mes previo. Se consideró un sujeto sometido a estrés al responder a 2 o más preguntas afirmativamente (de las 8 presentes en el cuestionario)<sup>44</sup> más del 50 % de las veces en dichos cuestionarios (estrés habitual o regular). Con respecto a la actividad física, se expresó en 3 niveles: intensa (ejercicio extremo que es muy fatigoso o sudoroso), moderada (ejercicio que produce cierta fatiga y sudoración), y ligera (que no produce mucha fatiga o sudoración), midiendo las horas semanales para cada nivel de intensidad, durante el último mes. Igualmente, se consideró que un sujeto realizaba o no un tipo de ejercicio concreto si respondió afirmativamente a más del 50 % de las veces

durante el seguimiento (ejercicio habitual o regular). Las actividades sedentarias se registraron según el número medio de horas semanales que el sujeto permanecía sentado (viendo la TV, vídeo o DVD, frente al ordenador, conduciendo, etc.) durante el último mes. Se estudió la frecuencia de eyaculación considerando el número de eyaculaciones en los 15 días previos y el tiempo de abstinencia sexual previo a la recogida de la muestra seminal registrado en número de horas. Las relaciones existentes entre variables continuas se analizaron mediante la correlación de Spearman. Todas las pruebas fueron de 2 colas y el nivel de significación estadística se fijó en 0,05. Para la realización de los análisis estadísticos se empleó el paquete estadístico SPSS 21.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE. UU.).

#### RESULTADOS

En la tabla 1 observamos el resultado de los CV y CVi para el índice de fragmentación del ADN espermático en relación con los distintos hábitos de vida (tabaquismo, consumo de alcohol, consumo de café, exposición a tóxicos o contaminantes, estrés y ejercicio físico). Los CV difieren significativamente para todas las variables estudiadas, a excepción de la exposición a tóxicos ambientales. Por otro lado, los individuos que realizan ejercicio intenso o moderado-intenso y los individuos expuestos a tóxicos o contaminantes presentan los CVi más bajos (34,1 %; 34,5 % y 37,5 % respectivamente), mientras que los fumadores, o consumidores habituales de cerveza o licores mostraron mayores CVi. Los consumidores de vino o café, o sometidos a estrés, expuestos a tóxicos, que practican ejercicio intenso o moderado-intenso mostraron significativamente menores CVi que los que no presentaban ninguna de estas características. En general, hubo diferencias significativas en el CVi entre ambos grupos de sujetos para todas las variables estudiadas, excepto para la práctica de ejercicio ligero.

La tabla 2 muestra la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y las características sexuales y hábitos sedentarios de los sujetos. Los resultados no mostraron una correlación significativa (p-valor = 0,08 y 0,77) al comparar con la abstinencia sexual y la frecuencia de eyaculación, respectivamente. Sin embargo, en relación a los hábitos sedentarios, los resultados mostraron un coeficiente de correlación significativo (p-valor = 0,05), mostrando una relación positiva entre el número de horas viendo TV, etc. y el índice de fragmentación del ADN espermático.

Tabla 1. Coeficiente de variación (CV) y CV intraindividual (CVi) del índice de fragmentación de ADN espermático relacionado con las distintas características o hábitos de vida

VARIABLES		CV	p-valor	CVi	p-valor
TABAQUISMO	SÍ	47,56 %	< 0,001	50,56 %	< 0,001
	NO	53,43 %		42,73 %	
CONSUMO DE VINO	SÍ	47,41 %	< 0,001	44,11 %	< 0,001
	NO	52,83 %		49,04 %	
CONSUMO DE CAFÉ	SÍ	50,28 %	< 0,001	44,18 %	< 0,001
	NO	52,81 %		53,95 %	
CONSUMO DE CERVEZA	SÍ	49,57 %	< 0,001	47,56 %	< 0,001
	NO	52,71 %		45,06 %	
CONSUMO DE LICORES	SÍ	46,14 %	< 0,001	49,02 %	< 0,001
	NO	52,78 %		45,50 %	
EXPOSICIÓN A TÓXICOS O CONTAMINANTES	SÍ	50,90 %	0,34	37,51 %	< 0,001
	NO	51,27 %		52,84 %	
ESTRÉS	SÍ	44,67 %	< 0,001	41,39 %	< 0,001
	NO	51,43 %		51,60 %	
PRÁCTICA DE EJERCICIO INTENSO	SÍ	50,59 %	0,01	34,14 %	< 0,001
	NO	52,21 %		51,37 %	
PRÁCTICA DE EJERCICIO MODERADO	SÍ	49,23 %	< 0,001	43,87 %	< 0,001
	NO	55,87 %		48,18 %	
PRÁCTICA DE EJERCICIO LIGERO	SÍ	53,75 %	< 0,001	47,79 %	0,08
	NO	51,86 %		47,01 %	
PRÁCTICA DE EJERCICIO MODERADO-INTENSO	SÍ	50,42 %	< 0,001	34,54 %	< 0,001
	NO	53,92 %		52,84 %	

Tabla 2. Correlación entre hábitos sexuales y sedentarios y el índice de fragmentación del ADN espermático

Variable	ÍNDICE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	
	r	p-valor
FRECUENCIA DE EYACULACIÓN	0,025	0,77
TIEMPO DE ABSTINENCIA	-0,132	0,08
HÁBITOS SEDENTARIOS	0,151	0,05

## DISCUSIÓN

Hasta donde conocemos este es el primer trabajo de seguimiento realizado en el sur de Europa para estudiar la variabilidad de la fragmentación del ADN espermático en varones sanos, y el primero que estudia su relación con sus hábitos de vida y exposiciones ambientales. Los resultados de nuestro estudio son consistentes con

estudios previos que muestran una variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático superior al 30 %<sup>38,39</sup> y por tanto, equiparable a la variabilidad intraindividual existente en los parámetros seminales tradicionales<sup>32-35</sup>, lo cual contradice a otros autores que consideran la medición del índice de fragmentación del ADN espermático más estable que otros parámetros seminales, como movilidad, concentración, etc.<sup>36,37</sup>.

Hasta donde conocemos, son escasos los estudios que han relacionado los hábitos de vida con el índice de fragmentación del ADN espermático. Por ejemplo, un estudio experimental realizado en ratones macho mostró que la realización de ejercicio combinado con dieta disminuía el daño al ADN espermático<sup>22</sup>. En estudios observacionales, algunos autores han relacionado un mayor índice de fragmentación del ADN espermático con el tabaquismo<sup>11-15</sup>, con el aumento de la temperatura escrotal<sup>10</sup> o con la exposición a plaquicidas<sup>17-19</sup>. Los hallazgos conocidos sobre la relación entre el consumo de alcohol y los problemas de infertilidad masculinos son todavía poco concluyentes<sup>23</sup>. Se ha mostrado que el alcohol causa un aumento del estrés oxidativo, y esto a su vez podría afectar a los parámetros seminales, pero todavía no se conocen bien los mecanismos relacionados con este proceso<sup>15,23</sup>. Sin embargo, el consumo de cafeína sí se ha asociado con índices relativamente menores de fragmentación del ADN espermático<sup>24</sup>.

En nuestro estudio se observó que los CV del índice de fragmentación del ADN espermático fueron significativamente distintos para todas las variables estudiadas, a excepción de la exposición a tóxicos ambientales (similar CV) y el ejercicio físico ligero (similar CVi). Con respecto a las exposiciones ambientales a tóxicos, cabe señalar que existe un número muy bajo de dichas exposiciones entre los varones participantes, lo cual podría influir en gran manera en la ausencia de significación estadística en esta variable, por lo que dicho resultado debe ser tomado con cautela. Con referencia al ejercicio físico ligero, podríamos argumentar que la realización o no de este tipo de ejercicio no es determinante para la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático en los varones, y es concordante con resultados similares publicados con respecto a los parámetros seminales convencionales (concentración, movilidad, etc.)<sup>45</sup>.

Respecto a la influencia de otros factores en el índice de fragmentación del ADN espermático, como los hábitos sexuales, los resultados no mostraron una correlación significativa. No obstante, estudios previos indican que un aumento en la frecuencia de eyaculación (cada 24 horas) y un menor tiempo de abstinencia sexual (entre 3 y 24 horas) podrían disminuir el nivel de fragmentación de ADN espermático<sup>25,26</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio, el número de horas de sedentarismo sí se relacionó positiva y significativamente con el índice de fragmentación del ADN espermático.

Hasta donde conocemos, ningún trabajo anterior ha estudiado la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático en relación con los hábitos de vida

y exposiciones ambientales. Los resultados obtenidos permiten establecer una primera asociación entre dichos factores y la variabilidad del índice de fragmentación del ADN espermático, y son consistentes con los resultados obtenidos en otro estudio previo, que muestra la existencia de una relación entre los hábitos de vida y la variabilidad de los parámetros seminales convencionales<sup>35</sup>.

No obstante, no podemos descartar totalmente que otros factores o la combinación de varios, pudieran estar influyendo en la variabilidad de dicho parámetro. Las limitaciones del presente estudio también son las inherentes a cualquier estudio observacional, con lo cual no se puede inferir causalidad de los resultados obtenidos. Un sesgo de información (recuerdo) podría existir *a priori*, pero el periodo sobre el que se preguntaba eran unas pocas semanas atrás y los participantes desconocían qué relaciones se iban a investigar con respecto a sus hábitos de vida o exposiciones ambientales. Además, cabría señalar que no se midieron biomarcadores de estrés fisiológico o del estatus antioxidante, así como la diferenciación entre ejercicio aeróbico y anaeróbico. Son parámetros que recomendamos encarecidamente investigar en futuros estudios. De esta forma, hacemos hincapié en que nuestros resultados deben ser tratados con cautela y la necesidad de nuevos estudios (incluyendo parámetros analíticos) que confirmen estos hallazgos.

## CONCLUSIÓN

El índice de fragmentación del ADN espermático presenta una considerable variabilidad (CV e CVi), que coincide con hallazgos encontrados en estudios previos<sup>38,39</sup>. Desde un punto de vista clínico, un único análisis de fragmentación del DNA espermático podría ser poco fiable para determinar el diagnóstico de fertilidad o infertilidad, al igual que ocurre con el análisis de los parámetros seminales tradicionales<sup>33,35</sup>. No obstante, serían conveniente realizar más estudios sobre la asociación entre los hábitos de vida y la fragmentación del ADN espermático, especialmente con el fin de esclarecer una posible relación con la actividad física o la exposición a tóxicos y contaminantes ambientales. En definitiva, este estudio muestra que determinados factores o características del varón podrían estar relacionadas con una mayor o menor variabilidad de su índice de fragmentación de ADN espermático.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por las siguientes organismos o entidades: Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (FIS) (PI10/00985); Fundación Séneca de la Región de Murcia (08808/PI/08); y Centro Ginecológico de Reproducción y Genética S.L.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Spanò M, Bonde JP, Hjollund HI, et ál. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.* 2000; 73:43-50.
2. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, et ál. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J. Androl.* 2006; 8:11-29.
3. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Biomed. Online* 2006; 12:466-72.
4. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 2007; 14:746-57.
5. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful?. Pros and cons. *J. Androl.* 2009; 30:219-29.
6. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril.* 2010; 93:1027-36.
7. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, et ál. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum. Reprod.* 2008; 23:1044-52.
8. Fosså SD, De Angelis P, Kraggerud SM, et ál. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* 1997; 30:192-6.
9. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int. J. Androl.* 2002; 25:255-61.
10. Zhang MH, Shi ZD, Yu JC, et ál. Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-specific proteinases 3 changes in fertile men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32:747-55.
11. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, et ál. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat. Res.* 1999; 423:103-11.
12. Vilorio T, Garrido N, Fernández JL, et ál. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil. Steril.* 2007; 88(2):523-5.
13. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, et ál. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; 223(1-2):54-60.
14. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, et ál. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* 2012; 80(4):822-5.
15. Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, et ál. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2014; 290(4):777-82.
16. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, et ál. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum. Reprod.* 2005; 20:2776-83.
17. Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B, et ál. The effect of environmental exposure to pyrethroids and DNA damage in human sperm. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2015; 61(1):37-43.
18. Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, et ál. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 196:108-13.
19. Jamal F, Haque QS, Singh S, Rastogi S. The influence of organophosphate and carbamate on sperm chromatin and reproductive hormones among pesticide sprayers. *Toxicol. Ind. Health.* 2015. pii: 0748233714568175.
20. O'Flaherty C. Iatrogenic genetic damage of spermatozoa. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 791:117-35.
21. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, et ál. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod. Biomed. Online* 2008; 16(6):842-50.
22. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, et ál. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012; 302(7):768-80.
23. Koch OR, Pani G, Borrello S, et ál. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol. Aspects Med.* 2004; 25(1-2):191-8.
24. Belloc S, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, et ál. Caffeine intake and sperm parameters. Analysis of a cohort of 4474 consecutive semen samples. *Fertil. Steril.* 2013; 100(3):S212.
25. Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, et ál. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil. Steril.* 2011; 96:1083-6.
26. Sánchez-Martín P, Sánchez-Martín F, González-Martínez M, Gosálvez J. Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2013; 59:256-60.
27. Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, et ál. Evaluation of the quality of the human spermatozoon: comparison between spermatid DNA integrity and semen variables. *Invest. Clin.* 2010; 51:87-99.
28. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et ál. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* 2007; 22:174-9.
29. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et ál. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int. J. Androl.* 2010; 33:e221-7.
30. Evgeni E, Lymberopoulos G, Gazouli M, Asimakopoulos B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2015; 188:17-23.

31. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization; 2010.
32. Álvarez C, Castilla JA, Martínez L, et ál. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum. Reprod.* 2003; 18:2082-8.
33. Keel BA. Within- and between- subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil. Steril.* 2006; 85:128-34.
34. Francavilla F, Barbonetti A, Necozione S, et ál. Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. *Int. J. Androl.* 2007; 30:174-81.
35. Pérez-Palazón C, López-Espín JJ, Mendiola J, et ál. Factores asociados a la variabilidad de la calidad seminal: un estudio de seguimiento. *Rev. Int. Androl.* 2016;14(1):1-7. Datos actualizados.
36. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, et ál. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Toxicol.* 1991; 5:115-25.
37. Smit M, Dohle GR, Hop WC, et ál. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int. J. Androl.* 2007; 30:48-55.
38. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, et ál. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum. Reprod.* 2006; 21:2061-4.
39. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples. *Hum. Reprod.* 2011; 26:3244-8.
40. Sarabia-Cos L, Areñse-Gonzalo JJ, Mínguez-Alarcón L, et ál. Estudio de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en jóvenes varones. *Rev. Int. Androl.* 2015; 13(1):1-7.
41. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, et ál. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 2003; 24:59-66.
42. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, et ál. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.* 2005; 84:833-42.
43. Martín Andrés A, Luna del Castillo JD. *Bioestadística para las ciencias de la salud.* Madrid: A. Capitel Editores. 2004.
44. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, et ál. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil. Steril.* 2010; 93:1104-11.
45. Mínguez-Alarcón L, Chavarro JE, Mendiola J, et ál. Physical activity is not related to semen quality in young healthy men. *Fertil Steril.* 2014 Oct; 102(4):1103-9.