

UNIVERSITAT POMPEU FABRA

# EL TABACO Y LA REPRODUCCIÓN MASCULINA

---

## Trabajo de Fin de Grado


Alexandra López Martín

21/06/2013


Trabajo supervisado y autorizado por:

Beatriz Carrasco

Gemma Arroyo



Beatriz  
Carrasco



Gemma  
Arroyo

## ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	2
3. Metodología.....	3
4. Parámetros seminales.....	4
a. Concentración.....	6
b. Movilidad.....	6
i. Movilidad total.....	7
ii. Movilidad progresiva.....	7
c. Morfología.....	8
d. Discusión.....	8
5. Hormonas reproductoras.....	10
a. Testosterona total.....	11
b. Testosterona libre.....	11
c. Hormona foliculoestimulante.....	12
d. Hormona luteinizante.....	12
e. Globulina sexual transportadora de hormonas.....	12
f. Discusión.....	12
6. Fragmentación del ADN espermático.....	14
7. Mutaciones, aneuploidías y efecto en la descendencia.....	16
8. Conclusión.....	18
9. Bibliografía.....	19

## RESUMEN

Actualmente se estima la población infértil entre el 10%-15%, y el pronóstico es que vaya en ascenso; además los últimos datos muestran que en el mundo, hoy en día, existen un 47% de hombres fumadores. Por este motivo este trabajo tiene como objetivo determinar cómo afecta el hábito de fumar a la reproducción masculina, concretamente a los parámetros seminales, a las hormonas reproductoras y a la fragmentación del ADN espermático. Además, también hemos querido estudiar si el hábito de fumar provoca mutaciones y aneuploidías en la línea germinal, y si éstas, en caso de existir, pueden afectar a la descendencia.

Para realizar esta revisión, la cual integra dos meta-análisis, se han utilizado diferentes bases de datos para poder recoger y estudiar artículos epidemiológicos, clínicos y experimentales. Los resultados obtenidos, a partir de un total de 28 estudios, muestran que existe una reducción porcentual media en la concentración de espermatozoides del 12,4% en los fumadores respecto a los no fumadores, en la movilidad espermática la reducción es del 10.3% y en la morfología del 13.6%. También se ha determinado que los fumadores presentan todas las hormonas reproductoras estudiadas incrementadas y que tienen un mayor porcentaje de fragmentación del ADN espermático. Además, mostramos que el tabaco causa aneuploidías y mutaciones en las células germinales, pudiendo causar enfermedades genéticas en la descendencia, como el cáncer.

Concluimos que el hecho de no fumar o de dejar de fumar puede proporcionar beneficios en la fertilidad masculina y en la descendencia.

**Palabras clave:** espermatozoides, tabaco, reproducción masculina, infertilidad, parámetros seminales, hormonas reproductoras, fragmentación del ADN, mutaciones, aneuploidías.

## INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente un tercio de la población mundial mayor de 15 años son consumidores de tabaco, concretamente un 47% de hombres y un 12% de mujeres. Las evidencias indican que tanto en hombres como en mujeres, el tabaquismo afecta a la salud reproductiva más que el consumo de cafeína o alcohol en dosis comparables [1]. El humo del cigarrillo contiene una gran cantidad de sustancias que se reconocen como carcinógenos y mutágenos como el

polonio radiactivo, el cadmio, el benzopireno, el dimetilbenzantraceno, la dimetilnitrosamina y el naftaleno [2], estas sustancias pueden tener la capacidad de causar daño sobre la reproducción masculina, ya sea de manera directa, o indirecta a través del estrés oxidativo [3, 4, 5]. Por un lado pueden producir citotoxicidad en los espermatozoides, llegando a disminuir su concentración y su funcionalidad. También pueden afectar a los niveles de hormonas reproductoras, las cuales están muy relacionadas con la espermatogénesis, y esto podría llevar a una mala formación de los espermatozoides [6]. Estas dos posibles consecuencias son de gran interés, ya que estarían relacionadas con la infertilidad. La tasa de infertilidad actual es de aproximadamente 10%-15% en todo el mundo [7] y entre las parejas infértiles, el 35% de la infertilidad se debe al hombre y el 25% se debe tanto al factor masculino como al femenino [8]. En el caso que el problema este en el hombre, la causa se encuentra en sólo el 40% de los casos y en el resto, en un 60%, sigue siendo patológicamente desconocida [9]. Se piensa que ésta podría estar muy relacionada con el estilo de vida y los factores ambientales [2, 10]. Por este motivo, es muy interesante estudiar el tabaco. Además, los tóxicos presentes en el humo de los cigarrillos también pueden causar daño en el ADN de los espermatozoides; existe una gran variedad de estudios donde esto se analiza. Este daño podría, por un lado, tratarse de fragmentaciones en el material genético; esto conllevaría a que los espermatozoides fueran inviables o que el cigoto no llegara a desarrollarse [11, 12]. Por otro lado, el daño podría producir anomalías citogenéticas o mutaciones en la línea germinal generando la posibilidad de que se transmitieran a la descendencia, y pudiendo llegar a causar enfermedades genéticas en los hijos de padres fumadores [13, 14]. Los estudios sobre todos estos temas que se han realizado hasta el momento presentan una gran diversidad en sus resultados, por este motivo, el propósito de este trabajo es revisar la literatura para poder determinar los reales efectos del tabaquismo sobre la reproducción masculina. Así pues, la hipótesis que queremos verificar es si el hábito de fumar resulta una amenaza para la calidad seminal, los niveles de hormonas reproductoras y la integridad del ADN, además de si puede producir mutaciones y aneuploidías en las células germinales pudiendo afectar a la descendencia.

## **METODOLOGÍA**

Esta revisión incluye dos meta-análisis. El primero se ha realizado con un total de 28 estudios con el objetivo de determinar cómo afecta el humo del tabaco a la calidad seminal, concretamente a los parámetros de concentración, movilidad y morfología; y el segundo, realizado con 12 estudios, trata de determinar el efecto del hábito de fumar

sobre las hormonas reproductoras. Para realizar éstos y los demás apartados, los cuales tratan de la fragmentación del ADN y de las anomalías y mutaciones en la línea germinal, se han utilizado diferentes bases de datos para poder recoger y estudiar artículos epidemiológicos, clínicos y experimentales. Las bases de datos principales han sido: PubMed, RBMOnline y Web of Knowledge; y las revistas más destacadas: Human Reproduction, Human Reproduction Update, Fertility and Sterility, ASEBIR, SEF y la Revista Iberoamericana de Fertilidad.

En los meta-análisis se ha calculado el porcentaje de reducción en el caso de los parámetros seminales, y el porcentaje de aumento en el caso de las hormonas sexuales. El porcentaje de reducción se define como:  $((\text{número medio del parámetro seminal en hombres no fumadores} - \text{número medio del parámetro seminal en hombres fumadores}) / \text{número medio del parámetro seminal en hombres no fumadores}) \times 100$ . En el caso del porcentaje de aumento el cálculo es:  $((\text{número medio de la concentración hormonal en hombres fumadores} - \text{número medio de la concentración hormonal en hombres no fumadores}) / \text{número medio de la concentración hormonal en hombres no fumadores}) \times 100$ . Se han llevado a cabo cálculos distintos para hacer más entendedores los resultados, pero ambos nos muestran el porcentaje en que difieren los fumadores respecto a los no fumadores en las diferentes variables.

## **PARÁMETROS SEMINALES**

En esta revisión se quiere determinar la capacidad que tiene el tabaco de disminuir la calidad seminal causando daños en los espermatozoides a nivel de su concentración, movilidad y morfología; ya que se conoce que contajes bajos de esperma, afectaciones en su movimiento y en su morfología normal han sido independientemente asociados con la reducción de la fertilidad [15]. Para poder realizar este meta-análisis hemos recogido un total de 28 estudios epidemiológicos. En realidad se trataría de 25 artículos, no obstante 3 de ellos han sido divididos ya que estudiaban de manera independiente a participantes fértiles e infértiles. Los estudios recogidos representan la gran mayoría de estudios existentes entre el año 2000 y el año actual, 2013. Durante este periodo de tiempo, ninguna revisión se ha realizado con las mismas finalidades ni con la misma metodología. El último meta-análisis que estudiaba el tabaco y la reproducción masculina se realizó en 1996 por Vine *et al.* [6].

La revisión actual recoge los parámetros de concentración, movilidad total, movilidad progresiva y morfología normal en hombres que pertenecen tanto a la población general (un total de 5 estudios), a la población fértil (un total de 6 estudios) y a la población

infértil (un total de 17 estudios). Cuando hablamos de población general nos referimos a hombres sanos elegidos al azar a los que no se les ha diagnosticado si son fértiles o no.

Para poder estudiar los diferentes parámetros y determinar si pueden considerarse dentro de la normalidad, nos hemos basado en el último manual de la OMS publicado en el 2010 [16], no obstante nos gustaría remarcar que muchos de los estudios presentes fueron analizados a partir del manual anterior publicado en 1999 [17]. En el del 2010 los valores de referencia de los diferentes parámetros han resultado ser menos estrictos que en el anterior, en la siguiente tabla podemos ver las diferencias:

	<b>4ª edición (1999)</b>	<b>5ª edición (2010)</b>
<b>Concentración (10<sup>6</sup> por ml)</b>	20	15 (12-15)
<b>Móviles totales (PR + NP, %)</b>		40 (38-42)
<b>Móviles progresivos (PR, %)</b>	50	32 (31-34)
<b>Morfología (formas normales, %)</b>	15	4 (3-4)

Concretamente se observan los menores valores de referencia, es decir, por encima de estas cifras los valores de los diferentes parámetros se consideran dentro del rango normal a nivel de la calidad seminal. Como podemos contemplar en la 4ª edición no había valor de referencia para la movilidad total.

Para llevar a cabo estos 28 estudios, en todos ellos primero hubo una selección de los participantes, ya que todos aquellos con factores o trastornos que pudieran alterar los resultados fueron excluidos; en los casos que la población estudiada era infértil había un mayor número de criterios de exclusión para asegurar que se trataba de hombres con una infertilidad idiopática. El hábito de fumar se evaluó a partir de cuestionarios, y las muestras seminales fueron recogidas mediante masturbación siguiendo los criterios señalados por la OMS [16] después de un periodo entre 2 a 7 días de abstinencia sexual, con excepción de 3 artículos [17,18,19] en los cuales no se indicaban los días exactos. Al llevar a cabo el análisis seminal de la concentración, movilidad y morfología, la mayoría de estudios también se guiaron por los criterios de la OMS [16], con excepción de tres artículos [4, 20, 21] donde se usaron los criterios estrictos de Kruger para analizar la morfología de los espermatozoides. Finalmente, para llevar a cabo el análisis estadístico, el programa principal utilizado fue el SPSS, concretamente el test de la t de Student y el ANOVA. También se utilizaron el test de  $\chi^2$  y el test de Fisher. Para determinar correlaciones destacaron los tests de Pearson y Spearman.

Antes de empezar con los resultados nos gustaría puntualizar que dos artículos no fueron incluidos en el estudio aunque se habían realizado en estos últimos 13 años. Se

trata del estudio realizado por Tawadroues *et al.* [22] descartado por comparar fumadores fuertes con débiles, en lugar de fumadores con no fumadores, y el de Marczylo *et al.* [23], que se realizó únicamente con un total de 13 hombres.

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros seminales se muestran a continuación (Tabla 1):

### **Concentración**

La concentración espermática es un parámetro altamente relacionado con la fertilidad y los ratios de embarazo; se calcula como millones de espermatozoides dividido por mililitros de volumen seminal [16]. De los 28 estudios que hemos recogido y analizado, todos proporcionan información sobre la concentración media de espermatozoides en hombres fumadores y en no fumadores. Además, en todos los casos, exceptuando el estudio llevado a cabo por Hassan *et al.* [24] con pacientes infértiles, los valores de concentración están por encima de los de referencia [16]. En 25 artículos se observa una reducción de la concentración de espermatozoides en los hombres fumadores respecto a los no fumadores, de éstos, 14 presentan datos significativos ( $p < 0.05$ ). Sin tener en cuenta esta división, la reducción porcentual media en la concentración de espermatozoides que presentan los fumadores en comparación con los no fumadores ha sido del 12,4%. Por el contrario, en 3 de los 28 estudios encontramos un aumento. En la revisión realizada por Vine *et al.* [6] en 1996 se obtuvieron datos de concentración de 25 estudios, y la reducción porcentual media obtenida fue del 13%. Si tenemos únicamente en cuenta los 5 estudios realizados en la población general, en 4 de ellos hemos observado una reducción en la concentración de los fumadores respecto a los no fumadores y de estos 4, 2 han resultado significativos ( $p < 0,05$ ); el porcentaje de reducción de la concentración observado en los fumadores en estos 5 estudios ha estado del 7,8%. Si ahora analizamos los 6 artículos que estudian la población fértil, en 5 se observa una reducción de la concentración en los fumadores respecto a los no fumadores, y 3 son significativos ( $p < 0,05$ ). La reducción porcentual media ha estado del 8%. Por último, en el caso de la población infértil, de 17 estudios existe una reducción en 16 y 9 resultan significativos ( $p < 0,05$ ). Los fumadores infértiles respecto a los no fumadores infértiles presentan una reducción media en la concentración espermática del 15,3%.

### **Movilidad**

La clasificación de la movilidad espermática se categoriza en tres grados: espermatozoides con movimiento progresivo, con movimiento no progresivo e inmóviles.

**Tabla 1.** Comparación de parámetros seminales de hombres fumadores respecto a hombres no fumadores.

Referencia	Tipo de sujetos (diseño)	Número de sujetos	Concentración media, 10 <sup>6</sup> /ml (SD)	% reducción	Movilidad total media, % (SD)	Movilidad progresiva Media, %, (SD)	% reducción	Morfología normal media, %, (SD)	% reducción
Al-Matubsi <i>et al.</i> [48] (2011), Jordania	Población general	93 no fum. 111 fum.	58.5 (18.1) 48.8 (25.5)***	16.5	54.4 (7.1) 45 (8)***		17.2	-----	-----
Ramlau-Hansen <i>et al.</i> (2007), Dinamarca	Población general	1490 no fum. 1052 fum.	56.8 (3) 51.4 (6.5)*	9.5		47 (1.5) 46.3 (3.2)*	1.4	-----	-----
Ravnborg <i>et al.</i> (2011), Finlandia	Población general	1124 no fum. 641 fum,	43 (5) 46 (7)	-6.9	67 (2) 67 (1.5)		0	6.7 (0.3) 6.8 (0.5)	-1.5
Richthoff <i>et al.</i> [49] (2007), Suecia	Población general	217 no fum. 85 fum..	75 (67) 66 (65)	12		48 (23) 50 (22)	-4.2	-----	-----
Wang <i>et al.</i> [50] (2001), Singapur	Población general	49 no fum. 81 fum.	60.1 (1.8) 55.3 (1.69)	8		2.4 (0.7) <sup>5</sup> 2.4 (0.6)	0	-----	-----
Colagar <i>et al.</i> [51] (2007), Iran	Fértiles	21 no fum. 25 fum.	80 (29.6) 71 (28.8)*	11.3	73.1 (16.3) 72 (16.7)		1.5	14.9 (3.6) 12.9 (4.8)*	13.4
Davar <i>et al.</i> (2012), Irán	Fértiles	98 no fum. 53 fum.	101.3 (58.5) 86.7 (41.1)	14.4	74.3 (6.4) 72.3 (7.2)		2.7	51.1 (13.1) 47.4 (15.6)	7.2
Hassan <i>et al.</i> (2008), Egypt	Fértiles	30 no fum. 30 fum.	74 (20.3) 60.4 (10.4)**	18.4	74.2 (6.6) 42.8 (7.2)***		42.3	33.7 (3.9) 23.9 (6.3)***	29
Kumosani <i>et al.</i> (2008), Arabia Saudi.	Fértiles	66 no fum. 23 fum.	39.4 37.4	5.1	46 (2.5) 41.9 (2.9)*		8.9	57.7 (2.4) 52.3 (3.6)	9.4
Pasqualotto <i>et al.</i> (2005), Brasil	Fértiles (R)	522 no fum. 367 fum.	109 (76) 116.7 (86.3)	-7	60 (16) 58.3 (14.3)		4.2	26 (20) 23.3 (17.7)	10.3
Taha <i>et al.</i> (2012), Egypt	Fértiles	80 no fum. 80 fum.	76.7 (26.6) 72 (27.9)*	6.1	57.7 (6.8) 54 (5.4)*		6.4	89.9 <sup>β</sup> 88.7*	1.3
Aryanpur <i>et al.</i> [52] (2011), Iran	Infértiles	68 no fum. 112 fum.	102 (100) 73 (58)*	28.4	49.6(15.2) 50.2 (18.8)		- 1.2	10.4 (8.1) 11.9 (8.3)	-14.4
Bouvet <i>et al.</i> (2007) [53], Argentina	Infértiles (P)	69 no fum. 62 fum.	57.1 (4) 34.3 (2.6)*	39.9	-----	-----	-----	10.3 (4.4) 6.8 (3.8)*	34
Colagar <i>et al.</i> (2007), Iran	Infértiles	32 no fum. 23 fum.	36.9 (29.9) 31.8 (21)*	13.8	50 (29.7) 43.8 (3)		12.5	5.9 (4.4) 3.8 (2.1)*	35.6
Collodel <i>et al.</i> (2010),	Infértiles (R)	153 no fum.	43.5			23.8		-----	-----



Italy		118 fum.	40.3 (*)	7.4		24.8	-4.2		
El-Melegy <i>et al.</i> (2011), Egypt	Infértiles	30 no fum.	21.7 (5.3)			31.7(5.6)		12.6 (2.0)	
		40 fum.	18.8 (4.3)	13.4		29.9 (4.7)	5.7	10.1 (1.4)***	19.8
Elshal <i>et al.</i> (2009), Arabia Saudi	Infértiles	36 no fum.	55.6 (15.8)			37.8 (9.7)		20.4 (13.4)	
		34 fum.	28.6 (5.6)	48.6		26 (11.4)*	31.2	14.9 (2.7)*	27
Hassa <i>et al.</i> (2006), Turquía	Infértiles	97 no fum.	57.4 (4.5)		55.1 (2.2)	28 (2.6)		12.4 (0.9)	
		126 fum.	54.3 (6.1)	5.4	53.7 (2.6)	22.7(1.9)*	2.5/18.9	11.9 (1.2)	4
Hassan <i>et al.</i> (2008), Egypt	Infértiles	30 no fum.	12.1 (1.2)		37 (6.9)			11.4 (2.4)	
		20 fum.	10.6 (5.8)**	12.4	30.5 (3.5)***		17.6	10.2 (3.4)***	10.5
Kumosani <i>et al.</i> (2008), Arabia Saudi.	Infértiles	32 no fum.	2.2		15.3 (2.7)			38.2 (5.9) <sup>β</sup>	
		38 fum.	1.1*	50	9.8 (2.4)*		35.9	33.9 (5.6)	11.3
Künzle <i>et al.</i> (2003), Suiza	Infértiles	1131 no fum.	79.9 (75)		126.6 (136.8)	38.7 (17.7)		23.7 (15.5)	
		655 fum.	67.7 (65.9)***	15.3	105.6 (132.7)***	37(18.6)*	16.6 /4.1	21.2 (14.6)***	10.5
Meri <i>et al.</i> (2013), Jordania	Infértiles (R)	564 no fum.	43.7 (26,5)			15.2		39.3 <sup>β</sup>	
		396 fum.	34.7 (28.6)	20.6		9.9(7.8)*	34.9	27 (11.7)*	31.3
Mitra <i>et al.</i> (2012), India	Infértiles	126 no fum.	130 (50)			47.8		65.5	
		178 fum.	63 (35)***	51.5		44.6***	6.7	35.4***	46
Ozgur <i>et al.</i> (2005), Turquía	Infértiles (R)	98 no fum.	54.5 (57.9)		45.7 (20.6)	8.1 (8.1)		4.3 (3.8) <sup>β</sup>	
		198 fum.	61.9 (63.1)	-13.5	47.1 (19.6)	8.3 (7.4)(*)	-3/-1.9	3.7 (3.4)	15.2
Saleh <i>et al.</i> (2002), EEUU	Infértiles (P)	21 no fum.	27 (9)		50 (12)			7 (2)	
		12 fum.	35 (18)	-29.6	43 (14)		14	7 (4)	0
Sepaniak <i>et al.</i> (2006), Francia	Infértiles (P)	57 no fum.	50.5		51.5			31.1	
		51 fum.	60	-18.8	52.8		-2.5	30	3.5
Trummer <i>et al.</i> (2002), Austria	Infértiles (P)	517 no fum.	57.9 (70.8)			43.6 (14.5)		42.2 (17.6) <sup>β</sup>	
		478 fum.	58.8 (63.9)	-1.6		44.7 (13.2)	-2.5	43.9 (17.9)	-4
Zhang <i>et al.</i> [54] (2000), China	Infértiles	110 no fum.	52			2.7 <sup>s</sup>		-----	-----
		191 fum.	43**	17.3		2.4**	11.1		

\*\*\*p < 0.001; \*\*p<0.01; \*p<0.05; (\*\*\*), (\*\*), (\*): significativo en fumadores fuertes (> 12 cigarrillos/ día); P: prospectivo, R: retrospectivo;

fum.: fumadores; test.:testosterona;

<sup>β</sup> Porcentaje de espermatozoides anormales ha sido transformado en porcentaje de normales (% normales = 100 - % anormales);

<sup>s</sup> Valores obtenidos en formato escala en los artículos.

Los espermatozoides con movimiento progresivo se mueven activamente, ya sea de manera lineal o en un gran círculo, independientemente de la velocidad. Los espermatozoides no progresivos se mueven en pequeños círculos, únicamente moviendo la cabeza o mostrando movimientos flagelares puntuales. En el caso de los inmóviles simplemente no tienen capacidad de movimiento [16]. En este trabajo vamos a dividir los estudios según hayan determinado la movilidad total o la progresiva, y en el caso de Ozgur *et al.* [21], Elshal *et al.* [25] y Künzle *et al.* [26] se han estudiado las dos medidas de movilidad.

#### - **Movilidad total**

En 17 estudios se determina la movilidad total. En la gran mayoría los valores se encuentran por encima del límite de referencia. Por el contrario, los estudios realizados por Kumosani *et al.* [5] y Hassan *et al.* [24] presentan valores < 40% de movilidad tanto en los fumadores como en los no fumadores y son estudios realizados con hombres infértiles. De los 17 estudios, en 13 se observa una reducción y 7 son significativos ( $p < 0,05$ ). La reducción porcentual media en la movilidad que presentan los fumadores respecto a los no fumadores es de 10,3%. En el caso de Vine *et al.* [6] esta reducción fue menor, del 9,1%. Sólo 2 estudios trabajan sobre la población general, siendo sólo uno significativo ( $p < 0,001$ ), el porcentaje de reducción es del 8.6%. Si estudiamos a la población fértil, los 6 artículos determinan la movilidad total y en los 6 se observa una reducción que presenta un valor medio del 11%, pero solo 3 son significativos ( $p < 0,05$ ). En el caso de los infértiles, de 9 estudios, en 8 existe una reducción, del 10,2% de media, y 5 son significativos ( $p < 0,05$ ).

#### - **Movilidad progresiva**

En 13 estudios se analiza la movilidad progresiva, observándose que en muchos de ellos sus valores no superan los de referencia (Ozgur *et al.* [21], Elshal *et al.* [25], El-Melegy *et al.* [27], Meri *et al.* [28], Collodel *et al.* [29] y Hassa *et al.* [30]). Todos los casos hacen referencia a hombres infértiles, y los valores son menores del 32% de movilidad progresiva (valor de referencia) tanto en fumadores como en no fumadores, a excepción de un estudio [25] donde en el caso de no fumadores el valor es del 37,8 %. De los 13 estudios, encontramos que en 10 existe una reducción de la movilidad progresiva en los fumadores, siendo 8 significativos ( $p < 0,05$ ). La reducción porcentual media total es del 7,8%. En el caso de la población general se han realizado 3 estudios, siendo uno significativo ( $p < 0,05$ ), y el porcentaje de reducción total es negativo, del -0,9%. En el caso de los hombres fértiles no hay ningún estudio realizado que determine la movilidad progresiva. En cambio, en el caso de la población infértil, hay 10 estudios que la

determinan, 9 de los cuales muestran una reducción en los fumadores, del 10,4% de media, y en 7 los valores son significativos ( $p < 0,05$ ).

### **Morfología**

La morfología de los espermatozoides es uno de los parámetros más complejos de evaluar dada su subjetividad. Encontramos un total de 22 artículos que determinan el porcentaje de morfología normal, cuyos valores en todos ellos se encuentran por encima del límite de referencia actual [16]. Los fumadores presentan valores reducidos en 18 estudios, 11 de los cuales son significativos ( $p < 0,05$ ). La reducción porcentual media en estos 22 estudios es del 13,6% en los fumadores respecto a los no fumadores. Estos resultados no pueden compararse con los obtenidos por Vine *et al.* [6], ya que en este caso midieron la reducción porcentual de las formas anormales en lugar de las normales. En el caso de los estudios realizados con población general, sólo uno mira la morfología normal y presenta un valor de reducción del -1,5%. En el caso de los hombres fértiles, los 6 estudios valoran la morfología y en todos existe una reducción en los fumadores, con una media del 13,7%, siendo 3 significativos ( $p < 0,05$ ). En el caso de los infértiles, la morfología es estudiada en 15 artículos y se observa una reducción en los fumadores en 12 de ellos, con un valor medio del 15,4%, siendo 8 significativos ( $p < 0,05$ ).

### **Discusión**

A diferencia de los resultados obtenidos en trabajos anteriores [6], en este estudio los tres tipos de poblaciones presentan resultados muy similares. Tanto en los estudios llevados a cabo con hombres sanos de la población general, con hombres fértiles y con hombres infértiles, aproximadamente en la mitad de los resultados se observan reducciones significativas en la concentración, la movilidad y la morfología. Además, si sólo nos ceñimos a aquellos estudios con un mayor número de individuos, los cuales podrían considerarse más relevantes, los resultados son similares. A nivel de la población general, Ramlau-Hansen *et al.* [17], con un total de 2542 hombres presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la concentración y la movilidad (la morfología no es analizada) y el estudio de Ravnborg *et al.* [18], con un total de 1765 hombres sanos, no encuentra diferencias significativas para ningún parámetro. En el caso de la población fértil, sólo el estudio de Pasquolotto *et al.* [31] presenta un tamaño muestral considerable y sus resultados no son significativos. Por último, en la población infértil, Künzle *et al.* [26] sí que determina una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en los tres parámetros, Meri *et al.* [28] sólo en la movilidad y la morfología, y Trummer *et al.* [32] en ninguno de los tres parámetros. A pesar de estos resultados, hay que destacar que exceptuando la

movilidad progresiva y la morfología en la población general, donde sólo hay un estudio que las analiza, en el resto de parámetros y en las diferentes poblaciones existen reducciones de entre el 7,8% hasta el 15,4%. Concretamente estamos hablando de una reducción del 12,4% en la concentración, del 10,3% en la movilidad total, del 7,8% en la movilidad progresiva y del 13,6% en la morfología normal. Estos resultados nos están indicando que claramente se produce una disminución de la calidad seminal en los hombres fumadores respecto a los no fumadores. A pesar de ello, esta reducción no es lo suficientemente importante como para producir valores por debajo del límite de referencia actual [16]. Aún así, diferentes estudios realizados en parejas que participan en técnicas de reproducción asistida, determinan que estas reducciones que se producen en hombres fumadores son suficientes para disminuir la eficacia en las técnicas de fecundación in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática (ICSI) [33, 34]. También es interesante destacar que diversos de los estudios recogidos en esta revisión muestran una correlación entre el número de cigarrillos fumados al día y la concentración, movilidad y/o morfología de los espermatozoides [28, 29, 32, 35].

En estos 28 estudios no se han determinado los valores que presentarían hombres ex fumadores, no obstante, un estudio muy reciente llevado a cabo por Santos *et al.* [36], muestra que después de 3 meses sin fumar, los hombres que antes eran fumadores presentan una mejora significativa a nivel de la concentración espermática y de la movilidad, pero sin presentar cambios a nivel de la morfología. Por otro lado, Sofikitis *et al.* [37] llevó a cabo el mismo tipo de estudio pero en un periodo de 6 meses y sus resultados sí que muestran un incremento significativo a nivel de la morfología.

Determinar como el tabaco afecta a estos tres parámetros seminales está en vías de investigación. Estudios recientes han demostrado la transferencia activa de varios componentes del humo del cigarrillo, como el cadmio, la nicotina y su metabolito la cotinina, a través de la barrera hemato-testicular [38] siendo detectados en tejidos y fluidos gonadales en asociación con el hábito de fumar [6, 39]. La presencia de estos componentes en el plasma seminal puede inducir la degradación de los parámetros del esperma y de la calidad nuclear de los espermatozoides [5, 38]. No obstante, la disminución de la concentración, movilidad y morfología no es tan solo producida directamente por los componentes del tabaco si no que el estrés oxidativo presenta un papel muy relevante. Se ha visto que el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el líquido seminal correlacionan con el hábito de fumar; además, efectos patológicos como el varicocele o infecciones con pioespermia pueden incrementar ROS [3, 4, 40] y como consecuencia, presentar una mayor afectación de la calidad seminal [41, 42]. Los mecanismos fisiológicos según los cuales el tabaco afectaría a los

espermatozoides no están del todo claros. Se conoce que los oxidantes del humo del cigarrillo tienen la capacidad de inducir peroxidación lipídica de la membrana de los espermatozoides [43, 44] y se ha estudiado que este mecanismo parece ser el proceso clave causante de dañar los espermatozoides conduciendo a la disminución de su movilidad, viabilidad i aumentando los defectos de su morfología, específicamente de la parte intermedia de su cuerpo, además de otros efectos sobre la capacidad del esperma y alteraciones del acrosoma [45, 46, 47].

De cara a nuevas investigaciones, creemos necesario llevar a cabo estudios prospectivos, con un gran tamaño muestral y en población fértil, ya que hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún estudio con estas características. En estudios realizados en población general desconocemos el potencial de fertilidad de los participantes, y en el caso de estudios con infértiles, aunque se intente descartar aquellos que no son idiopáticos, siempre existe la posibilidad de que haya variables que no se tengan en cuenta.

## **HORMONAS REPRODUCTORAS**

Se cree que algunos de los efectos que se producen en la calidad seminal de los hombres fumadores pueden estar mediados por la acción del tabaco en el perfil hormonal masculino [55]. Se sabe que el tabaco puede alterar la espermatogénesis mediante la alteración de la concentración de las hormonas reproductoras [6]. Por este motivo hemos querido determinar si realmente existe una alteración de las hormonas en hombres fumadores respecto a hombres no fumadores, y hemos analizado un total de 12 artículos para poder extraer una conclusión. Este meta-análisis recoge los estudios que se han llevado a cabo en estos últimos 13 años (2000-2013). La gran mayoría se han realizado con hombres sanos de la población general, exceptuando el llevado a cabo por Pasqualotto *et al.* [31] con hombres fértiles, y los realizados por Trummer *et al.* [32] y Mitra *et al.* [35] con hombres infértiles. Las hormonas analizadas han sido la testosterona total, la testosterona libre, la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la globulina sexual transportadora de hormonas (SHBG). Los valores considerados de referencia según la OMS para estas hormonas son entre 9,36 - 37,1 nmol/L para la testosterona total; 312 - 1.041 pmol/L para la testosterona libre; 1,0 - 12,0 UI/L para la FSH; 2,0 - 12,0 UI/L para la LH y 11,0 – 80,0 nmol/L para la SHBG.

Para poder analizar la concentración de las diferentes hormonas, en los 12 estudios se recogieron muestras de sangre de los participantes, y una vez obtenidos los valores de concentración, se llevaron a cabo análisis estadísticos para determinar la significancia de

los resultados. El principal programa utilizado para estudiar las variables continuas fue el SPSS, concretamente la t de Student y la prueba U de Mann-Whitney. Para el estudio de las variables categóricas se realizaron el test de Fisher i el test de  $\chi^2$ .

Los resultados que hemos recogido son los siguientes (Tabla 2):

### **Testosterona total**

Un total de 11 estudios han analizado la testosterona total, los valores de 10 de ellos son superiores a los límites de referencia [16], a excepción del estudio de Mitra *et al.* [35] dónde los valores no sobrepasan el umbral, debido a que la población de estudio eran hombres infértiles. En este estudio, además, se muestra una disminución muy importante de la testosterona en hombres fumadores respecto a los no fumadores (60% de reducción), mientras que todos los demás artículos muestran un aumento; por este motivo a la hora de calcular el aumento porcentual medio total ha sido descartado, ya que desviaba mucho el resultado. De los 9 artículos donde se observa un aumento de la testosterona total en fumadores, 7 presentan resultados significativos ( $p < 0,05$ ). El porcentaje de aumento experimentado en los fumadores respecto a los no fumadores teniendo en cuenta los 10 estudios (sin Mitra *et al.*) es del 12,5%. Si sólo estudiamos hombres sanos sin tener en cuenta su potencial en fertilidad el valor medio de aumento es del 11,7%. El estudio en fértiles no ha determinado la testosterona total; y en los infértiles el valor es del 19,2%.

### **Testosterona libre**

Únicamente 7 artículos han determinado la testosterona libre, que es aquella que realmente está disponible para ser utilizada. Además en 3 de los estudios los valores se encuentran fuera de los límites de referencia, tanto en los fumadores como en los no fumadores; en el caso de Ravnborg *et al.* [18] los valores sobrepasan los 1041 pmol/L, mientras que en el caso de Sergerie *et al.* [56] y Svantberg *et al.* [57], se encuentran por debajo. Estos estudios han sido realizados en hombres sanos de la población general y desconocemos los motivos de estos valores. Así pues si decidimos tenerlos en cuenta en el análisis, podemos decir que en 5 de los 7 estudios se observa un aumento, con una media total del 6,5%, y 3 son significativos ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, si no los tenemos en cuenta, en 2 de 4 estudios se observa un aumento y este es significativo ( $p < 0,05$ ). No obstante el aumento porcentual es del 10,3%. En los artículos que estudian la población general, el aumento es del 4,3% y descartando los 3 artículos que no se encuentran dentro de los valores de referencia es del 8,5%. En los fértiles el valor es del 8,3% y en los infértiles del 15,8% (en los dos casos solo hay un estudio).

**Tabla 2.** Comparación de las hormonas reproductoras de hombres fumadores respecto a hombres no fumadores.

Referencia	Tipo de sujetos	Número de sujetos	Test. total (nmol/l)	% aumento	Test. libre (pmol/l)	% aumento	FSH (UI/l)	% aumento	LH (UI/l)	% aumento	SHBG (nmol/l)	% aumento
Al-Matubsi <i>et al.</i> (2011), Jordania	Población general	93 no fum. 111 fum.	16.2 (2.7) 18.1 (2) ***	11.7	-----	-----	3.5 (0.7) 3.7(0.6)	5.7	3.4 (0.6) 4.2 (0.6) ***	23.5	30.2 (0.6) 29.5 (0.3)	-2.3
Blanco-Muñoz <i>et al.</i> (2012), Mexico.	Población general	29 no fum. 67 fum. 40 ex fum.	13.5 (6.6) 17.7 (9.1) ** 15.6 (7.3)	31.1	-----	-----	3.7 (0.8) 3.5 (1.3) 3.6 (1.3)	-5.4	5.4 (.4) 6.7 (4) ** 5.2 (3.4)	23.1	-----	-----
English <i>et al.</i> [65] (2001), Inglaterra	Población general	25 no fum. 25 fum.	15.1 (4.9) 18.5 (4.6)*	22.5	402 (93) 462 (91)*	14.9	-----	-----	-----	-----	28.1 (9) 34.1 (12.8)*	-21.4
Halmenschlager <i>et al.</i> [66] (2009), Brasil	Población general	165 no fum. 90 fum.	15.2 15.6	2.6	329.9 336.8	2.1	5.3 5.5	3.8	4.2 4.4	4.8	26.9 29.9	11.2
Ramlau-Hansen <i>et al.</i> (2007), Dinamarca	Población general	1490 no fum. 1052 fum.	24.5 (15) 26.1 (22)**	6.8	-----	-----	3.9 (0.1) 4.2(0.4)	6.8	3.3 (0.1) 3.7 (0.1)***	15.2	30.1 (1.1) 30.9 (2.3)	2.8
Ravnborg <i>et al.</i> (2011), Finlandia	Población general	1124 no fum. 641 fum,	22 (0.6) 22.3 (1)	1.5	2330 2320	-0.4	-----	-----	3.4 (0.2) 3.3 (0.2)	-2.9	28 (1) 28 (1.3)	0
Richthoff <i>et al.</i> (2007), Suiza	Población general	217 no fum. 85 fum..	23 (5.3) 23 (5.4)	0	-----	-----	3.1 (1.6) 2.7 (1.7)*	-12.9	4.2 (1.5) 4.5 (1.7)	5.1	28 (9.6) 29 (9.8)	3.6
Sergerie <i>et al.</i> (2000), Canada	Población general	69 no fum. 28 fum.	14.5 16.8	15.5	64.2 63.4	-1.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Svartberg <i>et al.</i> (2007), Noruega	Población general	839 no fum. 969 fum. 1619 ex fum.	13.6 (5) 15.5 (5.7)*** 13.5 (5.3)	14	269 (99) 285 (112)** 248 (96)	5.9	9.3 (9.6) 9.5 (8.9) 11.3 (11.3)	2.2	5.3 (3.7) 5.7 (3.7)* 6.1 (4.5)	7.5	36 (15.3) 42.6 (18)**** 41 (17.2)?	18.3
Pasqualotto <i>et al.</i> (2005), Brasil.	Fértiles (R)	522 no fum. 367 fum.	-----	-----	559 (178) 605.3 (185)	8.3	3.7 (2.1) 3.6 (2)	-1.8	3.3 (1.6) 3.1(2.3)	-6	-----	-----
Mitra <i>et al.</i> (2012), India	Infértiles	126 no fum. 80 fum.	17 6.6***	-61	-----	-----	7 10***	42.9	6.1 7***	14.8	-----	-----
Trummer <i>et al.</i> (2002), Austria	Infértiles (P)	517 no fum. 478 fum. 109 ex fum.	14.6 (7.3) 17.4 (9.4)*** 15.3 (8.7)	19.2	527.8(184) 611(194)*** 517(142)	15.8	7.1 (7.9) 7.5 (9.8) 7.4 (6.3)	5.6	4.4 (2.8) 5.1 (3.9)* 4.8 (3.1)	15.9	-----	-----

Niveles de significancia: \*\*\*p < 0.001; \*\*p<0.01; \*p<0.05; P: prospectivo, R: retrospectivo; fum.: fumadores; test.:testosterona

### **Hormona foliculoestimulante (FSH)**

En el caso de la FSH, los valores de los 9 estudios que la determinan se encuentran dentro de los valores de referencia. En 6 de ellos se observa un aumento, siendo sólo uno significativo ( $p < 0,05$ ). El aumento porcentual medio que muestran los fumadores respecto a los no fumadores es del 5,2%. En los 6 trabajos que analizan hombres sanos, el aumento es del 0,03%, en los fértiles es del -1,8% [31], y en los infértiles llega a ser del 24,3%.

### **Hormona luteinizante (LH)**

En 10 de los 12 estudios se analiza la concentración de LH, todos ellos están dentro de los valores de referencia. En 8 se observa un aumento en los fumadores, y en 6 los valores son significativos ( $p < 0,05$ ). El aumento porcentual medio calculado para los fumadores es del 10,1%. Si sólo tenemos en cuenta la población general este valor es del 10,9%, en la población fértil disminuye hasta el 6% y en el caso de los infértiles aumenta hasta el 15,4%.

### **Globulina sexual transportadora de hormonas (SHBG)**

La SHBG únicamente ha sido estudiada en hombres sanos de la población general. Los 7 artículos que la determinan se encuentran dentro de los valores de referencia y en 5 de ellos se observa un aumento, siendo 2 significativos. El aumento porcentual medio observado en los fumadores respecto a los no fumadores es del 7,9%.

## **Discusión**

En las 5 hormonas estudiadas, testosterona total y libre, FSH, LH y SHBG, se observa un aumento de su concentración en los individuos fumadores respecto a los no fumadores. No obstante, nos gustaría especificar que en el caso de la FSH este aumento básicamente se observa en la población infértil, por lo tanto, debido a los otros muchos factores que existen en esta población, no sería adecuado hablar de un aumento en la hormona foliculoestimulante atribuible al consumo de tabaco. Por otro lado, las hormonas en que se observa un mayor incremento, tanto a nivel general como teniendo en cuenta las subpoblaciones, son en la testosterona total (12,5% de aumento) y en la LH (10,1% de aumento). Además, en varios estudios [17, 56, 57] a medida que los hombres fuman un mayor número de cigarrillos al día el aumento en la testosterona total, la LH y también en la SHBG es mayor, demostrándose una correlación dosis-dependiente. Los estudios dirigidos por Trummer *et al.* [32], Svartberg *et al.* [57] y



Blanco- Muñoz *et al.* [58] nos muestran otros datos también muy interesantes. Estos trabajos consideran la subpoblación de ex fumadores, y en todos ellos los niveles hormonales son menores en comparación con la población de fumadores, llegando a ser en algunos casos iguales que en la población no fumadora.

Los valores hormonales de la gran mayoría de estudios se encuentran dentro de los valores de referencia. En los 3 estudios donde esto no sucede [18, 56, 57], tanto fumadores como no fumadores se encuentran fuera de los valores límite. Estos datos nos indican que la alteración existente en los valores hormonales de los fumadores no es capaz de sobrepasar el límite de referencia y por lo tanto, no es alarmante.

Para poder explicar fisiológicamente estos resultados, hemos de recurrir a estudios experimentales que han demostrado que la nicotina estimula los receptores nicotínicos de acetilcolina en las neuronas del sistema mesolímbico, aumentando de este modo la liberación de dopamina [59, 60]. De esta manera se puede ver afectada la liberación de gonadotropinas (FSH y LH) en la hipófisis anterior [61, 62], así como verse alterado el mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisisario-gonadal, pudiendo tener un impacto en la producción de testosterona en los testículos, mediante una activación central de las células de Leydig [48]. El hecho que el aumento de FSH sea bastante menor que el de LH podría explicarse por el hecho que los pulsos de GnRH regulan la secreción cíclica de esta hormona en menor medida que la secreción de LH [63]. El aumento de la SHBG podría deberse básicamente al aumento de la testosterona, ya que la SHBG es su principal transportador y aproximadamente el 65%-80% de la testosterona total está inactiva y fuertemente unida a la SHBG [57].

Hay estudios que indican que los hombres con niveles más altos de testosterona participan más a menudo en conductas de riesgo, como consumir tabaco, que los hombres con niveles bajos [64] y que esta sería la explicación a los altos niveles de testosterona observados en los fumadores, no obstante, si esto fuera cierto, se esperaría que los niveles de testosterona siguieran siendo elevados en los hombres que dejan de fumar, y como hemos observado este no es el caso.

Es importante destacar que el estudio realizado por Ramlau-Hansen *et al.* [17] llevado a cabo en un total de 2542 hombres sanos y con un diseño prospectivo, concluye en un aumento significativo de la testosterona total y la LH en los fumadores respecto a los fumadores. No obstante, la desventaja que tiene este estudio, como la tienen 9 de los 12 que hemos analizado, es que no han determinado el potencial de fertilidad de la población estudiada, se trata de población general, y esto conlleva a no diferenciar entre hombres fértiles e infértiles, los cuales pueden tener valores muy distintos a nivel

hormonal. Además los estudios con infértiles tampoco nos interesan porque presentan muchas variables que pueden afectar a los resultados. Por lo tanto, los estudios que presentarían resultados más fiables sería los realizados con hombres fértiles; entre los 12 analizados, Pasqualotto *et al.* [31] es el único que ha estudiado a esta subpoblación y no ha presentado datos significativos, no obstante, su diseño es retrospectivo. Así pues, proponemos para el futuro estudios prospectivos, en hombres fértiles y con un gran tamaño muestral.

## FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Hemos querido determinar la capacidad que tiene el tabaco de afectar a la integridad del ADN espermático y producir su fragmentación. Este tipo de daño en el material genético de los espermatozoides puede hacer que estos pierdan totalmente su viabilidad y funcionalidad, o bien puede afectar a los acontecimientos finales de la fertilización y resultar en un fallo en la formación pronuclear [11] o dar lugar a un embrión no evolutivo [12]. La causa de esta posible fragmentación en hombres fumadores se debe a la presencia de una gran cantidad de agentes oxidantes en el tabaco, como son los alcaloides, las nitrosaminas, la nicotina, la cotinina y la hidroxicotinina [17, 32, 43, 67]. Estas especies reactivas del oxígeno podrían atacar la integridad del ADN en los núcleos de los espermatozoides y producir modificaciones de bases, roturas de cadena del ADN, tanto de cadena simple como doble, y empaquetamientos anormales de la cromatina [68, 69]. Hay que tener en cuenta que las células del espermatozoides son altamente susceptibles a daños inducidos por radicales libres de oxígeno, debido a que su membrana plasmática contiene una gran cantidad de ácidos poliinsaturados [70] y una baja concentración de enzimas *scavenger* en su citoplasma [71, 72, 73, 74]. Por otro lado, el hecho de fumar cigarrillos puede aumentar la infiltración de leucocitos en semen [75], y se sabe que los leucocitos son importantes generadores de ROS en la eyaculación [76].

A lo largo de estos últimos años diferentes grupos de investigación han querido determinar si realmente el tabaco provoca la fragmentación del material genético espermático. Así pues, el estudio realizado por Sepaniak *et al.* [38] demuestra una tasa media de fragmentación del ADN en los hombres no fumadores del 25,9% y en los fumadores del 32%, lo que resulta una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ). Estos mismos resultados también se han observado en el estudio llevado a cabo por Sun *et al.* [77]. Por otro lado, Potts *et al.* [78] muestra también una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), pero en este caso se trata de un 25,8% de fragmentación en los fumadores y un 19,6% en los no fumadores. En el estudio realizado por Taha *et al.* [19], se ha determinado no sólo que los fumadores tienen una mayor fragmentación del ADN seminal, del 11% respecto al

6% en no fumadores, sino que también que ésta está totalmente correlacionada con la cantidad de cigarrillos que los fumadores fuman al día y el tiempo que llevan fumando. Además esta correlación también existe con el estrés oxidativo, los niveles de zinc y los parámetros seminales, en estos dos últimos casos la correlación es negativa. Los mismos resultados fueron presentados en el estudio de Elshal *et al.* [25], el cual fue realizado en pacientes infértiles y detectó un 37,7% de fragmentación del ADN en los fumadores en comparación con el 19,3% en los no fumadores; y además determinó una correlación negativa del hábito de fumar con otros antioxidantes como la superóxido dismutasa, y positiva con anormalidades de la cromatina. Este último estudio fue realizado en hombres que no presentaban leucocitospermia, dato a tener en cuenta ya que los leucocitos generan estrés oxidativo por ellos mismos. Otros estudios, como el llevado a cabo por Saleh *et al.* [4], sí que observan un incremento del daño en el ADN en los participantes fumadores, pero estos resultados no llegan a ser significativos (26% de fragmentación en fumadores vs. 19% en no fumadores). Resultados similares se observan en el trabajo de Becheva *et al.* [79] (7,3% en fumadores vs. 5,8% en no fumadores).

Sin embargo, Sergerie *et al.* [56] estudiando espermatozoides de hombres sanos determinó una total falta de correlación entre el tabaquismo y el daño del ADN, encontrando incluso menor fragmentación en los fumadores (12% en fumadores vs. 20% en no fumadores).

Aunque la mayoría de estudios sí presentan un aumento de la fragmentación del ADN espermático en los fumadores, los valores son muy distintos. Esta variabilidad puede explicarse por varias razones, una de ellas es la población seleccionada en los diferentes estudios, ya que puede tratarse de miembros de la población general, de la fértil o de la infértil. Otra explicación es debido a la técnica utilizada en la determinación de la fragmentación del ADN, ya sea la técnica *acridine orange test* (AO), *comet assay* (CA), *sperm chromatin structure assay* (SCSA) o *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling* (TUNEL); así como por la falta de normalización de los protocolos de laboratorio [80], ya que el valor umbral en las diferentes técnicas no es exactamente el mismo y hasta en una misma técnica, como en el caso de TUNEL, los investigadores no llegan a ponerse de acuerdo. Así pues, es necesario tener en cuenta todos estos factores y realizar estudios más cautelosos y sobretodo en población fértil, ya que la mayoría se han realizado con hombres infértiles, y aunque se trata de hombres infértiles idiopáticos, puede ser que haya alguna variable que no se haya tenido en cuenta y que afecte a la integridad del ADN.

Existe una controversia en cuanto el valor diagnóstico de la fragmentación del ADN espermático. La mayoría de estudios realizados sobre este tema, como el de Sepaniak *et al.* [38], Belcheva *et al.* [79] y Fraga *et al.* [81], no determinan ninguna asociación entre la fragmentación del ADN y los parámetros seminales estándares. Por este motivo el ADN espermático está reconocido actualmente como una medida independiente de la calidad seminal, que puede tener mejores capacidades de diagnóstico y pronóstico que los parámetros seminales estándares, especialmente en técnicas de reproducción asistida [82]. No obstante, sí que ha habido estudios que han podido encontrar correlación [19, 77].

### **MUTACIONES, ANEUPLOIDÍAS Y EFECTO EN LA DESCENDENCIA**

La afectación de la integridad del ADN por el tabaco demostrada anteriormente [25, 38, 56, 77, 78, 79] podría estar implicada en la inducción de mutaciones. Además se conoce que el tabaco contiene una gran cantidad de mutágenos y carcinógenos que pueden causar daños en el ADN. A parte de estas posibles causas es importante remarcar la vulnerabilidad de los espermatozoides; durante la espermatogénesis, cuando las células germinales entran en meiosis I y II, son más susceptibles a las toxinas a las que se encuentran expuestas [83]. También durante la espermiogénesis (proceso en que las espermátidas se transforman en espermatozoides) hay un segundo periodo de sensibilidad que permite que se presenten mutaciones puntuales de novo [84]. Las espermatogonias y los espermatoцитos tienen la capacidad de reparar el ADN, ya que tienen mecanismos de *screening* para eliminar las células aberrantes con poca viabilidad [85]; sin embargo en los estadios finales de la diferenciación de las células del esperma, éstas tienen muy poca o ninguna capacidad de reparación; ya que una vez la cromatina se ha condensado ya no se puede reparar el daño en el ADN [86]. Al no tener capacidad de reparación, los espermatozoides eyaculados tienen el riesgo de transmitir el daño genético. De hecho se ha postulado que el riesgo de daño germinal al exponerse a factores externos es mayor en hombres que en mujeres [87]. Las tasas de mutación son mayores en hombres debido a un mayor número de divisiones meioticas y mitóticas donde las mutaciones se pueden acumular [88]. Además, se ha determinado que el tabaco afecta a la función del huso meiótico, ya que los alcaloides se unen a una de sus proteínas, la tubulina [89, 90]. Esto da lugar a alteraciones en la polimerización y en el ensamblaje de los microtúbulos, afectando a la tracción de los cromosomas que se da del ecuador hacía los polos, lo que conlleva a aneuploidías, es decir, a errores en el número de cromosomas en las células hijas.

Los estudios que han investigado los efectos del tabaquismo sobre la incidencia de aneuploidías en los espermatozoides no han sido uniformes. En general, parece que el consumo de tabaco aumenta la tasa de aneuploidías para algunos pares de cromosomas concretos, como por ejemplo para el par 13 en el estudio dirigido por Shi *et al.* [91], donde se observa un aumento significativo de esta disomía en fumadores. Un estudio realizado en adolescentes, con el objetivo de excluir el posible efecto de la edad, encontró un aumento de la tasa de espermatozoides con disomías para los cromosomas Y, X y 8 en asociación con la concentración de cotinina en la orina [92]. Otro estudio realizado con hombres sanos encontró una posible asociación ( $p = 0.07$ ), pero no significativa entre los fumadores de más de 20 cigarrillos al día y aneuploidías en los cromosomas X y 18 [93]. Cabe remarcar que se observa una gran variabilidad interindividual en estas aneuploidías inducidas por el tabaco [91, 92].

En cuanto a la presencia de mutaciones en la línea germinal, estudios en ratones expuestos al tabaco muestran un aumento tiempo y dosis-dependiente en la frecuencia de mutaciones de repeticiones en tándem [94, 95]. Por otro lado, otros estudios realizados más recientemente también concluyen que el humo del tabaco, constituyente de benzo[a]pireno, induce mutaciones en la línea germinal de estos animales [96, 97]. En humanos, nos encontramos que el estudio dirigido por Laubenthal *et al.* [98], realizado en el 2012, ha demostrado que el hábito paterno de fumar antes de la concepción causa roturas de única y doble cadena en el ADN en la sangre del cordón umbilical de la descendencia. El estudio concluye que alteraciones transgeneracionales en el ADN de padres varones que fueron expuestos al tabaco antes de la concepción, pueden convertirse en mutaciones y alteraciones de la estabilidad genómica en la descendencia F1. El trabajo realizado por Linshooten *et al.* [99] sugiere que el estilo de vida paterno constituye un importante factor de riesgo para la transmisión a la descendencia de mutaciones de novo en el ADN. Este estudio desarrollado este mismo año ha demostrado que el hábito de fumar se correlaciona con un aumento significativo en la frecuencia de mutaciones de un minisatélite, CEB1, y estas mutaciones son detectadas también en la descendencia. De esta manera, se ha demostrado por primera vez la existencia de mutaciones germinales en los hijos de hombres fumadores. Estos datos apoyan la existencia del tabaco como primer mutágeno identificado de la línea germinales humana [100].

Además otros estudios no tan recientes, examinaron los efectos del tabaquismo parental en la descendencia y demostraron asociaciones con varios resultados adversos, incluyendo defectos graves en el nacimiento y malformaciones [101]. Por otro lado, diversos estudios sugieren que el tabaquismo paterno podría aumentar el riesgo de cáncer infantil en niños de madres no fumadoras. El estudio realizado por Ji *et al.* [102]

es un claro ejemplo, ellos han encontrado que el tabaquismo por parte del padre que tiene lugar antes de la concepción se encuentra asociado con riesgos elevados de leucemia infantil aguda, linfoma y tumores cerebrales, entre otros. Además determinan que el riesgo relativo que es significativo se limita principalmente a los cánceres diagnosticados en niños menores de 5 años de edad; ya que en estos casos la causa del cáncer es genética. También encontramos el estudio realizado por Sorahan *et al.* [13] donde analizaron a un total de 555 niños con cáncer y a sus respectivos padres fumadores en comparación con un grupo control, y así pues encontraron una tendencia significativamente positiva ( $p = 0.02$ ) entre el riesgo de padecer cáncer durante la niñez y el consumo diario de tabaco por el padre antes del embarazo. Trabajos más recientes confirman estos resultados, el estudio realizado por Liu *et al.* [103] y el realizado por Chang *et al.* [104] encuentran una asociación estadísticamente significativa entre padres varones fumadores antes de la concepción y leucemias limfoblásticas agudas en su descendencia. En el caso de Lee *et al.* [105] la asociación se encuentra también para los demás tipos de leucemia. Por último, el estudio de Cordier *et al.* [106] relaciona el tabaquismo paterno con tumores cerebrales y de la astrogλία.

## **CONCLUSIÓN**

El desarrollo de esta revisión ha permitido verificar que el tabaco produce una reducción de la calidad seminal en los hombre fumadores respecto a los no fumadores, siendo del 12,4% en la concentración, del 10,3% en la movilidad total, del 7,8% en la movilidad progresiva y del 13,6% en la morfología normal. También ha demostrado la existencia de un aumento en la concentración de las hormonas reproductoras, siendo del 12,5% en la testosterona total, del 10,3% en la testosterona libre, del 5,2% en la FSH, del 10,1% en la LH y del 7,9% en la SHBG. No obstante, tanto la reducción en los parámetros seminales como el aumento en las hormonas reproductoras no son lo suficientemente importantes como para situar a los hombres fumadores fuera de los valores de referencia. Por este motivo concluimos que en hombres diagnosticados como fértiles el hábito de fumar no afectará a su fertilidad, no obstante, en aquellos hombres donde el diagnóstico no esté tan claro, el hecho de no fumar o de dejar de fumar puede aportarles beneficios a la hora de tener hijos. Además, hemos de tener en cuenta que el tabaco es sólo uno de los muchos factores que influyen en la fertilidad, como también lo son el alcohol, la cafeína y la obesidad, por este motivo a nivel individual es importante tenerlos todos en cuenta, y no sólo pensar en el tabaco.

Respecto a la integridad del ADN, esta revisión muestra un aumento de la fragmentación del material genético en los hombres fumadores en comparación con los no fumadores. Y a nivel de la existencia de aneuploidías y mutaciones en la línea germinal, este estudio demuestra su existencia; sobre todo a nivel de mutaciones. Lo cual puede causar trastornos o enfermedades genéticas en la descendencia, entre los que destacaría el cáncer.

En el futuro sería aconsejable que se realizaran nuevos estudios, para todos estos parámetros, con un diseño prospectivo, en población fértil y con un gran número de participantes, a ser posible más de mil hombres.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Davar R, Sekhvat L, Naserzadeh N. Semen parameters of non-infertile smoker and non-smoker men. *J Med Life* 2012 Dec 15;5(4):465-468.
2. Bani Meri Z, Irshid IB, Migdadi M, Irshid AB, Mhanna SA. Does cigarette smoking affect seminal fluid parameters? A comparative study. *Oman Med J* 2013 Jan;28(1):12-15.
3. Mostafa T, Tawadrous G, Roaia MM, Amer MK, Kader RA, Aziz A. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia* 2006 Dec;38(6):221-224
4. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002 Sep;78(3):491-499.
5. Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin Biochem* 2008 Oct;41(14-15):1199-1203.
6. Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996 Dec;19(6):323-337.
7. Speroff I, Fritz M. *Clinical Gynecologic endocrinology and Infertility*. Chapter 27, 7<sup>th</sup> edition. 2005.
8. World Health Organization (WHO). *Infertility: A tabulation of available data on prevalence of primary and secondary fertility* Geneva. Program on maternal and child health and family planning. Division of family health. England: Cambridge University Press; 1991; 13-15.
9. Bhasin S, de Kretser DM, Baker HW. Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Dec;79(6):1525-1529.
10. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online* 2001; 2(1):41-53.
11. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998 Mar;69(3):528-532.
12. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999 Jan;4(1):31-37.
13. Sorahan T, McKinney PA, Mann JR, Lancashire RJ, Stiller CA, Birch JM, et al. Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the inter-regional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC). *Br J Cancer* 2001 Jan 5;84(1):141-146

14. National Research Council Subcommittee on Reproductive and Neurodevelopmental Toxicology (1989) Chapter 7: Biologic markers of human male reproductive health and physiologic damage. In: *Biological Markers in Reproductive Toxicology* (eds N. Grossblatt & L. R. Paulson), pp. 83-105.
15. The World Health Organization [WHO] Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. England: Cambridge University Press; 2010.
16. The World Health Organization [WHO] Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction 4<sup>th</sup> ed. England: Cambridge University Press; 1999.
17. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007 Jan;22(1):188-196
18. Ravnborg TL, Jensen TK, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE, Jorgensen N. Prenatal and adult exposures to smoking are associated with adverse effects on reproductive hormones, semen quality, final height and body mass index. *Hum Reprod* 2011 May;26(5):1000-1011.
19. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* 2012 Oct;80(4):822-825.
20. Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. Cigarette smoking and the risk of male infertility. *Pak J Biol Sci* 2007 Nov 1;10(21):3870-3874.
21. Ozgur K, Isikoglu M, Seleker M, Donmez L. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet* 2005 Feb;271(2):109-112.
22. Tawadrous GA, Aziz AA, Mostafa T. Effect of smoking status on seminal parameters and apoptotic markers in infertile men. *J Urol* 2011 Nov;186(5):1986-1990.
23. Marczylo EL, Amoako AA, Konje JC, Gant TW, Marczylo TH. Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: a potential transgenerational epigenetic concern? *Epigenetics* 2012 May;7(5):432-439.
24. Hassan A, Abo-Azma SM, Fayed SM, Mostafa T. Seminal plasma cotinine and insulin-like growth factor-I in idiopathic oligoasthenoteratozoospermic smokers. *BJU Int* 2009 Jan;103(1):108-111.
25. Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clin Biochem* 2009 May;42(7-8):589-594.
26. Künzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003 Feb;79(2):287-291.
27. El-Melegy NT, Ali ME. Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol* 2011 Jul-Aug;37(4):495-506.
28. Meri ZB, Irshid IB, Migdadi M, Irshid AB, Mhanna SA. Does cigarette smoking affect seminal fluid parameters? A comparative study. *Oman Med J* 2013 Jan;28(1):12-15.
29. Collodel G, Capitani S, Pammolli A, Giannerini V, Geminiani M, Moretti E. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl* 2010 Mar-Apr;31(2):108-113
30. Hassa H, Yildirim A, Can C, Turgut M, Tanir HM, Senses T, et al. Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006;33(1):19-22.
31. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int* 2006 Feb;97(2):324-326
32. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod* 2002 Jun;17(6):1554-1559.



33. Joesbury KA, Edirisinghe WR, Phillips MR, Yovich JL. Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score. *Hum Reprod* 1998 Jun;13(6):1506-1513.
34. Zitzmann M, Rolf C, Nordhoff V, Schrader G, Rickert-Fohring M, Gassner P, et al. Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003 Jun;79 Suppl 3:1550-1554.
35. Mitra A, Chakraborty B, Mukhopadhyay D, Pal M, Mukherjee S, Banerjee S, et al. Effect of smoking on semen quality, FSH, testosterone level, and CAG repeat length in androgen receptor gene of infertile men in an Indian city. *Syst Biol Reprod Med* 2012 Oct;58(5):255-262.
36. Santos EP, Lopez-Costa S, Chenlo P, Pugliese MN, Curi S, Ariagno J, et al. Impact of spontaneous smoking cessation on sperm quality: case report. *Andrologia* 2011 Dec;43(6):431-435.
37. Sofikitis N, Takenaka M, Kanakas N, Papadopoulos H, Yamamoto Y, Drakakis P, et al. Effects of cotinine on sperm motility, membrane function, and fertilizing capacity in vitro. *Urol Res* 2000 Dec;28(6):370-375.
38. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006 Jun 1;223(1-2):54-60.
39. Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000 Mar-Apr;6(2):122-131.
40. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S, et al. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 1994 Nov;9(11):2044-2050.
41. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R, et al. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. *Hum Reprod* 2012 Nov;27(11):3140-3149.
42. Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E, Jr, Pasqualotto EB, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril* 2008 Mar;89(3):602-607.
43. Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, et al. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res* 2007 Winter;120(1-3):82-91.
44. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2007 May 1;380(1-2):50-58
45. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Jr, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997 Jun;67(6):1115-1120.
46. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 2008 May;89(5):1183-1190.
47. Arabi M, Moshtaghi H. Influence of cigarette smoking on spermatozoa via seminal plasma. *Andrologia* 2005 Aug;37(4):119-124.
48. Al-Matubsi HY, Kanaan RA, Hamdan F, Salim M, Oriquat GA, Al Hanbali OA. Smoking practices in Jordanian people and their impact on semen quality and hormonal levels among adult men. *Cent Eur J Public Health* 2011 Mar;19(1):54-59.
49. Richthoff J, Elzanaty S, Rylander L, Hagmar L, Giwercman A. Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males. *Int J Androl* 2008 Feb;31(1):31-39
50. Wang SL, Wang XR, Chia SE, Shen HM, Song L, Xing HX, et al. A study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality. *J Androl* 2001 Jan-Feb;22(1):73-78.
51. Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. Cigarette smoking and the risk of male infertility. *Pak J Biol Sci* 2007 Nov 1;10(21):3870-3874.

52. Aryanpur M, Tarahomi M, Sharifi H, Heidari G, Hessami Z, Akhoundi M, *et al.* Comparison of spermatozoa quality in male smokers and nonsmokers of Iranian infertile couples. *International journal of Fertility and Sterility* 2011 Oct; 5 (8): 152-157.
53. Reina Bouvet B, Vicenta Paparella C, Nestor Feldman R. Effect of tobacco consumption on the spermatogenesis in males with idiopathic infertility. *Arch Esp Urol* 2007 Apr;60(3):273-277.
54. Zhang JP, Meng QY, Wang Q, Zhang LJ, Mao YL, Sun ZX. Effect of smoking on semen quality of infertile men in Shandong, China. *Asian J Androl* 2000 Jun;2(2):143-146.
55. Vogt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Fertil Steril* 1986 Jan;45(1):106-110.
56. Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod* 2000 Jun;15(6):1314-1321.
57. Svartberg J, Jorde R. Endogenous testosterone levels and smoking in men. The fifth Tromso study. *Int J Androl* 2007 Jun;30(3):137-143.
58. Blanco-Munoz J, Lacasana M, Aguilar-Garduno C. Effect of current tobacco consumption on the male reproductive hormone profile. *Sci Total Environ* 2012 Jun 1;426:100-105.
59. Di Chiara G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur J Pharmacol* 2000 Mar 30;393(1-3):295-314..
60. Watkins SS, Koob GF, Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tob Res* 2000 Feb;2(1):19-37.
61. Funabashi T, Sano A, Mitsushima D, Kimura F. Nicotine inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion in human males but not in human females, and tolerance to this nicotine effect is lost within one week of quitting smoking. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Jul;90(7):3908-3913.
62. Fuxe K, Andersson K, Eneroth P, Harfstrand A, Agnati LF. Neuroendocrine actions of nicotine and of exposure to cigarette smoke: medical implications. *Psychoneuroendocrinology* 1989;14(1-2):19-41.
63. Turek PJ. Male Infertility. In: Tanagho EA, McAninch JW, editors. *Smith's General Urology*. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2004. pp: 678–712.
64. Booth A, Johnson DR, Granger DA. Testosterone and men's health. *J Behav Med* 1999 Feb;22(1):1-19.
65. English KM, Pugh PJ, Parry H, Scutt NE, Channer KS, Jones TH. Effect of cigarette smoking on levels of bioavailable testosterone in healthy men. *Clin Sci (Lond)* 2001 Jun;100(6):661-665.
66. Halmenschlager G, Rossetto S, Lara GM, Rhoden EL. Evaluation of the effects of cigarette smoking on testosterone levels in adult men. *J Sex Med* 2009 Jun;6(6):1763-1772.
67. Wong WY, Thomas CM, Merkus HM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* 2000 Nov;74(5):930-935.
68. Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2005 May;71(1):77-87.
69. Zubkova EV, Wade M, Robaire B. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil Steril* 2005 Oct;84 Suppl 2:1191-1198.
70. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995 Nov;42(3):334-346.
71. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995 Oct;10 Suppl 1:15-21.

72. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* 1995 Nov-Dec;16(6):464-468.
73. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996 Dec;48(6):835-850.
74. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001 Jun;8(7):851-862.
75. Close CE, Roberts PL, Berger RE. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol* 1990 Oct;144(4):900-903.
76. Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999 Sep-Oct;5(5):393-398.
77. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997 Mar;56(3):602-607.
78. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999 Jan 25;423(1-2):103-111.
79. Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int J Androl* 2004 Oct;27(5):296-300.
80. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Christensen P. Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human semen. *J Androl* 2005 May-Jun;26(3):360-368.
81. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996 Apr 13;351(2):199-203.
82. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010 Jul;25(7):1594-1608.
83. Wyrobek AJ. Application of human sperm parameters for monitoring. *Prog Clin Biol Res* 1986;207:101-120.
84. Chandley AC. On the parental origin of de novo mutation in man. *J Med Genet* 1991 Apr;28(4):217-223.
85. Brusick DJ. Alterations of germ cells leading to mutagenesis and their detection. *Environ Health Perspect* 1978 Jun;24:105-112.
86. Bentley KS, Working PK. Use of seminiferous tubule segments to study stage specificity of unscheduled DNA synthesis in rat spermatogenic cells. *Environ Mol Mutagen* 1988;12(3):285-297.
87. Lessells K. More mutations in males. *Nature* 1997 Nov 20;390(6657):236-237.
88. Chang BH, Shimmin LC, Shyue SK, Hewett-Emmett D, Li WH. Weak male-driven molecular evolution in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jan 18;91(2):827-831.
89. Singer WD, Himes RH. Cellular uptake and tubulin binding properties of four Vinca alkaloids. *Biochem Pharmacol* 1992 Feb 4;43(3):545-551
90. Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998 Jul;18(4):259-296.
91. Shi Q, Ko E, Barclay L, et al. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev* 2001; 59:417-421
92. Rubes J, Lowe X, Moore D, 2nd, Perreault S, Slott V, Evenson D, et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril* 1998 Oct;70(4):715-723
93. Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Everson RB. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 1997;30(2):175-183.

94. Yauk, C. L., Berndt, M. L., Williams, A., Rowan-Carroll, A., Douglas, G. R., and Stampfli, M. R. (2007) Mainstream tobacco smoke causes paternal germ-line DNA mutation. *Cancer Res.* 67, 5103–5106
95. Marchetti, F., Rowan-Carroll, A., Williams, A., Polyzos, A., Berndt-Weis, M. L., and Yauk, C. L. (2011) Sidestream tobacco smoke is a male germ cell mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12811–12814
96. Olsen, A. K., Andreassen, A., Singh, R., Wiger, R., Duale, N., Farmer, P. B., and Brunborg, G. (2010) Environmental exposure of the mouse germ line: DNA adducts in spermatozoa and formation of de novo mutations during spermatogenesis. *PLoS One* 5, e11349
97. Verhofstad, N., van Oostrom, C. T., Zwart, E., Maas, L. M., van Benthem, J., van Schooten, F. J., van Steeg, H., and Godschalk, R. W. (2011) Evaluation of benzo(a)pyrene-induced gene mutations in male germ cells. *Toxicol Sci.* 119, 218–223
98. Laubenthal, J., Zlobinskaya, O., Poterlowicz, K., Baumgartner, A., Gdula, M. R., Fthenou, E., Keramarou, M., Hepworth, S. J., Kleinjans, J. C., van Schooten, F. J., Brunborg, G., Godschalk, R. W., Schmid, T. E., and Anderson, D. (2012) Cigarette smoke-induced transgenerational alterations in genome stability in cord blood of human F1 offspring. *FASEB J.* 26, 3946–3956
99. Linschooten JO, Verhofstad N, Gutzkow K, Olsen AK, Yauk C, Oligschläger Y, et al. Paternal lifestyle as a potential source of germline mutations transmitted to offspring. *FASEB J* 2013 Mar 28.
100. Demarini, D. M. (2012) Declaring the existence of human germ-cell mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 166–172
101. Zhang, J., Savitz, D. A., Schwingl, P. J., and Cai, W. W. (1992) A case-control study of paternal smoking and birth defects. *Int. J. Epidemiol.* 21, 273–278
102. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997 Feb 5;89(3):238-244.
103. Liu R, Zhang L, McHale CM, Hammond SK. Paternal smoking and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: systematic review and meta-analysis. *J Oncol* 2011;2011:854584.
104. Chang JS, Selvin S, Metayer C, Crouse V, Golembesky A, Buffler PA. Parental smoking and the risk of childhood leukemia. *Am J Epidemiol* 2006 Jun 15;163(12):1091-1100.
105. Lee KM, Ward MH, Han S, Ahn HS, Kang HJ, Choi HS, et al. Paternal smoking, genetic polymorphisms in CYP1A1 and childhood leukemia risk. *Leuk Res* 2009 Feb;33(2):250-258.
106. Cordier S, Monfort C, Filippini G, Preston-Martin S, Lubin F, Mueller BA, et al. Parental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the risk of childhood brain tumors: The SEARCH International Childhood Brain Tumor Study. *Am J Epidemiol* 2004 Jun 15;159(12):1109-1116.