

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CARGA ESTROGÉNICA
TOTAL EFECTIVA EN PLACENTAS DE DOS POBLACIONES DE
RECIÉN NACIDOS, DE MADRID Y GRANADA”**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en
Veterinaria la Licenciada MARÍA REMEDIOS PRADA MARCOS**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Remedios Prada Marcos
D.L.: GR 482-2012
ISBN: 978-84-694-6939-2

D. NICOLÁS OLEA SERRANO, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que **Dña. MARÍA REMEDIOS PRADA MARCOS**, Licenciada en Veterinaria por la Universidad de León, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN PLACENTAS DE DOS POBLACIONES DE RECIÉN NACIDOS DE MADRID Y GRANADA”**, bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN VETERINARIA** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 20 de Junio de 2011

Fdo. Nicolás Olea Serrano

Dña. MARIANA FÁTIMA FERNÁNDEZ CABRERA, Doctora en Ciencias Químicas, e Investigadora del Centro de Investigación Biomédica y del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que **Dña. MARÍA REMEDIOS PRADA MARCOS**, Licenciada en Veterinaria por la Universidad de León, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN PLACENTAS DE DOS POBLACIONES DE RECIÉN NACIDOS DE MADRID Y GRANADA”**, bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN VETERINARIA** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 20 de Junio de 2011

Fdo. Mariana Fátima Fernández Cabrera

**DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

NICOLÁS OLEA SERRANO, Catedrático de Radiología y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en Veterinaria Dña. MARÍA RE MEDIOS P RADA M ARCOS, en el Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

Granada, 20 de Junio de 2011

Fdo. Prof. Dr. Nicolás Olea Serrano

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título “ **ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN PLACENTAS DE DOS POBLACIONES DE RECIÉN NACIDOS DE MADRID Y GRANADA**”, ha sido presentada por la **Lda. María Remedios Prada Marcos**, para aspirar al grado de Doctora en Veterinaria, habiendo sido dirigida por **D. Nicolás Olea Serrano**, Catedrático de Radiología y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física; **Dña. Mariana Fátima Fernández Cabrera**, Investigadora del Departamento de Radiología y Medicina Física

Granada, 20 de Junio de 2011

Fdo. María Remedios Prada Marcos

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias al apoyo de los proyectos de investigación:

- **“Infancia y Medioambiente (INMA). Exposiciones pre- y postnatales a contaminantes ambientales, dieta, crecimiento fetal y desarrollo neuro-inmuno-endocrino”** (Proyectos nº G03/176 y 06/1911), financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias.
- **“Efecto de la exposición materno-infantil vía placentaria a compuestos químicos que interfieren en la actividad desyodasa sobre el desarrollo neuroconductual”** (Proyecto nº 07/0252), financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias.
- **“Evaluación de la exposición infantil a contaminantes atmosféricos en la provincia de Granada y posibles efectos en el desarrollo postnatal”** (Proyecto nº 01 83/2007), financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía.
- **“Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública” CIBERESP** (nº: CB/06/02/0049)

AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta Memoria de Tesis Doctoral, que sin yo quererlo ni preverlo, me ha llevado por una serie de avatares, tanto en lo profesional como en lo personal, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a quienes, sin duda, son tan partícipes como yo, de todo cuanto recogen estas páginas:

A la Dra. Mariana Fernández Cabrera, mi directora de Tesis, con quien entré en el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y a quien le agradezco la oportunidad que me brindó de ampliar mis conocimientos en la fisiología endocrina y de llevar a cabo este proyecto, gracias a su inagotable capacidad de trabajo. Muchas gracias, Marieta, por haber seguido, incluso desde la distancia, la evolución del trabajo que hoy presentamos.

Al Doctor Nicolás Olea, Catedrático y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física, y también director de esta Memoria de Tesis

Doctoral, al que tengo que agradecerle su gran interés en este trabajo, el haberme sugerido el proyecto de trabajo y en el ámbito personal, el haberme facilitado siempre el poder continuar con el proyecto a pesar de la distancia.

Fue ahí, en el Laboratorio de Investigaciones Medicas donde conocí a mi primera compañera, Noemí Navea con la que inicié mis andanzas en el laboratorio ayudada por la Doctora María José López-Espinosa, quien me instruyó en todo lo referente a la Metodología Analítica. Gracias María José, la “pepita de oro”, por el gran impulso que supuso tu trabajo en el diseño de esta Memoria doctoral, sin ello no hubiera podido presentarla. Aquí en el laboratorio empezaron nuestros desvelos con el HPLC y nuestras carreras por los pasillos con el cronómetro en mano. También allí conocí a tres “señoras” y a la vez amigas, con mucha experiencia en el laboratorio y sobre todo, un gran corazón, Conchi F. España, su cuñada Conchi y Paco, de las que guardo un gran recuerdo y mejores recetas. Conchi mil gracias por tu paciencia para enseñarme la técnica del cultivo celular, tu ánimo y tu alegría.

Entre tanto y con el tiempo, llegaron más compañeros María Fernández y Esperanza Amaya, con las que poco a poco fuimos formando equipo, de las que tengo grandes recuerdos y conservaré siempre una gran amistad. Gracias María y Paco por ordenarme esas inmensas listas de medicamentos.

No quiero olvidarme de Rosa Ramos, Carmen Freire y Clemente Garduño que ya llevaban mucho más tiempo trabajando y que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en cuanto los necesité. Muchísimas gracias Carmen por echarme una mano con la estadística y con las tablas, espero que te vaya muy bien en tu nuevo destino. A Juan Pedro Arrebola, gracias por tu esfuerzo y empeño a pesar de la distancia para lograr sacar esto adelante, con tu valioso trabajo técnico te has convertido a su vez en coautor de este trabajo.

Algunos compañeros ya están en el nuevo Laboratorio del C.I.B. (Centro de Investigación Biomédica) de la Universidad de Granada, José, Chepe y Olga, un recuerdo entrañable y siempre agradecida por vuestra pronta ayuda en los momentos que lo necesite y vuestro ánimo. A José Manuel Molina por su incansable trabajo, siempre con sus células y cargado de medios, pipetas, etc,

sin tus aportaciones científicas no hubiera podido elaborar esta memoria, mi l
gracias.

A las profesoras y doctoras Maria Isabel Núñez y Mercedes Villalobos, por
su apoyo y sus sabios consejos.

A los Doctores Oscar Ballesteros y Jilila Takufi, del Departamento de
Química Analítica de la Facultad de Ciencias, por su paciencia y su ayuda para
poner a punto el nuevo HPLC.

Recordar también a todo el equipo de investigación del Doctor Salmerón,
que siempre se prestaron a ayudarme y me animaron en la tarea de este arduo
trabajo, gracias Paloma, Nuria, Rosa, José Antonio, Ana, Pepi, Angel y Jorge por
los buenos momentos de mesa compartidos.

A todo el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario
San Cecilio de Granada, por haber colaborado y haber nos dado todas las
facilidades a la hora de recolectar las placentas.

A las matronas y sanitarios del Hospital de Getafe y del H. General
Gregorio Marañón, por su labor en el reclutamiento de la población de estudio y
de recogida de muestras. Asimismo, al Laboratorio Regional de Salud Pública de
Madrid, por su buen hacer en la recolección de las muestras de tejido
placentario.

A la Dra. Nuria Aragonés, del Centro Nacional de Epidemiología del
Instituto de Salud Carlos III, por su amable e inestimable colaboración para la
realización de esta Memoria. Al Dr. Jesús Vioque por su ayuda con los
cuestionarios de frecuencia alimentaria.

A todas las madres y sus bebés que participaron en el estudio, por su
confianza incondicional.

Al equipo de investigación del proyecto INMA, por toda la ayuda recibida.

A mi familia que vive en el norte, a mi padre, madre, hermanas y hermano
por el cariño y ánimo recibido durante toda la vida y en especial durante este
periodo de lejanía, por confiar siempre en mí y apoyarme en cada una de las
decisiones que he ido tomando en mi vida.

A mi familia que vive aquí en Granada, porque siempre me han apoyado y
acogido con gran cariño. A Julio, mi marido, por su paciencia, sus consejos, y su

ánimo para no parar y seguir adelante, él me ha dado la fuerza y el impulso para llegar a finalizar este trabajo. Sin TODOS vosotros me hubiera sido imposible terminar esta Memoria de Tesis Doctoral.

A mis hijas, Encina y Candela

ABREVIATURAS

ATSDR: Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades.
CEHAPE: Plan de Salud Infantil y Medioambiental para Europa.
CPRG: Clorofenol Rojo Galactopiranosidasa.
CDHuS: Mezcla de carbón-dextrano suero humano.
CEPE: Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas.
CIN: Comité Nacional de Negociación.
COPs: Compuestos orgánicos persistentes.
DDT: Dicloro difenil tricloroetano.
DDE: Dicloro difenil dicloroetileno
DE: Disruptor endocrino.
DEs: Disruptores endocrinos.
DES: Dietilestilbestrol.
DHT: Dihidrotestosterona.
DMEM: Medio basal de Eagle modificado por Dubbelco.
Eq: Unidades equivalentes de estradiol.
EPA: Agencia de Protección Ambiental.
E-Screen: Bioensayo para la identificación de estrógenos.
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.
FISQ: Foro Intergubernamental de Seguridad Química.
FSH: Hormona Folículo Estimulante.
GnRH: Hormona liberadora de Gonadotrofinas.
hER α : Receptor estrogénico humano α .
HBB: Hexabromobifenilo.
HCB: Hexaclorobenceno.
HCH: Hexaclorohexano.
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.
IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.
IDM: Índice de desarrollo mental.
INMA: Infancia y Medio Ambiente.
IP: Índice Ponderal.

IPCS: Programa Internacional de Seguridad Química.

IMC: Índice de Masa Corporal.

IUGR: Crecimiento intrauterino retardado.

LD: Límite de detección.

LH: Hormona Luteinizante.

LOAEL: Nivel inferior de observación de efectos adversos.

LRSP: Laboratorio Regional de Salud Pública.

MCF-7: Línea celular humana de cáncer de mama de la Fundación Michigan para el Cáncer.

NIEHS: Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente.

NOAEL: Nivel sin efecto adverso observable.

OctaBDE: Octabromo Difenil Eter.

OMS (WHO): Organización Mundial de la Salud.

OECD: Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico.

PAN: Plan de Acción Nacional.

PAN-UK: Red de Acción de Pesticidas de Reino Unido.

PBDE: Polibromodifenil éter.

PBS: Tampón estándar de fosfato.

PC: Perímetro Cefálico.

PCBs: Bifenilos policlorados.

PCDD: Policloro dibenzo Dioxina.

PCDF: Policloro dibenzo Furanos.

PE: Efecto proliferativo.

PeCB: Pentaclorobenceno.

Penta BDE: Pentabromo Difenil Eter.

PFOS: Sulfonato de perfluorooctano.

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

POPRC: Comité de Examen de Compuestos Orgánicos Persistentes.

RE: Receptor estrogénico.

REACH: Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias y Preparados Químicos.

RF: Rojo Fenol.

SCALE: Estrategia Europea de Medio Ambiente y Salud.

SHBG: Globulina transportadora de hormonas sexuales

SFB: Suero Fetal Bovino.

SRB: Sulforodamina B.

TDS: Síndrome de disgenesia testicular.

TEXB: Carga Estrogénica Total Efectiva.

UE: Unión Europea

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE ESTRÓGENOS

1.1.1 ESTRUCTURA DE LOS ESTRÓGENOS

1.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS MEDIADO POR EL RECEPTOR

1.1.3 COMPUESTOS FITOESTRÓGENOS Y MICOESTRÓGENOS

1.1.4 ESTRÓGENOS ENDÓGENOS

1.2 ESTROGENOS SINTÉTICOS. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES

1.2.1 LA DOCENA SUCIA

1.3 EL CONVENIO DE ESTOCOLMO

1.3.1 NUEVOS CANDIDATOS

1.4 HIPÓTESIS DE LA DISRUPCIÓN ENDOCRINA

1.4.1 DISRUPTORES ENDOCRINOS

1.4.1.1 Disruptores clásicos y nuevos Disruptores Endocrinos

1.5 BIOMARCADORES

1.6 ALGUNAS CONSECUENCIAS DERIVADAS DE LA EXPOSICIÓN A DES

1.6.1 PREMATURIDAD

1.6.2 BAJO PESO AL NACER Y RETARDO EN EL CRECIMIENTO INTRAUTERINO

1.6.3 ABORTOS ESPONTÁNEOS

1.6.4 SÍNDROME DE DISGENESIA TESTICULAR

1.6.5 CRIPTORQUIDIA

1.6.6 HIPOSPADIA

1.6.7 EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1.6.8 OBESIDAD

1.6.9 PUBERTAD PRECOZ

1.6.10 ENDOMETRIOSIS

1.6.11 CÁNCERES EN TEJIDOS DEL APARATO REPRODUCTOR

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 MATERIAL PARA CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

3.1.2 INSTRUMENTACIÓN QUÍMICO-ANALÍTICA

3.1.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

3.1.3 CULTIVOS CELULARES

3.1.3.1 Tests biológico E-Screen

3.1.3.2 Medios para el cultivo celular

3.1.3.3 Reactivos

3.1.3.4 Compuestos químicos patrones

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DISEÑO Y ÁMBITO GEOGRÁFICO DEL ESTUDIO DE MADRID

3.2.1.1 Población del estudio de Madrid

3.2.1.2 Cuestionarios

3.2.1.3 Muestras biológicas

3.2.2 DISEÑO Y ÁMBITO GEOGRÁFICO DEL ESTUDIO GRANADA

3.2.2.1 Población de estudio de Granada

3.2.2.2 Cuestionarios

3.2.2.3 Muestras biológica

3.2.3 METODOLOGÍA QUÍMICO ANALÍTICA

3.2.3.1 Extracción de las muestras de placenta

3.2.3.2 Determinación de lípidos totales

3.2.3.3 Extracción semipreparativa de las muestras mediante HPLC

3.2.4 METODOLOGÍA BIOLÓGICA

3.2.4.1 Test biológico E-Screen

3.2.5 ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO

3.2.5.1 Variables de la madre

3.2.5.2 Variables del padre

3.2.5.3 Variables del niño

3.2.5.4 Variables del análisis biológico

3.2.5.5 Análisis de datos

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO DE MADRID

4.1.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE MADRID

4.1.1.1 Características de la madre

4.1.1.1.1 Variables antropométricas

4.1.1.1.2 Variables sociodemográficas

4.1.1.1.3 Características reproductivas de la madre

4.1.1.1.4 Características del parto

4.1.1.1.5 Antecedentes clínicos

4.1.1.1.6 Hábitos de consumo de alcohol y tabaco durante el embarazo

4.1.1.1.7 Exposición por empastes dentales

4.1.1.1.8 Características referentes a aspectos relacionados con la dieta

4.1.1.2 Características del padre

4.1.1.2.1 Edad

4.1.1.2.2 Características sociodemográficas

4.1.1.2.3 Hábito tabáquico

4.1.1.3 Características del niño

4.1.1.3.1 Variables antropométricas

4.1.1.3.2 Características del parto

4.2 ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO, MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN. ANÁLISIS UNIVARIADO DE MADRID

4.2.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN ALFA

4.2.2 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN BETA

4.2.3 CORRELACIÓN ENTRE LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN ALFA Y EN LA FRACCIÓN BETA, EN MUESTRAS DE TEJIDO

4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO DE GRANADA

4.3.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE GRANADA

4.3.1.1 Características de la madre

4.3.1.1.1 *Variables antropométricas*

4.3.1.1.2 *Variables sociodemográficas*

4.3.1.1.3 *Características reproductivas de la madre*

4.3.1.1.4 *Antecedentes clínicos*

4.3.1.1.5 *Hábitos de consumo de alcohol y tabaco durante el embarazo*

4.3.1.1.6 *Exposición por empastes dentales*

4.3.1.2 Características del padre

4.3.1.2.1 *Edad*

4.3.1.2.2 *Características sociodemográficas*

4.3.1.3 Características del niño

4.3.1.3.1 *Variables antropométricas*

4.4 ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN. ANÁLISIS UNIVARIADO DE GRANADA

4.4.1 *RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN ALFA*

4.4.2 *RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN BETA*

4.4.3 *CORRELACIÓN ENTRE LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN ALFA Y EN LA FRACCIÓN BETA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO*

4.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO, MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN EN AMBAS POBLACIONES.

4.6 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS BIVARIADO POBLACIÓN DE MADRID

4.6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

- 4.6.1.1 Relación entre la edad de la madre y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.2 Relación entre el IMC de la madre y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.3 Relación entre ganancia de peso durante el embarazo y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.4 Relación entre el municipio de residencia y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.5 Relación entre el nivel de estudios y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.6 Relación entre la actividad laboral y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.7 Relación entre percepción a la exposición a contaminantes ambientales y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.8 Relación entre la paridad y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.9 Relación entre el hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.10 Relación entre problemas en el embarazo y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.1.11 Relación entre empastes y la TEXB de la fracción alfa y beta

4.6.2 CARACTERÍSTICAS NIÑOS ESTUDIO DE MADRID

- 4.6.2.1 Relación entre el peso del recién nacido y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.2.2 Relación entre el Índice Ponderal y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.2.3 Relación entre semanas de gestación y la TEXB de la fracción alfa y beta
- 4.6.2.4 Relación entre el sexo del niño y la TEXB de la fracción alfa y beta

4.7 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS BIVARIADO POBLACIÓN DE GRANADA

4.7.1 *CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE*

- 4.7.1.1 Relación entre la edad de la madre y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.2 Relación entre el IMC de la madre y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.3 Relación entre ganancia de peso durante el embarazo y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.4 Relación entre el municipio de residencia y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.5 Relación entre el nivel de estudios y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.6 Relación entre la actividad laboral y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.7 Relación entre percepción a la exposición a contaminantes ambientales y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.8 Relación entre la paridad y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.9 Relación entre el hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.1.10 Relación entre problemas en el embarazo y la la TEXB de la fracción alfa y beta**

4.7.2 *CARACTERÍSTICAS NIÑOS ESTUDIO DE GRANADA*

- 4.7.2.1 Relación entre el peso del recién nacido y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.2.2 Relación entre el Índice Ponderal y la TEXB de la fracción alfa y beta**
- 4.7.2.3 Relación entre semanas de gestación y la TEXB de la fracción alfa y beta**

4.8 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO DE AMBAS POBLACIONES. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

4.8.1 Modelo 1 de Regresión logística, TEXTB alfa

4.8.2 Modelo 2 de Regresión lineal, TEXTB alfa

4.8.3 Modelo 3 de Regresión logística (varones), TEXTB alfa

4.8.4 Modelo 3 de Regresión lineal (varones), TEXTB alfa

4.8.5 Modelo de Regresión lineal por terciles, TEXTB alfa

4.8.6 Modelo 1 de Regresión lineal, TEXTB beta

4.8.7 Modelo 2 de Regresión logística, TEXTB beta

4.8.8 Modelo 3 de Regresión lineal, TEXTB beta

4.8.9 Modelo de Regresión lineal, TEXTB beta

4.8.10 Modelo de Regresión logística, TEXTB beta

4.8.11 Modelo de Regresión lineal por terciles, TEXTB beta

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

8. ANEXOS

1. INTRODUCCIÓN

Las distintas manipulaciones llevadas a cabo por el hombre en la naturaleza a lo largo de la historia, nos han devuelto a modo de efecto boomerang, consecuencias muy negativas para la salud. La revolución que supuso la utilización de los productos químicos sintéticos utilizados para el control de las plagas de los cultivos, con el fin de aumentar la producción agrícola, tiene hoy graves consecuencias ecológicas y sobre la salud. La mayoría de estos compuestos se han distribuido por todo el mundo, instalándose en cada uno de nosotros. A veces, asumimos estos efectos como el precio necesario que debemos pagar por el progreso, cuando en el fondo sabemos que el progreso no está reñido con el desarrollo sostenible.

Los efectos de las agresiones de los compuestos químicos de síntesis al medio ambiente no son visibles de inmediato y generalmente recaen sobre el sector de la población más vulnerable. No es de extrañar por tanto, que el 89% de los ciudadanos de la Unión Europea expresen, de acuerdo al Eurobarómetro,

su preocupación por las repercusiones potenciales del medio ambiente sobre su salud.

La Unión Europea lleva varios años desarrollando políticas sostenibles de medio ambiente y salud, que han desembocado en diferentes iniciativas políticas y legislativas, destinadas a la protección del medio ambiente como instrumento de protección de la salud. Merece la pena destacar: el Sexto Programa de Acción de la UE en materia de medio ambiente (2002) que incluye la Decisión del Parlamento Europeo relativa a la adopción de un primer Programa de acción comunitario en el ámbito de la Salud Pública para el periodo 2003-2008. Este programa tiene entre sus objetivos “el análisis y estrategias sobre determinantes ambientales de la salud” y senta las bases para un programa posterior. La Decisión del Parlamento Europeo relativa a la adopción de un Programa de acción comunitario en el ámbito de la Salud Pública durante 2008-2013 (2007), con el objetivo de mejorar la seguridad sanitaria de los ciudadanos, promover la salud y generar y difundir conocimientos e información a la población europea. También se han desarrollado políticas en materia de seguridad química, que han desembocado, entre otras, en el Reglamento Europeo y del Consejo relativo al Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las Sustancias y preparados Químicos, conocido con su acrónimo inglés REACH (Reglamento (CE) nº 1907/2006) (REACH 2006); y Estrategia Europea en Medio Ambiente y Salud (programa SCALE, acrónimo inglés de “Science, Children, Awareness, Legal instrument, Evaluation”), cuyo objetivo general es reducir en Europa las enfermedades que provocan los factores ambientales, con especial énfasis en los niños (SCALE, 2007). La estrategia SCALE está desarrollando sus objetivos a través del Plan de Acción de Medio Ambiente y Salud de la Comisión Europea 2004-2010 (2004).

Para mejorar las condiciones de salud de los ciudadanos europeos, es necesario proporcionar a la Unión Europea (UE) información fiable sobre el impacto de los daños medioambientales en la salud humana. Se han seleccionado como prioritarias las enfermedades respiratorias, los trastornos del desarrollo neurológico, el cáncer y los efectos de los disruptores del sistema

endocrino, reforzando la cooperación entre los distintos protagonistas en el ámbito del medio ambiente, la salud y la investigación.

La elaboración del Plan Nacional de Salud y Medio Ambiente en España se asienta en dos estrategias: el ya mencionado Plan de Acción Europeo de Medio Ambiente y Salud de la Comisión Europea (2004-2010) y el Plan de Salud Infantil y Medio Ambiente para Europa (CEHAPE, del acrónimo inglés Children's Environment and Health Action Plan for Europe) que es una iniciativa llevada a cabo por la Oficina Regional Europea de Salud y Medio Ambiente de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2004), para proteger la salud de los niños y jóvenes de los peligros ambientales. Este Plan fue firmado por 53 países en Junio de 2004, en Budapest, y estuvieron de acuerdo en tomar medidas concretas para reducir el impacto en la salud de los niños de la contaminación del aire, agua, sustancias químicas y accidentes, que comportan la tercera parte de las muertes y enfermedades en el grupo de edad de 0 a 19 años.

1.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE ESTRÓGENOS

El término de estrógeno se aplica a cualquier sustancia química, esteroidea o no, capaz de inducir en la hembra el *estro*, independientemente de su estructura química o su mecanismo de acción.

Los estrógenos a los que un individuo puede estar expuesto de forma natural, se pueden clasificar según su origen, su estructura química o su actividad. Respecto a su origen, los estrógenos pueden ser *naturales* o *sintéticos* (Pazos *et al.*, 1998). Dentro de los estrógenos naturales nos encontramos con dos grupos: los de procedencia animal y los de procedencia vegetal.

Los estrógenos de procedencia animal constituyen una clase de hormonas cuya propiedad es regular el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los órganos sexuales secundarios de la hembra. Los de procedencia no animal se han descrito en plantas y se les conoce con el nombre de fitoestrógenos y también en hongos, denominándoles micoestrógenos (Olea *et al.*, 1999). Tienen una estructura no esteroidea y demuestran su actividad hormonal cuando son administrados a los animales. La función de estos compuestos en las plantas no es bien conocida y se especula con la idea de que

actúan como mecanismo de defensa frente a herbívoros y agentes patógenos (Schutt *et al.*, 1976; Verdeal *et al.*, 1979).

Los estrógenos sintéticos son sustancias que han sido diseñadas basándose en las características estructurales de los estrógenos naturales de origen humano o animal. Dentro de este grupo destacan los hidroxiestilbenos, entre los que se encuentra el conocido diétilstilbestrol (DES), usado durante años en la clínica médica. Sin embargo, durante los últimos cuarenta años se han descubierto sustancias de síntesis que sin ser formuladas con tal propósito han resultado tener actividad estrogénica.

En cuanto a su estructura, los estrógenos pueden ser esteroides, es decir, compuestos integrados por una serie de cuatro anillos de carbono unidos entre sí para formar una unidad estructural llamada ciclopentano perhidrofenantreno. Aunque, como ya se ha indicado anteriormente, existen sustancias que sin poseer estructura esteroidea presentan actividad estrogénica, es decir, compuestos que son capaces de mantener los caracteres y órganos sexuales secundarios de las hembras.

Si los clasificamos por la actividad resultante cuando se administran a un ser vivo, los estrógenos pueden actuar como agonistas o como antagonistas y en algunos casos mostrar ambas propiedades; un buen ejemplo de ello es el antiestrogénico hidroxitamoxifeno utilizado en la clínica, que puede actuar como estrógeno en determinadas especies animales, órganos, tejidos y tipos celulares, pero que también se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama aprovechando su capacidad antiestrogénica en el tejido tumoral mamario, primario y metastásico (Leclercq, 1992).

1.1.1 ESTRUCTURA DE LOS ESTRÓGENOS

La mayoría de los estrógenos son moléculas relativamente rígidas, lipofílicas, con pesos moleculares de alrededor de 300 Da. Clásicamente se ha considerado que los requerimientos estructurales necesarios para que un compuesto químico tenga actividad estrogénica se resumen en el trabajo de Allen y Doisy (1923):

- a) La presencia de un anillo fenólico (A), con un grupo hidroxilo ligado en el carbono de posición 3
- b) La existencia de un grupo cetónico o hidroxilo, en el carbono 17 del anillo D
- c) Un grupo metilo en posición angular unido al carbono 13, entre los anillos C y D.

Podremos apreciar mucho mejor la descripción anteriormente citada mediante la siguiente figura (Figura 1).

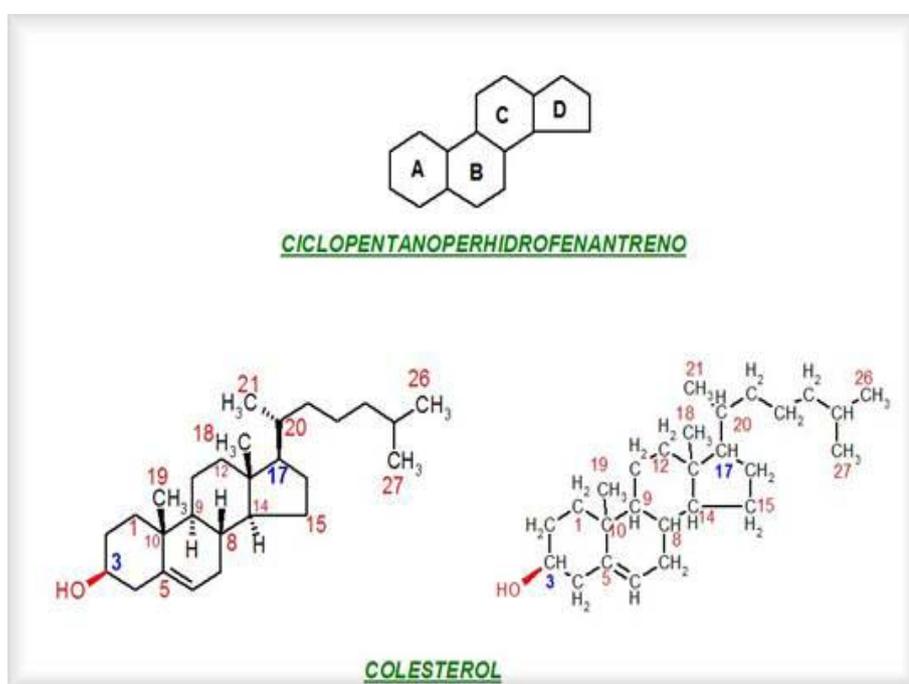


Figura 1. Estructura del colesterol

La estructura de los anillos C y D parece ser de menor importancia ya que su ruptura o la presencia de cadenas alifáticas saturadas no conllevan la pérdida de su actividad biológica (Dodds y Lawson, 1936). Cabe resaltar que en todos los casos se mantiene la distancia entre los carbonos 3 y 16-17, hecho común en muchas de las moléculas químicas con actividad estrogénica conocida. Así, a pesar de la aparente diversidad estructural, los potentes estrógenos sintéticos hexestrol o dietilestilbestrol (DES) mantienen esa relación de proporciones presentando dos grupos fenólicos separados por una cadena hidrocarbonada (Leclercq *et al.*, 1979)

Los esteroides son derivados del núcleo del ciclolopentanoperhidrofenantreno que se compone de cuatro anillos de carbono fusionados, que poseen diversos grupos funcionales y tienen partes hidrofílicas e hidrofóbicas. El ciclolopentanoperhidrofenantreno o esterano es un hidrocarburo policíclico que se puede considerar como un producto de la saturación del fenantreno asociado a un anillo de ciclopentano (Figura 2). Posee 17 átomos de carbono. De esta base estructural derivan los esteroides, como el colesterol, los ácidos biliares y las hormonas esteroideas.

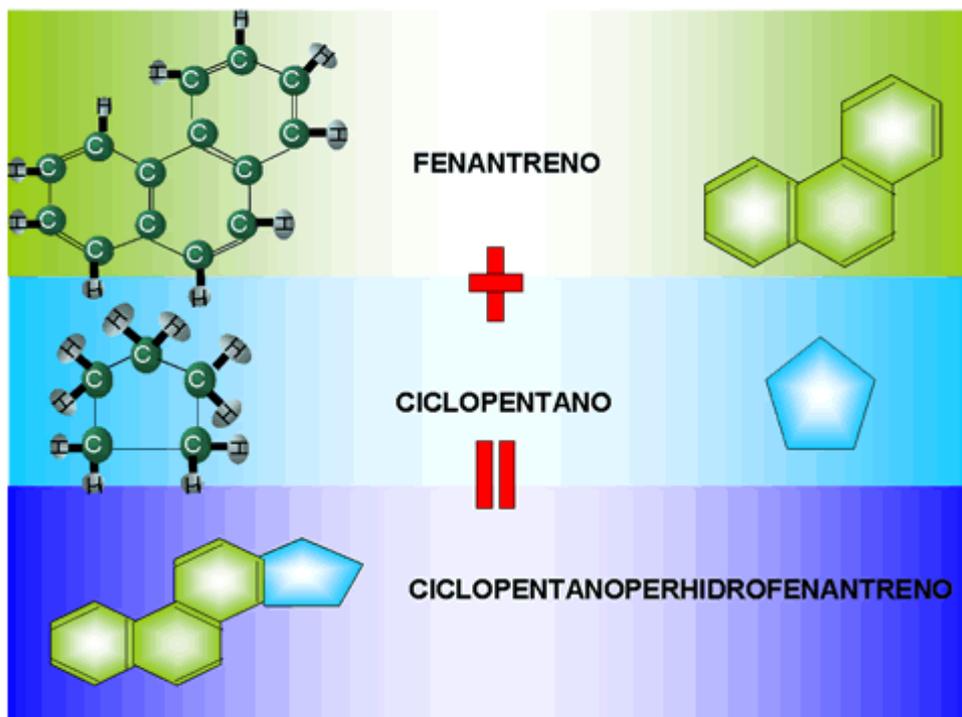


Figura 2. Estructura del ciclolopentanoperhidrofenantreno

Las hormonas esteroideas tienen en común que:

1. Se sintetizan a partir del colesterol
2. Son hormonas lipofílicas, relativamente pequeñas con lo cual pueden atravesar libremente la membrana plasmática y unirse a un receptor intracelular ubicado en el citoplasma o en el interior del núcleo de la célula diana
3. Una vez que se unen las hormonas a sus respectivos receptores, este complejo receptor-hormona se fijará en ciertas regiones del

ADN del núcleo celular iniciándose la transcripción de RNA_m, que al final conducirá a la síntesis de una proteína, que dependiendo de la hormona y de la célula blanco en particular, puede ser una enzima, otra hormona u otro producto que generan cambios que constituyen la respuesta celular de esa hormona.

La biosíntesis de las hormonas esteroideas comienza por la escisión de la cadena lateral del colesterol dando como resultado la pregnenolona. Para llevar esto a cabo, el colesterol entra en la mitocondria mediante un transportador específico donde sufre un proceso de hidroxilación en las posiciones 20 y 22 por una monooxigenasa que tiene citocromo P450 en su grupo proteico. Por último, interviene la acción de una desmolasa que elimina el resto del aldehído isocaproico, como muestra la figura siguiente (Figura 3).

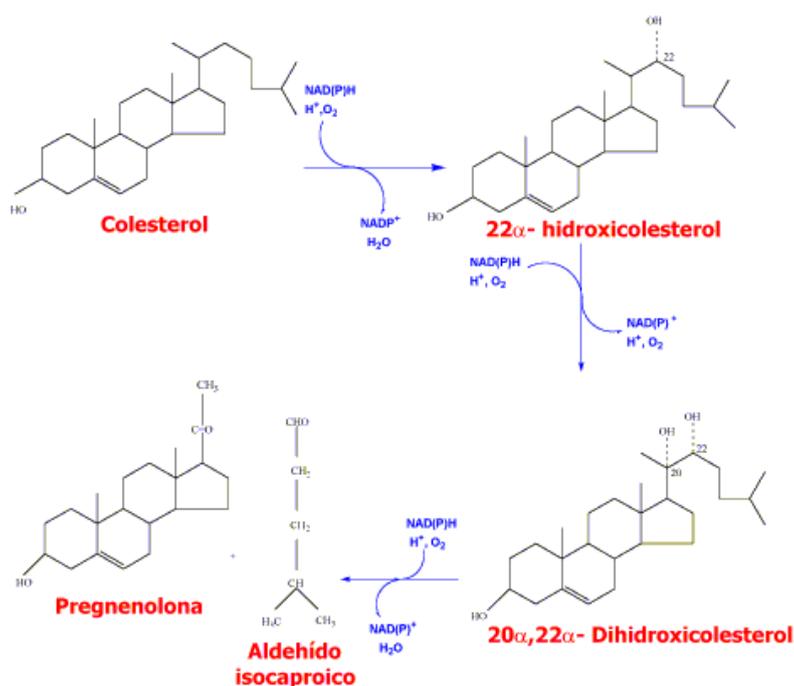


Figura 3. Biosíntesis de pregnenolona a partir de colesterol.

Tomado de Herrera, E. (Eds.). Bioquímica

1.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS MEDIADO POR EL RECEPTOR

Se asume que los estrógenos/xenoestrógenos exhiben su acción estrogénica o antiestrogénica mediante su interacción con el receptor intracelular específico conocido como receptor estrogénico (RE), ya sea en sus formas alfa o beta.

Se pueden distinguir cuatro mecanismos de acción principales (Shugart 1996; Olea *et al.*, 2001; ISTAS 2002; Porta *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2004; Tabb *et al.*, 2004). En la figura 4 aparecen descritos de forma esquemática estos mecanismos:

- 1) Unión y activación del receptor de estrógenos (RE). El receptor de estrógenos se encuentra en una amplia variedad de tejidos como gónadas, hígado, cerebro y órganos sexuales accesorios. Muchos compuestos DEs pueden unirse y activar RE produciendo efectos aditivos y/o sinérgicos; es el caso del butilbencilftalato y del di-n-butilftalato que aumentan el efecto estrogénico natural. Otros compuestos que también utilizan esta vía son DDT, dieldrín y endosulfán.
- 2) Otra manera de actuar sería la unión sin activación del receptor estrogénico (actuando como antiestrógenos). Es el caso de dioxinas y de PCBs.
- 3) También pueden producir una modificación del metabolismo hormonal, como se ha observado con los PCBs y algunos pesticidas, como lindano y atrazina, que pueden actuar sobre la ruta metabólica del estradiol, aumentando la concentración plasmática de dicho esteroide, impidiendo su síntesis, aumentando la velocidad de degradación, etc.
- 4) Por último, pueden actuar modificando el número de receptores hormonales en la célula mediante un mecanismo de control complejo, afectando al estado de respuesta a las hormonas naturales.

Agonistas y ant agonistas actuarían en diferentes puntos del receptor, mientras que los agonistas parciales tendrían afinidad por ambos estados conformacionales (Nikov *et al.*, 2000). La potencia de los estrógenos también viene determinada por la afinidad que presentan en su unión al receptor.

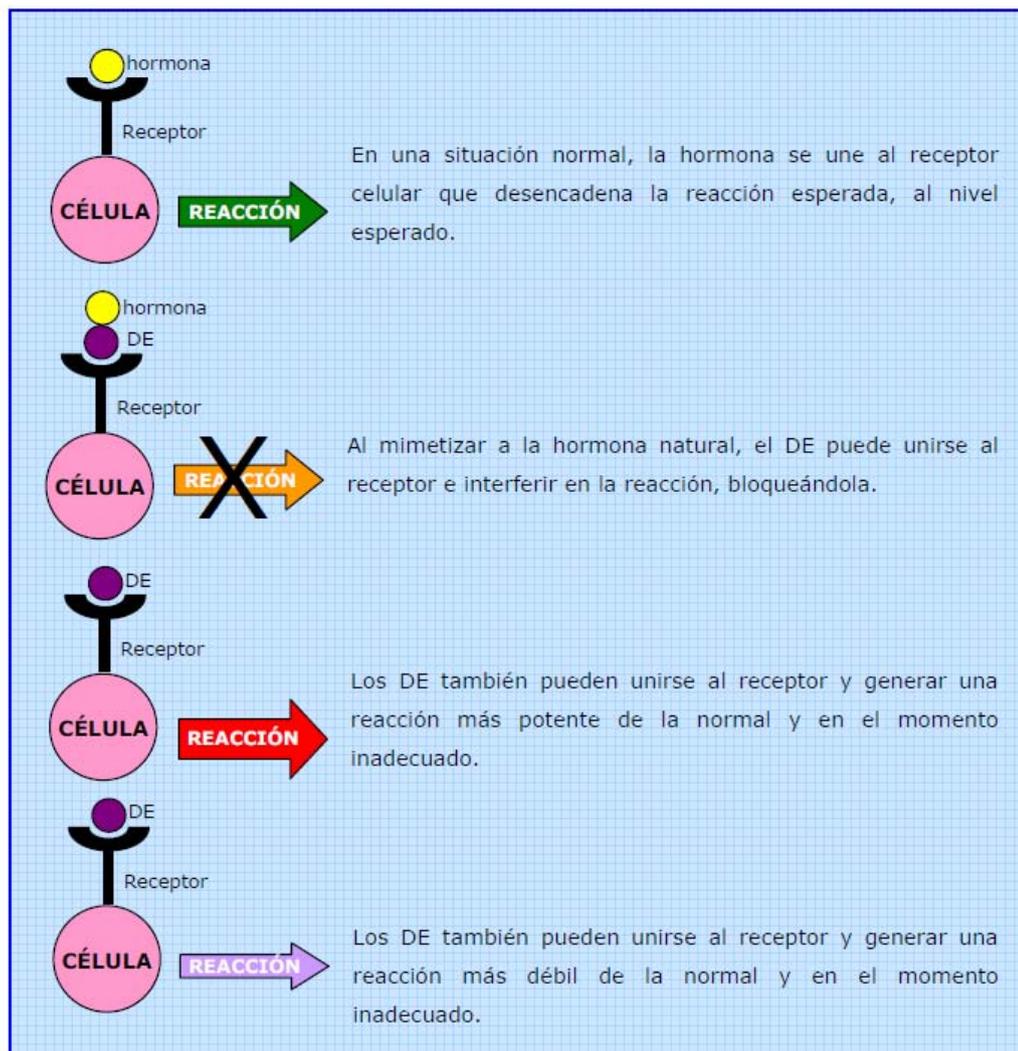


Figura 4. Esquema del mecanismo de acción de los xenoestrógenos.

1.1.3 COMPUESTOS FITOESTRÓGENOS Y MICOESTRÓGENOS

Se ha observado en las poblaciones donde se consumen gran cantidad de productos derivados de la soja (países asiáticos), que la incidencia y la mortalidad en cáncer de mama son más bajas, comparadas con la que presentan los países occidentales (Armstrong y Doll, 1975).

En mujeres premenopáusicas asiáticas, se aprecia una fuerte correlación entre la ingesta de proteína de soja y la reducción del riesgo de cáncer de mama. Estudios epidemiológicos y estudios a largo plazo utilizando roedores, revelan un efecto protector de los productos de soja frente a cáncer de ovario, endometrio, pulmones, colon, estómago, hígado, vejiga, próstata y frente a otras

enfermedades que son debidas a desajustes en el equilibrio hormonal, tales como enfermedades cardiovasculares o osteoporosis. Estos efectos preventivos de los productos de soja son debidos a su contenido en isoflavonas.

Los fitoestrógenos son una clase de componentes naturales de las plantas incorporados por los animales y el hombre en su dieta habitual (Olea *et al.*, 1999; Mäkelä *et al.*, 1994,1995). Se trata de compuestos no esteroideos a los que se puede clasificar estructuralmente en:

- 1) Flavonas e Isoflavonas, incluyen: genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona), biochanina A, prunetina, daidzeína (4',7-dihidroxiisoflavona) y formononetina.
- 2) Cumestanos, como cumestrol (7,12-dihydroxycumestano) y su o,p'-metileter.
- 3) Lignanos, como la enterolactona y el enterodiol.

Las isoflavonas y los cumestanos están presentes en numerosas plantas comestibles, especialmente en la soja y en otras leguminosas. La biochanina A, se ha aislado del garbanzo y del trébol rojo, y la prunetina, está presente en las cerezas y ciruelas. El cumestrol es un componente característico de la alfalfa. Los derivados del lignano proceden, principalmente, de semillas no refinadas que son activadas por las bacterias de la flora intestinal.

Tests *in vitro* han revelado que algunos fitoestrógenos a dosis bajas se comportan como agonistas estrogénicos, estimulando la proliferación de células mamarias y la expresión de genes que están bajo el control de elementos de respuesta estrogénica. Pero estos mismos compuestos a dosis más altas, pueden antagonizar el efecto de los estrógenos naturales (Dees *et al.*, 1997). Se ha sugerido que el efecto estrogénico de los fitoestrógenos puede ser agonista o antagonista dependiendo no sólo de las concentraciones titulares alcanzadas sino también de los niveles de estrógenos endógenos presentes en la época fértil o en la menopausia. Parece ser que los fitoestrógenos ejercen su acción estrogénica o antiestrogénica, a través de la interacción con el receptor estrogénico (RE). Así, se ha confirmado que los fitoestrógenos y los micoestrógenos poseen una alta afinidad por el receptor. Muchos fitoestrógenos y micoestrógenos poseen mayor afinidad por el RE beta que por el RE alfa y una

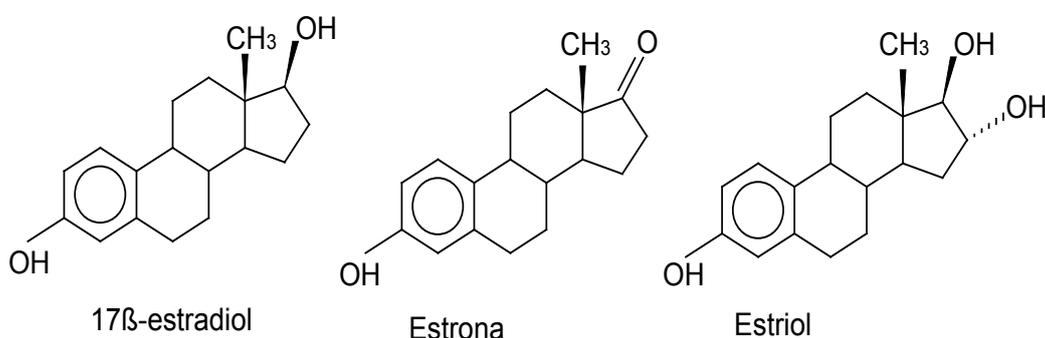
vez unidos al receptor, inducen un cambio conformacional que no solo modula las interacciones del receptor con los factores transcripcionales, sino que afecta también directamente a las propiedades físicas del complejo E R-ERE desencadenando o inhibiendo la expresión de genes específicos (Nikov *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 1998).

Otro grupo de investigadores, Verna y colaboradores (1998), ha puesto de manifiesto la acción inhibitoria de las isoflavonas sobre el crecimiento de células de cáncer de mama inducido por xenoestrógenos, tales como el o,p'-DDT y los alquilfenoles. Tales estudios han sugerido que los fitoestrógenos podrían ser inhibidores de la acción hormonal de los xenobióticos estrogénicos, estableciéndose una competencia entre estrógenos naturales y xenoestrógenos que no hace sino añadir más complejidad a la interpretación de la exposición.

Entre los micotoxinas encontramos la zearalenona y el zeranol. Estructuralmente la zearalenona es la lactona del ácido resorcílico. El zeranol (derivado sintético de la zearalenona) se utiliza actualmente como sustituto hormonal para acelerar el engorde del ganado. En Estados Unidos es legal la utilización de hasta seis hormonas con este propósito (estradiol, testosterona, progesterona, trembolona, zeranol y acetato de melengestrol). Esta práctica es la causa principal del contencioso existente entre la unión europea (UE), donde la utilización de hormonas en carnes de consumo está totalmente prohibida, y la UE no autoriza la importación de carnes procedentes de EE.UU. La actividad hormonal de estos compuestos naturales, fitoestrógenos y micotoxinas, se conoce desde hace décadas y está ilustrada por numerosos casos en los cuales su ingestión ha causado una alteración de la reproducción en animales, a veces irreversible (tal es el caso de la enfermedad del trébol en las ovejas o el síndrome del maíz mohoso en cerdos), pero el establecimiento de la asociación con la enfermedad en humanos está aún pendiente de ser demostrada (Adlercreutz 1995, Adlercreutz & Mazur, 1997).

1.1.4 ESTRÓGENOS ENDÓGENOS

El estrógeno humano más importante es el 17β estradiol (E_2), y la estrona (E_1). El 17α estradiol es menos activo que su epímero β . El estriol (E_3), es un metabolito procedente de los dos primeros, debidamente estrogénico, el cual principalmente se produce y se libera durante el embarazo. La conversión tiene lugar principalmente en el hígado y en el intestino delgado, debido a la abundancia de hidroxilasas y al establecimiento de la reabsorción intestinal.



La mujer adulta, no embarazada, secreta estrógenos en cantidades importantes por el ovario y en cantidades mínimas por la corteza suprarrenal. En la fase de máxima actividad del ciclo ovulatorio, se llegan a alcanzar valores de estradiol próximos a los $20\ \mu\text{g}/\text{día}$ por kg de peso. La secreción es mucho más baja en el resto del ciclo, alcanzándose tan sólo $1\ \mu\text{g}/\text{día}$ por kg de peso. Sin embargo, durante el embarazo la placenta secreta hasta 100 veces la cantidad liberada por los ovarios durante el ciclo normal.

La potencia estrogénica del 17β estradiol es 12 veces mayor que la de la estrona, y 80 veces mayor que la del estriol. Por este motivo se considera al 17β estradiol como el estrogénico más importante. Aunque la secreción de 17β estradiol es mayoritaria, la estrona, es a su vez secretada por el ovario y por la corteza suprarrenal, como resultado de la metabolización por el tejido adiposo de la androstendiona. No es despreciable la producción de estrona en el tejido adiposo, cuanto más si se tiene en cuenta que este fenómeno aumenta con la edad del individuo -menopausia- y es de especial significación en personas obesas (Fernández *et al.*, 1998). La transformación de los precursores en

estrona alcanza cifras de hasta 0,8 $\mu\text{g/dl}$ kg de peso en mujeres posmenopáusicas.

El metabolismo de los estrógenos se basa en la eliminación de la actividad hormonal mediante la hidroxilación de 17β estradiol, estrona y estriol en los carbonos 2 y 16, dando lugar a la formación de metabolitos menos activos y de fácil excreción. El sistema de hidroxilación es una de las vías habituales de inactivación de los estrógenos naturales, que en el caso de 17β estradiol significa su paso a estrona y estriol y la excreción urinaria.

En su mayor parte, los estrógenos se transportan en sangre unidos a la proteína SHBG y a la albúmina, pero una pequeña cantidad lo hacen unido a globulinas específicas. En la mujer, del total de estradiol circulante sólo el 37% se une a SHBG con una afinidad alta; el 61% lo hace a albúmina, con una afinidad baja, y entre 1-5% restante que no se une a proteínas, está disponible para pasar de la sangre a los tejidos reproductivos donde realiza su función fisiológica. La unión de las hormonas esteroideas a proteínas séricas constituye un mecanismo de regulación y respuesta en los tejidos diana. Este mecanismo puede ser muy importante durante el desarrollo fetal, ya que en este periodo el estradiol libre constituye sólo el 0,2% del total circulante, aunque la cantidad de estradiol total en el feto es muy superior a los niveles encontrados en el adulto.

La inducción de la actividad mitótica en el tracto genital femenino, suele ser considerada como marcador para determinar si un compuesto químico tiene o no actividad estrogénica (Hertz, 1985). Esto requiere medir el incremento de la actividad mitótica en tejidos del tracto genital femenino del animal prepuber (generalmente roedores), después de la administración del estrógeno.

1.2 ESTROGENOS SINTÉTICOS. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES

Los Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) son, como sus siglas indican, Contaminantes Orgánicos Persistentes que poseen ciertas propiedades que les hace especialmente perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente. La sigla COP ponen de manifiesto algunas de las características de estas sustancias (Thornton, 2000), así:

La **C** de “contaminante”, indica que estos compuestos son tóxicos, llegando a alterar los procesos biológicos normales incluso en pequeñas concentraciones. Pueden provocar efectos en la salud tales como, supresión del sistema inmune, interferencias con el desarrollo fetal, con las funciones cerebrales, alteración de la fertilidad e incluso participación en el desarrollo de ciertos tumores.

La **O** de “orgánico”, lo que significa que todos los compuestos clasificados como COP tienen un esqueleto de carbono, lo que les confiere una cierta solubilidad en compartimentos grasos. Es decir, se trata de compuestos que una vez emitidos al medio ambiente, son incorporados en los tejidos grasos de los seres vivos (plantas y/o animales) donde se almacenan. Algunos COPs, poseen además uno o varios átomos de cloro, lo que les hace incluso más solubles en grasa.

La **P** de “persistente” significa que poseen una larga vida media. Pocos organismos tienen los enzimas necesarios para metabolizar estos compuestos por lo que son resistentes a la degradación. Esta característica conlleva varias consecuencias. La primera es que el organismo acumula compuestos más rápidamente que los elimina. Teóricamente, cuantos más años tiene un individuo, más cantidad de COPs puede haber acumulado. Además, la vida media de los COPs normalmente excede la vida de una generación humana, y pasan de la madre al hijo durante el embarazo y la lactancia.

Los COPs son volátiles y se pueden desplazar a grandes distancias a través del aire y el agua, acumulándose en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Así pues, dado que el problema es global y transfronterizo resulta indispensable tomar medidas a escala internacional.

Debido a una de sus propiedades, su baja presión de vapor, se pueden mover a grandes distancias de su fuente de emisión y distribuirse ampliamente por el planeta. El transporte de COPs depende de la temperatura, según un proceso conocido como “efecto saltamontes”. Estos productos químicos “saltan” alrededor del planeta, se evaporan en los lugares cálidos, se dejan llevar por el viento y las partículas de polvo, se asientan en la tierra en los lugares templados, luego se evaporan y siguen desplazándose. A medida que estas sustancias se

alejan del Ecuador, encuentran climas más templados con menos evaporación. El resultado es un desplazamiento general de los contaminantes hacia los polos y las zonas montañosas. El tejido de los seres vivos es también más “adiposo” en los climas más fríos, los peces, las aves y los mamíferos necesitan capas de tejido graso más gruesas, como aislamiento natural contra las temperaturas más bajas. De esta manera, uno de los niveles más elevados de contaminación se registra en las poblaciones indígenas del Ártico, cuyas dietas tradicionales contienen muchos alimentos grasos. Sin embargo, estas poblaciones se encuentran a cientos y miles de kilómetros, de los lugares en que los compuestos químicos de síntesis se utilizaron.

La bioacumulación hace que gradualmente los compuestos químicos se concentren en los organismos a medida que avanzamos en la cadena trófica, alcanzándose niveles magnificados en los organismos situados al final de la misma; los peces, las aves depredadoras y los mamíferos, y entre ellos los seres humanos. Especialmente preocupante es la exposición de estos contaminantes en periodos de especial susceptibilidad, como son, la etapa fetal y durante los primeros años, cuando la mayoría de los sistemas están aún en proceso de maduración.

1.2.1 LA DOCENA SUCIA

Los 12 COPs más importantes, conocidos como la “*docena sucia*” se agrupan en tres categorías:

1. Pesticidas/Plaguicidas: Aldrín, Clordano, Dieldrín, DDT, Endrín, Heptacloro, Mirex y Toxafeno.
2. Sustancias Químicas Industriales: Hexaclorobenceno (HCB) y Bifenilos policlorados (PCBs).
3. Compuestos Químicos Persistentes producidos de forma no intencionada: Dioxinas y Furanos.

Seguidamente se describen, los usos principales de estos compuestos:

Introducción

PRODUCTO	USOS
Aldrín	Plaguicida utilizado contra insectos del suelo como termitas, saltamontes, gusano de la raíz del maíz y otras plagas agrícolas.
Bifenilospoliclorados (PCBs)	Compuestos utilizados en la industria como fluidos de intercambio térmico, en transformadores y condensadores eléctricos, y como aditivos en pinturas, papel autocopiante, selladores y plásticos.
Clordano	Utilizado en la lucha contra las termitas y como insecticida de amplio espectro, en cultivos agrícolas.
DDT	Utilizó ampliamente durante la Segunda Guerra Mundial, para proteger a los soldados y civiles del paludismo, el tifus y otras enfermedades propagadas por los insectos. En muchos países se continúa aplicando DDT para la lucha contra los vectores del paludismo.
Dieldrín	Utilizado principalmente en la lucha contra las termitas y las plagas que atacan a las fibras textiles. También se ha utilizado para combatir las enfermedades propagadas por insectos, y sobre insectos que viven sobre los suelos agrícolas.
Dioxinas	Productos químicos generados de manera no intencionada, en reacciones de combustión incompleta, así como durante la fabricación de algunos plaguicidas y otros productos químicos, o en el reciclado de metales y blanqueo de pulpa de papel.
Endrín	Insecticida utilizado en la fumigación de hojas de algunos cultivos, como el algodón y los cereales. Se ha usado también como rodenticida
Furanos	Se producen de forma no intencionada, a partir de los mismos procesos que generan las dioxinas. También se encuentran en las mezclas comerciales de PCBs.
Heptacloro	Utilizado principalmente para matar insectos del suelo y termitas, combatir insectos del algodón, saltamontes, mosquitos vectores del paludismo y otras plagas de los cultivos
Hexaclorobenceno (HCB)	Actúa sobre los hongos que afectan a los cultivos de alimentos. Es también un producto secundario en fabricación de determinados productos químicos industriales, y se genera como una impureza, en los procesos de producción de dioxinas y furanos.
Mirex	Insecticida utilizado principalmente para combatir la hormiga roja, así como otros tipos de hormigas y termitas. Se ha utilizado asimismo, como pirorretardante en plásticos, caucho y objetos eléctricos.
Toxafeno	También llamado canfecloro, se emplea en los cultivos de algodón, cereales, frutas, nueces y hortalizas. Asimismo, para la lucha contra las garrapatas y los ácaros del ganado.

1.3 EL CONVENIO DE ESTOCOLMO

Durante la década de 1960 y 1970, el uso de sustancias químicas y pesticidas en la industria y en la agricultura se incrementó drásticamente, e n particular en la categoría de sustancias químicas conocidas como COPs. Dichas sustancias comenzaron a ser el centro de atención internacional, debido a la evidencia científica que demostraba que la exposición a COPs, incluso a bajas dosis, podía conllevar importantes peligros en la salud humana y al medio ambiente. Por esta razón, en Mayo de 1995 el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), decidió iniciar un proceso de evaluación de diferentes COPs, y el Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química (FISQ), elaboró recomendaciones para la adopción de medidas internacionales, que serían posteriormente examinadas por el PNUMA y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Después de varias investigaciones, el FISQ concluyó que era necesario tomar medidas a nivel internacional respecto a los 12 COPs. Asimismo, incluía la elaboración de un instrumento internacional jurídicamente vinculante, con el fin de disminuir los peligros para la salud humana y el medio ambiente.

En este contexto, a principios de 1997 el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, convocó a la integración de un Comité Intergubernamental de Negociación (CIN), con la finalidad de iniciar la elaboración de un instrumento internacional jurídicamente obligatorio. En la elaboración de este proyecto, se consideraron las disposiciones de diversos convenios ambientales y otros instrumentos internacionales, en particular: el Convenio de Viena para la protección de la Capa de Ozono y su Protocolo de Montreal; el Convenio de Basilea, sobre el Control de los Movimientos Transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación; el Convenio de la Diversidad Biológica; el Convenio de Róterdam sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo, aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional.

El Comité Intergubernamental de Negociación elaboró el texto del Convenio y una vez elaborado, se convocó una Conferencia de Plenipotenciarios

Introducción

el 21 al 23 de Mayo de 2001 en Estocolmo, Suecia, donde los Delegados adoptaron el Convenio de Estocolmo.

El Convenio de Estocolmo constituye un marco basado en el principio de precaución, al reconocer que la falta de total certidumbre científica no debería impedir que una sustancia candidata a COP fuera sometida a evaluación. El Convenio exige tomar medidas internacionales respecto a 12 COPs y se persigue garantizar su eliminación segura, su disminución de la producción y el uso y vertido de estas sustancias nocivas para la salud humana y el medio ambiente. Se promueve la ayuda para su eliminación gradual, asistiendo para ello a los países, en su reconversión y sustitución de procesos e insumos generadores de COPs. Además, establece un sistema para tomar medidas ante otros productos químicos identificados como inadmisiblemente peligrosos.

COPs, Docena Sucia	Utilización	Anexo de inclusión	Exenciones
Aldrín	●	A	NO
Dieldrín	●	A	NO
Endrín	●	A	NO
Clordano	●	A	NO
Heptacloro	●	A	NO
Mirex	●	A	NO
Toxafeno	●	A	NO
DDT	●	B	SI
Hexaclorobenceno (HCB)	▲■	A y C	NO
Bifenilos policlorados (PCBs)	▲■	C	NO
Dioxinas	■	C	NO
Furanos	■	C	NO

● Pesticida. ▲ Productos químicos industriales. ■ Producto no intencionado

La Conferencia de las Partes toma la decisión final sobre si el compuesto se va a incluir en el anexo A, B o C del citado Convenio. Estos anexos suponen que las Partes, deben ejecutar diferentes actuaciones sobre las sustancias que aparezcan recogidas en el determinado anexo, así:

- **Anexo A:** las Partes deben tomar medidas para eliminar su producción y uso.

- **Anexo B:** las Partes deben tomar medidas para restringir su producción y uso.
- **Anexo C:** las Partes deben tomar medidas para impedir la liberación no intencional de estos productos.

El Convenio de Estocolmo entró en vigor el 17 de Mayo de 2004 y actualmente lo han ratificado 170 países.

1.3.1 NUEVOS CANDIDATOS

El Comité de Examen de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPRC siglas en inglés) ha examinado y propuesto a la Conferencia de las Partes (todos los países que han ratificado el Convenio) la inclusión en el Convenio de Estocolmo de otras nueve sustancias químicas (COPs). (Informe UNEP/POPS/COP 4/ 38, 2009). En la siguiente tabla se describe de modo esquemático este nuevo grupo de COPs, haciendo algunas referencias:

Sustancia	Abreviatura	País que propone	Anexo de Inclusión
Alfa hexaclorociclohexano	α HCH	México	Anexo A
Beta hexaclorociclohexano	β HCH	México	Anexo A
Clordecona		Unión Europea	Anexo A
Hexabromobifenilo	HBB	Unión Europea	Anexo A
Lindano	γ HCH	México	Anexo A
Éter de Octabromodifenilo	OctaBDE	Unión Europea	Anexo A
Éter de Pentabromodifenilo	PentaBDE	Noruega	Anexo A
Pentaclorobenceno	PeCB	Unión Europea	Anexo A y C
Sulfonato de perfluorooctano	PFOS	Suecia	Anexo B

Cuando se incluyen nuevos productos al listado de COPs, las Partes deberán:

- Aplicar medidas de control para cada producto.
- Elaborar y aplicar planes de acción para el caso de productos químicos producidos no intencionadamente.
- Realizar inventarios de la existencia de productos.
- Revisar y actualizar el Plan de Acción Nacional (PAN).

- e) Incluir los nuevos productos en el Informe.
- f) Incluir los nuevos productos químicos en el programa de evaluación de eficacia.

1.4 HIPÓTESIS DE LA DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Las alteraciones en la función reproductora de algunas especies de animales salvajes, junto con la demostración de la exposición humana y animal a contaminantes químicos, contribuyó decisivamente a generar, hace ahora casi 20 años, lo que hoy día se conoce como hipótesis de la disrupción endocrina (Colborn *et al.*, 1992, Krimsky 2000).

Entre las consecuencias sobre la salud humana y animal relacionadas con la exposición a estas sustancias exógenas, podemos enumerar: disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, de masculinización, feminización, alteraciones del sistema inmune, e incluso incremento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Colborn *et al.*, 1993).

La hipótesis de la disrupción endocrina cuestiona los paradigmas en que se fundamenta el control y la regulación del uso de los compuestos químicos, y sugiere que algunas de estas sustancias químicas, introducidos en el medio ambiente por la actividad humana, se comportan como hormonas, alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas, a través de mecanismos de acción diversos (Miller and Sharpe, 1998). (Ashford and Miller, 1998).

1.4.1 DISRUPTORES ENDOCRINOS

En 1962 el libro de Rachel Carson “Primavera Silenciosa” (Carson, 1962) dio el primer aviso de que ciertos productos químicos de síntesis, utilizados para el control de las plagas agrícolas, se habían difundido por todo el planeta, contaminando prácticamente a todos los seres vivos, afectando de manera

universal e inadvertida al equilibrio entre las especies. Aquel libro, que marcó un hito, presentó pruebas del impacto que dichas sustancias sintéticas tenían sobre las aves y de más fauna silvestre. Carson evidenció además, cómo esas sustancias se iban acumulando en los organismos vivos, advirtiendo que los efectos no se manifestaban necesariamente de forma inmediata y/o drástica sino que permanecían latentes durante años, expresándose de forma tardía e incluso en generaciones posteriores.

Todos estos acontecimientos motivaron la celebración en 1979 de la conferencia *Estrogens in the Environment I* (1979), en el Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente americano (NIEHS), con el objetivo de evaluar las propiedades químicas y la diversidad estructural encontrada entre estas sustancias que se comportaban como hormonas. A esta conferencia le siguieron otras, como *Estrogens in the Environment II* (1985), donde se trataron los diferentes efectos biológicos y las acciones potencialmente tóxicas de la exposición a disruptores endocrinos. Se demostró, asimismo, la ubicuidad de estas sustancias y se presentó información sobre la variabilidad de su potencia como hormonas exógenas, tanto de los agonistas como de los antagonistas hormonales (McLachlan, 1993). Posteriormente en 1994, se celebra la tercera conferencia *Estrogens in the Environment III* (1995) en Washington, bajo el título "Implicaciones en la salud global".

En el verano de 1991 se celebró la Conferencia de Wingspread en Racine (Wisconsin, USA), con el objetivo de analizar la evidencia disponible acerca del efecto de los contaminantes químicos ambientales, sobre el sistema endocrino de animales salvajes. En esta conferencia se concluyó que "*un gran número de sustancias químicas, sintetizadas por el hombre y liberadas al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen efecto sobre el sistema endocrino del hombre y de los animales. Se trata de compuestos persistentes, organohalogenados y bioacumulables que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas),...compuestos de síntesis y algunos metales*". Fue aquí donde se propuso y acuñó el nombre para este tipo de compuestos químicos, los cuales se conocen desde entonces como disruptores endocrinos (DEs) (Colborn and Clement, 1992). Los participantes de esta conferencia firmaron un documento

denominado la Declaración de Wingspread (Colborn and Clement, 1992). En este documento se identificaban diferentes áreas de preocupación:

- 1) El gran aumento de nuevos productos químicos que se comportan como hormonas.
- 2) El elevado número de contaminantes ambientales que se podían detectar en el tejido adiposo de los animales salvajes, comportándose varios de ellos como disruptores endocrinos.
- 3) Los efectos perjudiciales de la utilización del dietilestilbestrol (DES) con objeto de prevenir abortos espontáneos (práctica médica habitual entre 1950 y 1970), revelados en las hijas de las mujeres tratadas. (Herbst and Bern, 1988).
- 4) El reconocimiento de que los efectos que se habían observado en los animales, probablemente aparecerían también en los seres humanos.

Con posterioridad a la Conferencia de Wingspread, se celebraron otras reuniones científicas como la de Weybridge (UK) en 1996 (European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife 1996), de nuevo en Wingspread (USA), en 1997 (Raffensperger and Tickner, 1999) y posteriormente, en Årnsborg (Suecia), en 2001 (European Workshops on Endocrine Disrupters 2001).

De esta última se obtuvieron una serie de conclusiones, destacando:

- 1) La imperiosa necesidad de intercambio de información y de cooperación internacional;
- 2) La clara definición de las líneas prioritarias de investigación y desarrollo;
- 3) La implementación de una estrategia de criba y métodos de ensayo;
- 4) El establecimiento de programas de monitorización.

“Nuestro futuro robado”, obra escrita por la Dra. Theo Colborn, Dianne Dumanoski y John Peterson Myers (1996), reunió por primera vez las alarmantes evidencias obtenidas en estudios de campo, experimentos de laboratorio y estadísticas humanas, para plantear en términos científicos pero accesibles para

todos, el caso de este nuevo peligro. Comienza allí donde terminaba “Primavera silenciosa”, revelando las causas de los síntomas que tanto alarmaron a Carson.

El término **disruptor endocrino** (Endocrine Disrupting Chemicals) define hoy día a un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso. Se trata de sustancias exógenas al organismo, naturales o sintéticas, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo. En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habrían atribuido ningún efecto. Además, muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen características óptimas para haber sido, y ser empleados aún hoy día, en grandes cantidades y sin protección medioambiental especial (Olea *et al.*, 2002).

Algunos de estos compuestos son bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los contaminantes orgánicos persistentes. Otros sin embargo parecen no acumularse, pero su presencia como contaminantes en el entorno (agua, aire, alimentos, utensilios) es tan frecuente, que la exposición diaria está asegurada (Olea *et al.*, 1996).

1.4.1.1 Disruptores clásicos y nuevos Disruptores Endocrinos

La década de los 90 supuso un gran empuje respecto de la aproximación de la comunidad científica hacia la exposición humana a los compuestos disruptores endocrinos (DEs) y sus efectos sobre la salud. En este periodo, el censo de compuestos químicos se amplió con nuevas sustancias hasta el momento no consideradas, con características estructurales propias y distintas a las hasta entonces requeridas para los disruptores conocidos. Con anterioridad a estas fechas, los xenoestrógenos eran el grupo mayoritario y compartían una característica estructural común, contener en su estructura molecular uno o más átomos de cloro.

Muchos de los disruptores endocrinos *clásicos* están incluidos en las listas de los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y desde 1995 reciben una atención especial dentro del Programa de Medioambiente de las Naciones Unidas (PNUMA). Éste es el caso de algunos pesticidas organoclorados, las dioxinas, los furanos y los bifenilos policlorados o PCBs. Algunos de los compuestos incluidos bajo esos nombres genéricos son mimetizadores endocrinos, y están bajo sospecha de ser causa de enfermedades que obedecen a mecanismos hormonales, en las especies animales e incluso en humanos. Esos mismos compuestos químicos habían sido denunciados frecuentemente por su toxicidad, ecotoxicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad en diferentes sistemas y modelos experimentales. El grado de presencia medioambiental es tal, que hoy día puede decirse, que no hay especie animal que no haya estado expuesta, en mayor o menor grado, al DDT y a los PCBs.

A la lista de los disruptores endocrinos *clásicos* se han unido otros nuevos compuestos utilizados en productos que se emplean en muy variadas actividades de la vida moderna. Por ejemplo, el grupo de los alquilfenoles como p-nonilfenol, utilizados como aditivo del plástico poliestireno, como componentes de detergentes industriales o como inertes en la formulación de pesticidas y incluso con aplicaciones farmacológicas como espermicida. El descubrimiento de la estrogenicidad de los alquilfenoles fue seguido de la demostración en 1993, de un caso similar de contaminación por material plástico, en este caso el policarbonato, cuyo monómero base, resultó ser el compuesto químico, bisfenol-A. El Bisfenol-A era liberado al agua destilada contenida en botellas de plástico policarbonato, en el momento de su tratamiento rutinario en autoclave con el fin de esterilizarlo. También está presente en las latas de conserva con recubrimiento interior de resina epóxi, los selladores dentales, los biberones de policarbonato y los pegamentos de dos componentes. El Bisfenol-A, al igual que el nonilfenol, es capaz de estimular el crecimiento *in vitro* de células del tejido mamario humano y el crecimiento uterino en ratas ovariectomizadas, mimetizando en ambos casos, el efecto de los estrógenos naturales.

Nuevas investigaciones han expandido la lista de los nuevos disruptores endocrinos, que incluye ahora compuestos como bisfenoles clorados, ftalatos, parabenes y otros compuestos químicos presentes en la formulación de filtros ultravioletas como 3-benzofenona, homosalato HMS, 4-metilbencilidencarbono, octilmetoxicinamato o ácido dimetil-*p*-aminobenzoico (Routledge *et al.*, 1998, Schlumpf *et al.*, 2001). La exposición humana a estos nuevos DEs es un hecho preocupante debido a la universalidad del uso de estos nuevos disruptores y al lugar que ocupa la cosmética en la sociedad actual.

Según comentarios de los investigadores, las predicciones sobre la expansión de esta lista de DEs parecen estar fundadas, ya que: a) el número de sustancias químicas investigadas en cuanto a su toxicidad hormonal es mínimo, si se tiene en cuenta el gran número de compuestos químicos sintetizados por la industria; y b) las actividades hormonales investigadas se han limitado a la aplicación de unos pocos tests de estrogenicidad y androgenicidad y no se ha incluido aún la investigación sistemática de efectos sobre otros sistemas hormonales como tiroides, suprarrenales, etc. (SANCO 1998; Ashford and Miller 1998; Colborn and Clement, 1992).

En la siguiente tabla se muestran algunos ejemplos de sustancias químicas incluidas en el listado de disruptores endocrinos.

Compuestos químicos incluidos en el censo de disruptores endocrinos

Compuestos	Usos
DDT y sus metabolitos o,p'-DDT p,p'-DDT o,p'-DDD p,p'-DDD p,p'-DDE	Pesticida El DDT fue prohibido en 1972
Dieldrín	Pesticida Prohibido en USA en 1974
Clordecona (Kepona)	Pesticida Prohibido en USA en 1977
Endosulfan y derivados α -endosulfán β -endosulfán Endosulfán-éter Endosulfán-diol	Pesticidas en uso
Metoxicloro e hidroximetabolitos Toxafeno	Pesticida Pesticida Prohibido en USA en 1982
Alquilfenol polietoxilados (n<2)	Surfactantes industriales presentes en detergentes; componentes de plásticos con propiedades antioxidantes y/o maleables
Alquilfenoles (R>4 carbonos) p-nonilfenol p-octilfenol Ftalatos: n-butilftalato Benzilbutilftalato Bisfenol A y compuestos relacionados	Plastificantes del PVC Cosméticos Precusores de resina epoxi; subproductos de plástico tras digestión microbiana
Bisfenol F Bisfenol AF Butilhidroxianisol (BHA) PCB	Antioxidante Transformadores eléctricos Prohibidos en 1970
Fenilfenol Acido amsónico PBBs PBDEs	Limpiadores, desinfectantes Blanqueadores Retardadores de llama Retardadores de llama

DDT: diclorodifeniltricloroetano; DDE: diclorodifenildicloroetileno; DDD: diclorodifenildicloroetano;
PCB: Bifenilos policlorados; PVC: Cloruro de polivinilo
PBBs: Polibromo bifenilos; PBDEs: Polibromo difenil éteres

La principal vía de entrada de los compuestos disruptores endocrinos es la dieta, no sólo por el consumo de productos vegetales contaminados, sino por la ingesta de productos de origen animal (las partes más grasas de estos alimentos para el caso de los compuestos liposolubles), el agua de bebida y el aire. Sin embargo, la diversidad de fuentes de exposición y la gran variedad de compuestos químicos dificulta las medidas de prevención de la exposición.

Los efectos causados por la exposición a disruptores endocrinos varían de una especie a otra y de un compuesto a otro. En general se pueden formular los cuatro enunciados generales siguientes:

- 1) mimetizan los efectos de hormonas endógenas,
- 2) antagonizan la acción normal de las hormonas,
- 3) alteran el patrón de síntesis y metabolismo de hormonas naturales,
- 4) modifican los niveles de los receptores hormonales (Fernández *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que los disruptores endocrinos presentan características particulares que los hacen distintos a otros tóxicos medioambientales y que condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad buscada entre exposición y enfermedad (Colborn *et al.*, 1993; Ohi, 1999). Esta forma especial de toxicidad podría deberse a que:

- 1) El momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto. Los efectos son distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto. Si actúan durante un período crítico, como por ejemplo en los primeros estadios de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen lesiones irreversibles.
- 2) Los efectos pueden no aparecer en el momento de la exposición. Las consecuencias se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto. El desarrollo anormal no se expresa necesariamente en el nacimiento; sus efectos pueden permanecer latentes durante años o hacerse patentes en la descendencia en lugar de en los individuos expuestos.

- 3) No existe un umbral de concentración preciso para el desarrollo del efecto toxicológico, o al menos, es e nivel de concentración es diferente al reconocido como límite de seguridad, para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.
- 4) Son el resultado de la acción combinada de diversos compuestos que pueden desencadenar una respuesta sinérgica, antagónica o simplemente aditiva.

Aunque cualquier sistema hormonal es susceptible de ser dañado por la acción de los disruptores endocrinos, lo cierto es que una de las acciones mejor documentada es su capacidad de mimetizar o bloquear el efecto de los estrógenos. La potencia estrogénica de estos compuestos es muy variable y abarca desde mimetizadores tan potentes como el mismo estradiol, a débiles agonistas que tan sólo tienen actividad parcial y a muy altas concentraciones (Olea, 1996; Olea *et al.*, 1999).

Todo esto ha llevado a considerar a esta clase de moléculas, dentro de la endocrinología toxicológica, como compuestos xenobióticos y para aquellos compuestos que interfieren directamente sobre el mecanismo de acción de los estrógenos sexuales como estradiol, xenoestrógenos, independientemente de su estructura química, procedencia y aplicaciones (Olea *et al.*, 1996).

Sin embargo las evidencias de la asociación entre exposición y enfermedad están siendo más reticentes. Miller y Sharpe (1998) enunciaron con gran acierto algunas de las razones que dificultan el establecimiento de una relación de causalidad: a) la baja potencia hormonal de los compuestos químicos señalados como DEs, sobre todo cuando se compara con la potencia de las hormonas naturales; b) el desconocimiento absoluto del efecto combinado de estas sustancias químicas; c) las lagunas en el conocimiento de los mecanismos de acción de los DEs sobre los distintos órganos diana, y d) el intento, con frecuencia asociado al fracaso, de asociar exposición a DE con enfermedades de causa multifactorial, de presentación transgeneracional, manifestadas, en muchos casos, en forma de fallo funcional de alguna actividad orgánica y de presentación tardía.

Para llegar a identificar cuáles son los elementos que contribuyen al riesgo de padecer problemas reproductivos, carcinogénicos, neurotóxicos e inmunológicos, asociados a la exposición a disruptores endocrinos, se debe seguir el modelo de la estimación del riesgo (Hens 2001). En tal sentido, se utilizan como criterios prioritarios: el volumen de producción del compuesto analizado, su persistencia en el ambiente, su bio disponibilidad, su efecto (comprobado o potencial) y su nivel de acción sobre las personas o la biota, en relación con el grado de exposición y la susceptibilidad de los mismos.

A este respecto, en la Conferencia de Aronsborg (2001) se señalaron cuatro ejes principales:

- 1) Definir las prioridades básicas en el marco de efectos biológicos derivados de la exposición a compuestos DEs, incluyendo la salud humana.
- 2) Articular la tarea constituyendo una red internacional, y generando una base de datos global.
- 3) Revisar y desarrollar nuevos ensayos biológicos para la detección de compuestos DEs y métodos de validación.
- 4) Armonizar criterios para la caracterización del riesgo y peligro asociado a compuestos DEs, incorporando endocrinólogos clínicos y desarrollando estudios epidemiológicos, dado que son escasos los estudios humanos sobre base poblacional.

Dicho modelo de estimación del riesgo, aplicado bajo condiciones específicas, puede ser empleado en diagnóstico endocrino para esclarecer los aspectos más importantes pendientes de solución: a) la disponibilidad de tests validados para identificar DEs; b) el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales actúan los DEs; c) la posibilidad de medir la exposición integrada de diferentes DEs agrupados con una acción hormonal común; d) el establecimiento de relaciones dosis-respuesta; e) la identificación de la dosis a la cual no es presumible un efecto adverso; f) la cuantificación y la cualificación de los efectos adversos, y g) la identificación concreta de aquellos DEs que afectan a la salud humana.

Diferentes organismos internacionales han propuesto baterías de tests toxicológicos y bioensayos *in vitro* e *in vivo*, de muy diversa índole para la

identificación de DEs (OECD, 1997). A pesar del esfuerzo realizado en los últimos años en la evaluación toxicológica de los compuestos químicos, se ha constatado que los efectos deletéreos sobre el sistema hormonal atribuidos a algunas de estas sustancias de interés, no podrán ser objetivados con los tests toxicológicos actualmente en uso (Olea *et al.*, 2000). Hay varias razones que podemos apuntar para explicar este fracaso. En primer lugar, un compuesto químico puede tener efectos relacionados con disrupción endocrina a dosis inferiores a las actualmente aceptadas como Nivel sin Efecto Adverso Observable (NOAEL). Por otra parte, muchos de los tests de toxicidad no están diseñados para detectar los efectos que se producen tras la exposición en los primeros momentos del desarrollo. Asimismo, son muy pocos los tests que evalúan el efecto combinado de varios compuestos químicos. Por último, si los DEs actúan durante el desarrollo y afectan en períodos críticos a la homeostasis hormonal, las alteraciones de la función endocrina pueden manifestarse en cualquier órgano y en cualquier momento de la vida del individuo.

La complejidad de la caracterización toxicológica de las sustancias químicas que actúan como DEs se recrudece ante la necesidad de predecir efectos que vayan más allá de la simple demostración de acción hormonal y que se implican en la patogenia de las enfermedades de base endocrina (Ashford and Miller, 1998). En principio, se debería desarrollar un sistema de cribado y de ensayos biológicos apropiados, que permitan clasificar los compuestos químicos por su capacidad para mimetizar o antagonizar a las hormonas naturales. A continuación, se deberían establecer tests toxicológicos que incluyeran períodos de observación prolongados en las distintas fases del desarrollo animal y con vigilancia expresa de los efectos transgeneracionales.

1.5 BIOMARCADORES

Con objeto de dar una solución al problema de la estimación de la exposición conjunta a varios DEs, se ha sugerido cuantificar en muestras biológicas y medioambientales el mayor número de compuestos químicos, estudiar las interacciones existentes entre diversos compuestos químicos, evaluando el efecto resultante de la exposición conjunta de agonistas y

antagonistas hormonales, y desarrollar biomarcadores de exposición y efecto para los compuestos hormonalmente activos.

En particular se han propuesto tres tipos diferentes de biomarcadores en relación con la disrupción endocrina:

- Los **biomarcadores de exposición**: hacen referencia a la cuantificación de DEs, o sus metabolitos, y a la interacción de cualquiera de ellos con células o moléculas diana, que puedan ser identificados y cuantificados en un compartimiento corporal determinado.
- Los **biomarcadores de susceptibilidad**: definen la capacidad del organismo, inherente o adquirida, para adaptarse a las consecuencias derivadas de la exposición a DEs.
- Los **biomarcadores de efecto**: se definen en términos de la alteración hormonal, bioquímica, fisiológica o de cualquier otro tipo que pueda ser medida y cuantificada y que, dependiendo de su magnitud, pueda ser reconocida como una desviación del patrón normal, un efecto adverso o un signo de enfermedad.

Entre los principales análisis bioquímicos que se aplican en estudios de disrupción endocrina, se pueden citar:

- a) Determinaciones de los niveles hormonales propios de cada especie: gonadotropinas (GnRH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), 17β estradiol (E2), testosterona (T), entre otros (Shugart, 1996; Goodbred *et al.*, 1997; Schmitt and Dethloff, 2000).
- b) Niveles de proteínas asociadas con compuestos estrogénicos, como por ejemplo, la glicofosfolipoproteína V TG que se expresa en vertebrados no vivíparos (Solé *et al.*, 2003; Denslow *et al.*, 1999; Kime *et al.*, 1999).
- c) Sistemas que asocian la respuesta específica a estógenos con sistemas señaladores, como el sistema de expresión de luciferasa (ERE/Gal4), el ensayo de crecimiento de leveduras estrógeno inducibles, el ensayo de estrogenicidad E-Screen para la medida de

la carga estrogénica total efectiva (TEXB), que asigna un valor de estrogenicidad a las muestras biológicas (tejido adiposo, sangre, leche materna, placenta, etc.) como biomarcador de exposición y de efecto (Kendall *et al.*, 1998; Olea *et al.*, 2002; Blundell 2003; Oberdorster and Chee 2000).

Entre los biomarcadores que han sido tomados en cuenta para estudios de disrupción endocrina en organismos silvestres, podemos destacar: alteraciones en la aromatasa citocromo P-450, alteración de los órganos reproductores (ovario-testículo), así como malformaciones e inviabilidad de los gametos (óvulos-espermatozoides). Existe un método muy particular utilizado solo para organismos ovulíparos u ovíparos, para la determinación cuantitativa de la vitelogenina, que es una fosfolipo-glicoproteína sérica (300-600 kDa nativa) precursora de la formación de la yema del huevo.

La síntesis de vitelogenina se produce por la estimulación de receptores estrogénicos hepáticos, por la acción de la hormona 17β estradiol (E2), o bien por compuestos xenoestrógenos. Tanto en machos como hembras, e incluso juveniles inmaduros, poseen dichos receptores, pero en condiciones normales sólo las hembras son capaces de producirla. La síntesis de vitelogenina en machos o juveniles, o incluso en hembras no-vitelogénicas, provee un bioindicador de exposición a disruptores ambientales (Shugart *et al.*, 1996; Denslow *et al.*, 1999; Kime *et al.*, 1999).

Soto *et al.* (1997) propusieron que sería más útil cuantificar la actividad biológica resultante de la exposición conjunta a DES que medir individualmente los niveles de determinados compuestos químicos. Nuestro grupo de trabajo adoptó hace tiempo esta aproximación y desarrolló un sistema para estimar la carga estrogénica de xenobióticos en muestras de suero humano (Sonnenschein *et al.*, 1995), usando el test E-Screen y un bioensayo *in vitro* de probada eficacia para identificar xenoestrógenos (Soto *et al.*, 1992). Desde entonces, nuestro grupo de trabajo utiliza el bioensayo E-Screen para la medida de la **carga estrogénica total efectiva (TEXB)**, que asigna un valor de estrogenicidad a las muestras biológicas (tejido adiposo, sangre, leche materna, placenta, etc.) y convierte un biomarcador de exposición, tipo dosis interna, en un marcador de

equivalencia biológica y por ende de efecto biológico (Rivas *et al.*, 2001). Este marcador está siendo aplicado con éxito en estudios epidemiológicos de muy diferente índole, en los que la exposición a disruptores estrogénicos se cuantifica mediante la medida individual de residuos químicos y, al mismo tiempo, a través de la estimación de la actividad estrogénica del extracto tisular. La aplicación del concepto de biomarcador de exposición a TEXB, y a otros ensayos de características similares, puede ser excesivamente restrictivo, puesto que con su expresión no nos limitamos a indicar exposición si no que establecemos un vínculo con el efecto biológico producido. Por eso creemos que la medida de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) en muestras biológicas es, al mismo tiempo, un marcador de exposición y un marcador subrogado de efecto.

1.6 ALGUNAS CONSECUENCIAS DERIVADAS DE LA EXPOSICIÓN INTRAUTERINA A DES

1.6.1 PREMATURIDAD

La etapa embrionaria es especialmente susceptible a la interferencia de compuestos químicos disruptores endocrinos; es por ello que estudios recientes se han centrado en la investigación de la exposición medioambiental a estas sustancias y su relación con la presentación de prematuridad, entendiendo como tal al nacimiento que se produce antes del término de la gestación (>37 semanas, de acuerdo con la OMS).

Por ejemplo en un estudio de España, la cohorte de recién nacidos de Flix, se encontró que los niños prematuros presentaban niveles más altos de todos los COPs analizados al nacimiento, en comparación con los no prematuros, aunque sólo se encontraron asociaciones significativas entre prematuridad y exposición a pp'-DDE (diclorodifenildicloroetileno) (Ribas-Fito *et al.*, 2002).

1.6.2 BAJO PESO AL NACER Y RETARDO DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO

Según la OMS, bajo la denominación de bajo peso al nacer se engloban a aquellos recién nacidos que tienen menos de 2.500 g ramos. Sin embargo, además del peso hay que tener en cuenta la edad gestacional, ya que muchos bebés nacen pequeños para su edad gestacional, entendiendo como tal, niños cuyo peso está por debajo del percentil diez para una determinada semana de gestación o con un peso al menos dos desviaciones estándar ($\leq 2DE$) por debajo de la media de una población de referencia, para esa edad gestacional. El concepto de bajo peso al nacer, difiere del concepto de retardo en el crecimiento fetal intrauterino (IUGR), ya que este último se refiere a la disminución en la velocidad de crecimiento del feto (Lee *et al.*, 2003).

Algunos especialistas han observado que se ha incrementado la tasa de niños con bajo peso al nacer, incluso entre el grupo de madres de menor riesgo, es decir, aquellas en el rango de edad de 20-34 años (Pew Environmental Health Commission, 1999). Los investigadores empiezan a sospechar que además del consumo de alcohol, el tabaco y las drogas, asociados con bajo peso al nacer (Day *et al.*, 1990; Shu, 1995), otros factores medioambientales podrían estar también jugando un papel etiológico. Así Schade y Heinzow encontraron asociación entre la exposición prenatal a HCB y β -HCH y bajo peso al nacer (Schade and Heinzow, 1998), al igual que entre la exposición prenatal a DDE y bajo peso al nacer (Longnecker *et al.*, 2001; Weiskopf *et al.*, 2005). Nuestro grupo de investigación encontró asociación entre el número de pesticidas cuantificados en tejido placentario y el peso al nacer, siendo mayor el número de pesticidas en las placentas de niños que nacieron con un menor peso (López-Espinosa *et al.*, 2007).

En un estudio de casos-controles, llevado a cabo en la India por Siddiqui y colaboradores (2003), comprobaron que la exposición a determinados pesticidas organoclorados (α - γ -HCH y p,p'-DDE) durante el embarazo, podía incrementar el riesgo crecimiento intrauterino retardado (IUGR). Sin embargo, también se han publicado numerosos artículos en los que no se ha podido establecer una asociación entre el peso al nacer, semanas de gestación, IUGR, perímetro

cefálico y exposición a determinados pesticidas organoclorados. Tal es el caso del estudio de Rhainds y colaboradores, en Québec (Canadá), en el que no se observó una correlación positiva entre las concentraciones de DDE en sangre de cordón y peso al nacer (Rhainds *et al.*, 1999). Tampoco Longnecker y colaboradores pudieron establecer una asociación positiva entre las concentraciones de DDE en sangre materna y la probabilidad de tener un niño pequeño para la edad gestacional (Longnecker *et al.*, 2001).

En España, Ribas-Fito y colaboradores pudieron establecer una asociación positiva entre IUGR y los niveles de HCB en sangre de madre y de cordón, pero no pudieron encontrar una asociación positiva entre HCB y el peso al nacer o el tamaño de la circunferencia de la cabeza (Ribas-Fito *et al.*, 2002).

1.6.3 ABORTOS ESPONTÁNEOS

Se considera aborto espontáneo a la pérdida espontánea de un feto antes de la semana 20 del embarazo; las pérdidas después de esa fecha se denominan partos prematuros. Se calcula que la tasa de aborto espontáneo es alrededor del 15 al 20%. La mayoría se producen durante el primer trimestre del embarazo como consecuencia de anomalías en el cariotipo fetal (Korrick *et al.*, 2001; Katz, 2007).

Aunque los DEs pueden afectar el desarrollo normal del embrión/feto resultando en desórdenes congénitos y a veces en abortos espontáneos (Nicolopoulou-Stamati and Pitsos, 2001), los datos epidemiológicos que tratan de establecer esta asociación son limitados y poco concluyentes.

Saxena *et al.*, (1980a), detectaron niveles más altos de compuestos organohalogenados en la sangre de madres con abortos espontáneos. De la misma forma, el estudio realizado por Gerhard y colaboradores encontró concentraciones más altas de organoclorados en mujeres con abortos repetidos comparadas con la población de referencia (Gerhard *et al.*, 1998). Sin embargo, no todos los estudios han podido establecer estas asociaciones. Por ejemplo, en EE.UU., una población expuesta ocupacional y/o medioambientalmente a pesticidas, no mostró tener un riesgo incrementado de abortos espontáneos, al contrario, presentó un menor riesgo (Willis *et al.*, 1993). Tampoco en Italia se

encontró una correlación entre las concentraciones en suero de HCB y abortos espontáneo (Leoni *et al.*, 1986).

1.6.4 SÍNDROME DE DISGENESIA TESTICULAR

Los estrógenos tienen un papel importante en el sistema reproductor masculino desarrollando funciones específicas durante el desarrollo fetal masculino. Tanto la diferenciación sexual masculina como la reproducción, son dependientes de un perfecto equilibrio en el cociente andrógenos/estrógenos. Ante esta premisa, se puede comprender fácilmente que el desarrollo testicular, la esteroidogénesis y otros aspectos reproductivos masculinos, son susceptibles de ser alterados por los disruptores endocrinos xenoestrógenicos (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Sharpe, 1995; Vidaeff and Sever, 2005).

Skakkebaek *et al.*, (2001), publicaban un artículo en la revista *Human Reproduction* en el que revisaban de forma por menorizada las pruebas que sugieren que una serie de alteraciones de la salud reproductiva masculina tienen como base patofisiológica común, cambios específicos que ocurren durante el desarrollo fetal del testículo. La propuesta de Skakkebaek y sus colaboradores es, que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo sus variaciones de los niveles hormonales pueden conducir a una disfunción orgánica y, en última instancia, a presentar enfermedad clínica.

En la hipótesis patogénica tanto los factores ambientales, entre los que se incluyen las sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal (disruptores endocrinos), como algunos defectos genéticos, afectan a la funcionalidad de las células de Sertoli o de Leydig (Rajpert-De Meyts *et al.*, 2000). En el primero de los casos, si la funcionalidad de las células de Sertoli estuviese alterada, daría lugar a una alteración importante de la diferenciación de las células germinales, que en última instancia se manifestaría clínicamente con pobre calidad seminal o mediante una transformación maligna hacia cáncer testicular. Por otro lado, la disminución de la función de las células de Leydig traería consigo una insuficiencia androgénica que se manifestaría clínicamente como hipospadias y/o criptorquidia. Para añadir más complejidad al enunciado patogénico, se establecen relaciones de conexión entre las dos grandes vías

(Sertoli y Leydig) y se propone que la expresión de los síntomas clínicos variaría con la severidad del síndrome, de tal manera que algunos individuos presentarían más patología que otros, pero siempre dentro del ámbito del cuadro descrito.

Quizás una de las repercusiones mayores de la hipótesis planteada por el equipo danés, radica en el hecho de que los estudios epidemiológicos en calidad espermática, criptorquidia e hipospadias y cáncer de testículo, deberían considerar aquellos aspectos que permitieran establecer una asociación de causalidad entre estas patologías y factores medioambientales (García-Rodríguez *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1998). A este respecto, es de capital importancia el papel otorgado a la exposición fetal a sustancias químicas con actividad hormonal, ya que tanto los datos observacionales en animales como la epidemiología humana y los estudios de laboratorio, orientan sobre el papel de las hormonas y sus mimetizadores y antagonistas sobre cada una de las enfermedades de interés (Sharpe and Skakkebaek, 1993). En palabras de Skakkebaek, la hipótesis de causalidad de las hormonas medioambientales o disruptores endocrinos es relevante y plausible y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES) o las alteraciones en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenohormonas. El hecho de que estemos asistiendo a un incremento importante de estas patologías en determinadas áreas geográficas y que estos cambios estén ocurriendo en el curso de unas pocas generaciones, orienta sobre la búsqueda de que es tan actuando causas ambientales (Toppari *et al.*, 1996), quizás, sobre un fondo de predisposición genética que implicaría alguna forma de susceptibilidad individual (Carlsen *et al.*, 1992).

1.6.5 CRIPTORQUIDIA

El término criptorquidia proviene de las raíces griegas *kryptos* (oculto) y *orchis* (testículo). En términos generales se considera que un testículo es criptorquídico cuando no se ha colocado en su bolsa escrotal, debido a un descenso defectuoso o incompleto del testículo, desde su origen retroperitoneal

hasta su posición definitiva en el escroto. El concepto engloba situaciones anormales en el descenso normal del testículo de una forma uni o bilateral. En general, la localización más frecuente del testículo no descendido es junto al cuello del escroto o inmediatamente por fuera del anillo inguinal externo (Huston *et al.*, 1997).

La criptorquidia es uno de los problemas urológicos pediátricos más frecuentes con una tasa al nacimiento entre 3-4% en recién nacidos a término y hasta del 30% en prematuros, en los que el proceso de descenso normal aún no se ha completado (Berkowitz *et al.*, 1995; Moller and Weidner, 1999; Paulozzi 1999). Los datos parecen indicar un incremento en el número de criptorquidias en las últimas décadas en países tales como Reino Unido, Dinamarca, o EE.UU. (Paulozzi, 1999; Boisen *et al.*, 2004), si bien en los estudios son de difícil comparación. Además, son pocos los estudios que usando idéntica definición y técnicas de exploración, ayudan a establecer variaciones geográficas y/o temporales que permitan establecer hipótesis de exposición medioambiental (Olmos, 2005).

Se han determinado tres diferentes causas en el desarrollo de criptorquidismo: causas genética, mecánica, y hormonal. Existe una predisposición genética para el desarrollo de criptorquidia, apareciendo en el 6% de los niños con padres criptorquídicos (Martinetti *et al.*, 1992). Una de las causas de esta enfermedad es la aparición de hernias umbilicales, alteraciones en la musculatura abdominal y otros procesos, que tienden a disminuir la presión intraabdominal e impiden el descenso (Husmann & Levy, 1995). En cuanto a las causas hormonales, es necesario un eje hipotálamo-hipofisario intacto para el normal descenso del testículo (Olmos, 2005).

Después publicó un estudio en 1984 en el que establecía una asociación significativa entre el consumo de medicamentos con actividad estrogénica durante el embarazo y el riesgo de criptorquidismo (Depue, 1984). Normalmente, estos productos son suministrados en altas dosis, lo que hace que sus efectos sean más fácilmente observables. En cambio, los efectos producidos por la exposición ocupacional y medioambiental a disruptores endocrinos es más difícil de investigar, ya que la sobreexposición a sustancias DEs que no poseen origen

farmacológico no es usual (Myllynen *et al.*, 2005). Hay varios estudios orientados a relacionar la posible asociación entre la exposición medioambiental y/o ocupacional y la aparición de criptorquidia (Fernández *et al.*, 2007).

Algunos estudios han revelado que la exposición de la madre a DES durante periodos previos a la concepción o el primer trimestre del embarazo debida a actividades agrícolas, suponía un incremento del riesgo de 3 veces, de tener un hijo con una malformación (García *et al.*, 1999; Weidner *et al.*, 1998). Otros estudios sugerían que la presencia de malformación (criptorquidia y/o hipospadias) estaba relacionada con la exposición del padre, trabajador en la agricultura (Garry *et al.*, 1996; Kristensen *et al.*, 1997a; Rueda-Domingo *et al.*, 2001; Wang and Wang, 2002; Pierik *et al.*, 2004; Irgens *et al.*, 2000). Un estudio de casos-contróles en recién nacidos con hipospadias y/o criptorquidia, llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo, mostró que el efecto estrogénico combinado, correspondiente a la exposición a contaminantes medioambientales acumulados en el tejido placentario, era un factor de riesgo de malformación (Olmos, 2005).

Sin embargo, no todos los estudios confirman esta hipótesis. Así Weidner y colaboradores encontraron que madres trabajadoras en horticultura, tenían más riesgo de tener hijos con criptorquidia pero no con hipospadias (Weidner *et al.*, 1998), y no influía la ocupación del padre en el riesgo de padecer dichas malformaciones. Tampoco se encontró una asociación estadísticamente significativa entre exposición intrauterina a pesticidas organoclorados y la aparición de criptorquidia y/o hipospadia en los recién nacidos de estudios realizados en EE.UU. (Longnecker *et al.*, 2002) y en Colombia (Restrepo *et al.*, 1990), y entre hipospadias y exposición ocupacional de la madre a compuestos con actividad disruptora endocrina (Aho *et al.*, 2000 y 2003; Vrijheid *et al.*, 2003).

Estos resultados llevan a la conclusión de que los estudios epidemiológicos encaminados a establecer relaciones de causalidad, entre la exposición a contaminantes individuales y el riesgo de enfermedad, no son suficientes para clarificar el papel de los xenoestrógenos en malformaciones urogenitales. Se necesita una valoración más exhaustiva de la exposición, mediante biomarcadores específicos de exposición y efecto (Dolk & Vrijheid 2003; Silva *et al.*, 2002; Vidaeff & Sever 2005).

1.6.6 HIPOSPADIAS

Entre la octava y la catorceava semana de gestación tiene lugar la fusión de los pliegues uretrales y la canulación del glande del pene del embrión, bajo la influencia de las hormonas androgénicas producidas por los testículos fetales (Moller and Weidner, 1999). Si dichos pliegues no se fusionan o se produce una anormal canulación del glande, entonces da lugar a la aparición de hipospadias.

Los datos de prevalencia de hipospadias al nacimiento varían considerablemente en la literatura, desde 0,37 hasta 41 por cada 10.000 niños, diferencias debidas a las posibles discrepancias en la valoración e inclusión de aquellos casos menos severos (Paulozzi, 1999; Olmos, 2005).

Estudios en países como Hungría, Reino Unido, Suiza, España, Dinamarca, Finlandia, Nueva Zelanda, EE.UU. y Australia han demostrado un aumento en el número de casos de hipospadias en las últimas décadas (Giwerzman *et al.*, 1993; Paulozzi *et al.*, 1997; Dolk, 1998; Nelson *et al.*, 2005). Sin embargo, otros estudios no han encontrado incremento de la prevalencia (Virtanen *et al.*, 2001; Carmichael *et al.*, 2003; Martínez-Frias *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2005).

Las causas que originan la hipospadias y las razones para el posible aumento en el número de casos no han sido identificadas, aunque existe un acuerdo en que participan tanto factores genéticos como ambientales. Dentro de los primeros, es frecuente observar familias de hipospádicos y aunque no se han logrado definir los mecanismos hereditarios se han encontrado ciertas anomalías en los cromosomas sexuales (Paulozzi *et al.*, 1997; Aschim *et al.*, 2004). Con respecto a las causas ambientales, una de las hipótesis es que los contaminantes medioambientales se transfieren a través de la placenta bloqueando la señal bioquímica que inicia la formación del tubo. Algunos compuestos antropogénicos ampliamente distribuidos en el medio ambiente son capaces de interferir con la testosterona, implicada en la formación de la uretra (Paulozzi *et al.*, 1997; Moline *et al.*, 2000).

Las etiologías de la criptorquidia e hipospadias son compartidas en parte (Akre *et al.*, 1999), por eso no es de extrañar que al igual que para el caso de criptorquidia, exista una asociación entre la exposición ocupacional de la madre

en agricultura y tener un niño hipospádico (Garry *et al.*, 1996; Kristensen *et al.*, 1997a; Olmos, 2005). También la exposición a pesticidas organoclorados de la madre, cuantificada en sangre, ha sido asociada con un incremento en el riesgo de aparición de hipospadias (Longnecker *et al.*, 2002), aunque no todos los estudios han sido capaces de demostrar dicha asociación (Bhatia *et al.*, 2005). Asimismo, otros estudios no han encontrado asociación entre hipospadias y exposición ocupacional de la madre a compuestos disruptores endocrinos (Vrijheid *et al.*, 2003). La exposición ocupacional del padre fue asociada con hipospadia en un estudio conducido por Irgens y colaboradores (Irgens *et al.*, 2000).

1.6.7 EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

CENTRAL

A lo largo de la tercera semana del embarazo se forma la placa neural en la superficie del ectodermo del embrión, la primera estructura específica y exclusiva del sistema nervioso, de la que surgirán enseguida dos nuevas formaciones: el tubo neural, que originará el sistema nervioso central, y la cresta neural, que dará lugar al sistema nervioso periférico. A partir de este momento, el sistema nervioso irá perfilando nuevas estructuras e incrementando su masa.

Hacia la mitad del embarazo las células transmisoras del impulso nervioso (neuronas) comienzan a cubrirse de una grasa denominada mielina. Este proceso, llamado mielinización, proseguirá a lo largo del primer y segundo año de edad. Posteriormente continúa a buen ritmo el crecimiento de las prolongaciones neuronales (axones y dendritas) y la elaboración de interconexiones entre las células nerviosas (sinapsis) (Carlson, 1999).

Exposiciones que producen efectos transitorios en el cerebro de los adultos, pueden producir pérdidas irreversibles en el feto (Krimsky, 2000). El cerebro posee un 50% de grasa por peso seco y tras el nacimiento, las partes con grasa del cuerpo compiten con el cerebro por atraer sustancias liposolubles y es más probable que se depositen sustancias liposolubles a nivel encefálico (Suzuki and Martin, 1994; Harry, 1994). Además, el feto es deficitario en los

sistemas de detoxificación lo que contribuye a una mayor persistencia circulatoria de los tóxicos liposolubles (Steingraber, 2001).

Durante las primeras semanas de gestación algunas sustancias químicas pueden interferir con la hormona tiroxina (T_4), la cual es producida en la glándula tiroidea de la madre y es necesaria para el desarrollo normal del cerebro. Si la acción de la tiroxina es bloqueada, determinadas funciones cognitivas pueden verse afectadas, tales como la menor inteligencia, el retraso mental, o las anomalías en el comportamiento. Muchas de las sustancias consideradas como disruptoras endocrinas, son capaces de interactuar con la producción y transporte de la hormona T_4 , así como con el enzima que convierte T_4 en T_3 , o bien con la unión de T_3 al receptor.

Nuestro conocimiento sobre el daño que las sustancias químicas producen en el cerebro es muy limitado, por el hecho de que los datos obtenidos con experimentos animales no son siempre extrapolables a lo que ocurriría en el cerebro de un recién nacido expuesto a una neurotoxina en particular. Con objeto de determinar si la exposición a PCBs, tanto transplacentariamente como a través de la lactancia, afectaba al desarrollo de niños de 6 a 12 meses de edad, se siguió el desarrollo mental de una cohorte de niños desde su nacimiento hasta el año de edad en Carolina del Norte, EE. UU, evaluando con el test de Bayle. La exposición transplacentaria a PCBs se asoció con resultados psicomotores más bajos. El estudio de la relación entre exposición transplacentaria a PCBs y los resultados en el IDM (Índice de Desarrollo Mental) demostró objetivamente el efecto deletéreo de la exposición prenatal (Gladen *et al.*, 1988). También apuntan en el mismo sentido otros estudios sobre el desarrollo mental y psicomotor de niños expuestos transplacentariamente a PCBs debido al consumo por parte de las madres de comida contaminada. Tal es el caso de niños japoneses que presentaban coeficientes intelectuales más bajos, apatía y languidez (Harada, 1976) o de niños taiwaneses con retraso y dificultades conductuales (Rogan 1995). En España, un estudio llevado a cabo por Ribas-Fito *et al.*, (2003) en Flix, Tarragona, estableció una asociación entre la exposición transplacentaria a DDE y retraso en el desarrollo mental y psicomotor a la edad de un año; asociación que no se pudo establecer para

HCB. Sin embargo, en Oswego, Nueva York, los niveles de DDE en sangre de cordón no se asociaron con retraso en el desarrollo mental de niños de 12 meses de edad (Darvill *et al.*, 2000).

1.6.8 OBESIDAD

La epidemia actual de obesidad podría ser explicada no sólo por el hecho de un cambio en el incremento del aporte calórico y/o disminución de la actividad física; existen algunos datos que hacen pensar en la posibilidad de que compuestos químicos, disruptores endocrinos, pudieran estar desempeñando algún papel en tal sentido (Baillie-Hamilton 2002).

Se ha observado que diferentes sustancias, utilizadas a dosis que no condicionan ningún efecto tóxico evidente, llegan a condicionar un aumento de peso en los animales. Entre estas se incluyen: los metales pesados, algunos disolventes, bifenoles policlorados, talatos y bisfenol A. Existen datos experimentales que indican que la exposición a contaminantes estrogénicos ambientales podrían alterar la vía de desarrollo de los adipositos. En cualquier caso, hemos de reconocer que hasta este momento, existen muchas más preguntas que respuestas (Heindel 2003).

1.6.9 PUBERTAD PRECOZ

En los últimos años se ha evidenciado un adelanto de la pubertad respecto a los datos de referencia (Olea and Zuloaga, 2001). Entre las causas que se han aducido como justificantes de ese adelanto de la pubertad figuran las siguientes: incremento de la prevalencia de la obesidad, causas sociales (ausencia del padre biológico y la presencia de otro hombre adulto en el hogar familiar) y la exposición durante el embarazo o la infancia a sustancias químicas con actividad hormonal (Teilmann *et al.*, 2002). Existen estudios que han probado la implicación de DDT y sus derivados, en el desencadenamiento de pubertad precoz, debido a su acción estrogénica que podría condicionar una activación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Parent *et al.*, 2003).

1.6.10 ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una enfermedad que consiste en un crecimiento aberrante de las células endometriales fuera del útero, fundamentalmente en los ovarios, intestino, recto, vejiga y el delicado revestimiento de la pelvis, causando dolor, sangrado irregular y, con frecuencia, infertilidad. Puede afectar a cualquier mujer menstruante desde el momento de su primer periodo hasta la menopausia o, en ocasiones, incluso hasta más allá de ésta. Se estima que alrededor del 10 al 15% de las mujeres que menstrúan entre los 25 y los 44 años padecen endometriosis.

La causa de la endometriosis es desconocida, aunque se han propuesto un gran número de teorías. Entre las hipótesis que se han barajado está la de la exposición a compuestos con acción estrogénica. Algunos estudios informan sobre un aumento del riesgo de padecer endometriosis, en mujeres que habían tomado anticonceptivos orales, mientras que se observa una disminución del riesgo, en aquellas que los estaban tomando en ese momento (Vessey *et al.*, 1993). Asimismo, se encontraron evidencias de un aumento de la frecuencia en la descendencia femenina que había estado expuesta al DES durante la vida uterina (Berger and Alper, 1986). También se ha referido la existencia de relación entre endometriosis y altos niveles de PCBs en plasma. En este caso, al igual que en las otras situaciones ya señaladas, se hace necesario llevar a cabo más estudios epidemiológicos dirigidos a establecer la posible relación entre los xenobióticos hormonalmente activos y la endometriosis.

1.6.11 CÁNCERES EN TEJIDOS DEL APARATO REPRODUCTOR

La exposición intrauterina a determinados COPs se ha asociado con cáncer de mama, próstata, ovario y testículo (Koifman *et al.*, 2002).

Por ejemplo, la etiología del cáncer de mama tiene un fuerte componente hormonal y está influenciada por la vida reproductiva de la mujer. Cuando valoramos el riesgo potencial de los xenoestrógenos debemos considerar factores como el tiempo y el tipo de exposición. La evidencia más convincente que relaciona el riesgo de cáncer de mama con la exposición a disruptores endocrinos, la presenta la administración de DES (dietilestilbestrol) como

antiabortivo, en mujeres embarazadas. Como consecuencia de esta exposición, las hijas de estas mujeres presentaron mayor incidencia de adenocarcinoma en vagina y cérvix (Greenberg *et al.*, 1984) y un incremento del 35% en cáncer de mama (Colton *et al.*, 1993). Por otra parte, también ha sido estudiado el uso prolongado de la píldora anticonceptiva y su relación con cáncer de mama (La Vecchia 1992), sin embargo no se ha podido establecer una relación positiva significativa entre el riesgo de cáncer de mama y el tratamiento hormonal. Pero, si se ha comprobado que la terapia hormonal sustitutiva durante la menopausia incrementa la incidencia de cáncer de endometrio (Grady *et al.*, 1992).

Por otra parte y según un grupo de investigadores, la exposición repetida a compuestos con actividad estrogénica (desde exposición a dosis bajas de bisfenol A hasta preparados terapéuticos a base de estradiol), durante el periodo crítico postnatal en animales de experimentación, produce un incremento de la incidencia y la susceptibilidad a transformaciones neoplásicas de la glándula prostática en la edad adulta, (Prins *et al.*, 2007). El resultado final conducía a una manifestación patológica en la próstata en los animales adultos, que progresaba a lesiones neoplásicas con la edad. Estos estudios comprobaron también, que exposiciones a dosis bajas de compuestos medioambientales DEs presentes en el medio ambiente, influyen sobre el epigenoma de la próstata durante el periodo crítico de su desarrollo, que darían lugar con el tiempo a la aparición de enfermedades en la citada glándula (Prins *et al.*, 2007).

Miller y Sharpe (1998) indican que la gran dificultad en establecer relaciones de causalidad entre exposición a DEs y enfermedad tumoral, puede explicarse por las siguientes razones:

- a) Que los niveles anormales de hormonas pueden estar presentes de forma transitoria y sólo en momentos cruciales para su inducción.
- b) Pequeñas diferencias en los niveles hormonales, difíciles de detectar, pueden ser determinantes si se mantienen durante un periodo prolongado de tiempo.
- c) La periodicidad y ciclo de la exposición hormonal.
- d) La sensibilidad del órgano diana a las hormonas, es tan importante como los niveles hormonales.

e) La presentación de cáncer es más dependiente de la combinación de hormonas y tejidos, que de los niveles circulantes.

Sin embargo, ha sido mucho más fácil establecer la relación entre las hormonas y la progresión de un cáncer ya diagnosticado. Así, numerosas experiencias clínicas nos muestran la regresión del cáncer de mama ante el tratamiento con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Dixon *et al.*, 1991) a mujeres premenopáusicas, o la administración de antiestrógenos (Stewart 1989) e inhibidores de la aromatasa (Miller 1997), en el caso de mujeres posmenopáusicas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los expertos internacionales de los comités encargados de definir las bases racionales para el estudio del impacto sobre la salud humana de la exposición a Disruptores Endocrinos (DEs), coinciden en señalar que el establecimiento de los niveles de exposición humana a DEs, es una labor que no puede dilatarse más en el tiempo. Dentro de este aspecto particular, se insiste en la necesidad de desarrollar marcadores de exposición y de efecto, que permitan clasificar a las poblaciones de mayor riesgo y que sirvan de instrumento de cuantificación de la exposición en estudios epidemiológicos de diferente diseño, tanto de carácter poblacional, como geográficos y temporales.

Se ha señalado que desde el momento de la concepción del ser humano y durante la gestación, la exposición a contaminantes químicos medioambientales, puede afectar el desarrollo fetal y determinar la estructuración de los sistemas y su función. Las consecuencias de la exposición temprana pueden hacerse evidentes no sólo en los sistemas no estructurados al nacer, como e l

neurológico, el inmunitario o el sexual, sino también en órganos y aparatos ya estructurados pero cuya función y maduración posterior pueden verse modificados por estas exposiciones ambientales.

Tanto la experiencia en modelos animales como lo observado en situaciones accidentales de exposición humana de carácter agudo, es lo suficientemente concluyente como para sugerir que el efecto es mucho más marcado si la exposición ha ocurrido en las primeras etapas del desarrollo. El rango de alteraciones del desarrollo es tan amplio como el número y variedad de eventos que pueden afectar al crecimiento y desarrollo físico, intelectual, emocional y social del niño. La exposición pre y postnatal a contaminantes ambientales puede tener, por tanto, consecuencias observables al nacimiento (retardo en el crecimiento intrauterino, prematuridad), déficits funcionales (neuroconductuales, inmunológicos, reproductivos) y sobre la salud en etapas posteriores de la vida, incluyendo un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como diabetes, enfermedad cardiovascular o cáncer.

El trabajo experimental y epidemiológico desarrollado por nuestro grupo de investigación ha servido, entre otras cosas, para aplicar en un estudio de casos y controles de malformaciones urogenitales –criptorquidia e hipospadias– en recién nacidos varones una metodología mixta, química y biológica, que permite cuantificar y caracterizar el nivel de exposición a xenoestrógenos de una población. Nuestro conocimiento a este respecto se puede resumir en los siguientes puntos:

- 1) Se pudo llevar a cabo el estudio de la exposición gracias a la colaboración multidisciplinar establecida, al apoyo de las instituciones sanitarias y a la generosidad de las madres que donaron sus placentas.
- 2) Partiendo de una muestra biológica, en este caso placenta, es posible extraer los xenobióticos hormonalmente activos, y separarlos de los estrógenos endógenos contenidos en esa misma muestra.
- 3) El extracto purificado mediante cromatografía HPLC semipreparativa, puede ser testado de forma directa en el bioensayo de estrogénicidad

E-Screen, obteniéndose altos porcentajes de respuesta proliferativa en las muestras testadas, y potencias proliferativas cuantificadas en referencia a la producida por estradiol.

Dentro de este contexto, la exposición a disruptores endocrinos se plantea como una hipótesis que merece una atención especial en la etapa de crecimiento embrionario y maduración fetal, como un momento crítico para el efecto perjudicial de los contaminantes ambientales con actividad hormonal.

El **objetivo general** de este estudio es caracterizar el grado de exposición a xenoestrógenos, mediante la aplicación de un marcador de exposición desarrollado para la cuantificación de la actividad hormonal estrogénica en placentas, atribuible al efecto combinado de los xenoestrógenos y estrógenos endógenos contenidos en el tejido placentario, en dos poblaciones reclutadas en el momento del parto, en Granada y en Madrid, identificando posibles factores asociados a dicha exposición.

Los **objetivos específicos** son:

- 1) Cuantificar la carga estrogénica total efectiva (TEXB) en placentas mediante el empleo del bioensayo E-Screen, en dos poblaciones de Granada y Madrid.
- 2) Estudiar los factores que condicionan la exposición y analizar la asociación entre las características antropométricas y sociodemográficas, las condiciones de salud, el estilo de vida, las condiciones de trabajo, con el parámetro de exposición definido (TEXB).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 MATERIAL PARA CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

I. Frigoríficos congeladores, frigoríficos y cámara fría

Para el almacenamiento de las muestras de tejido placentario se utilizan equipos frigoríficos congeladores que trabajan a distintas temperaturas. Contamos con los siguientes equipos: un congelador **SANYO, VIP series** (-86°C), un congelador **Thermo Electron Corporation** (-86°C), un arcón frigorífico **Forma Scientific** (-86°C) y un congelador **SANYO Biomedical Freezer** (-40°C).

Para el almacenamiento de reactivos y tampones, se utiliza una cámara frigorífica (**SERFRI** Refrigeración Industrial), que se mantiene a una temperatura de 4°C y un frigorífico de la marca **BOSCH** (4°C).

Para mantener la temperatura durante el procesamiento de las muestras se utiliza hielo picado, fabricado por un equipo **SCOTSMAN**[®] AF-10, de Pedro y López S.A.

II. Pipetas

Para la preparación de las muestras se utilizan pipetas automáticas **accu-jet**[®] pro, marca **BRAND**, a la que se acoplan pipetas aforadas de vidrio.

Para manipular los medios de cultivo se usan pipetas con succión y expulsión automática de fluido, de la marca **IBS** (INTEGRA BIOSCIENCES, PIPETBOY Acu).

Para la realización de los ensayos químicos y bioquímicos se emplean micropipetas de volumen variable de 10 -100 µl, de la marca **Eppendorf Research**, así como otras pipetas de un solo uso, estériles, de volumen variable de 1, 5, 10 y 20 ml.

III. Rotavapor

Para la desecación de los extractos se emplea un rotavapor. Contamos con los siguientes equipos: **Büchi**[®] R-300 y **RV 05 Basic IKA**[®]

IV. Balanzas

Para el pesado de las muestras se usó una balanza de precisión **AND GR-202**, con una capacidad de medición de máximo 210 g. y mínimo 1 mg. Para realizar otro tipo de medidas menos precisas, se utiliza una balanza **AND HF-1200G**, con una capacidad de medición de máximo 1.250 g. y mínimo 0,5 g.

V. Estufas

Para el secado de las columnas de extracción de las muestras se utiliza una estufa, de la marca **P – Selecta** y para el secado de materiales de vidrio se utiliza una estufa **OM Orejas y Meillos S.A.**

VI. Horno mufla

Para llevar a cabo el secado de la alúmina 90, de Merck, se utilizó un horno mufla.

VII. Homogeneizador

Con el fin de conseguir la homogenización de todo el tejido placentario en un “mousse” homogéneo, se utiliza un **mixer** modelo B-400, de la casa **Büchi**.

VIII. Baño de ultrasonidos

Para la eliminación de posibles burbujas de aire que interfieran en el análisis cromatográfico, los reactivos utilizados en la cromatografía se someten previamente a ultrasonidos. Se utiliza para ello un baño de ultrasonidos de la marca **P – Selecta**.

IX. Baño termorregulado

Con objeto de mantener un determinado reactivo a una temperatura constante durante un tiempo determinado, se utiliza un baño **PRECISTERM**, de la casa **P-Selecta**.

X. Centrífugas

Para poder realizar la separación de determinados componentes de la muestra se utilizan centrífugas como por ejemplo, el modelo **BECKMAN TJ-6**, que trabaja bajo condiciones de refrigeración.

XI. Agitadores

En determinados análisis de laboratorio es necesario la ayuda de agitadores. Contamos con los siguientes modelos: un aparato de la casa **IKA, MS2, Minishaker** y un **Vortex- Geine 2** (Scientific Industries).

XII. Disolventes

Los principales disolventes empleados para la extracción de las muestras de placenta son: n-hexano y metanol Chromasolv[®], de la casa Sigma-Aldrich; 2-propanol (HPLC) PAI, suministrados por Panreac y ácido clorhídrico y cloroformo de la casa Merck.

XIII. Otros materiales

Por último, se emplean diversos utensilios de laboratorio entre los que cabe destacar: columnas de vidrio Pirex, pipetas de vidrio de diferente volumen, vasos de precipitado, tubos de ensayo, embudos de vidrio, probetas, matraces, vidrios de reloj, varillas de vidrio, homogeneizadores de vidrio, émbolos, gradillas, peras entre otros materiales.

3.1.2 INSTRUMENTACIÓN QUÍMICO-ANALÍTICA

3.1.2.1 Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), modelo **VARIAN Pro Star** con detector Ultravioleta-Visible. El módulo para suministro de los solventes consta de dos bombas (módulo Pro Star 210/215). Lleva, además, acoplado un colector de fracciones automático para recoger las fracciones eluidas (Varian modelo 704). Como columna se usó una columna de sílica 4,6 x 250 mm, modelo Waters Spherisorb 5 µm, analytical column.

3.1.3 CULTIVOS CELULARES

3.1.3.1 Tests biológico E-Screen

I. Incubadora de CO₂ para cultivos celulares

Para el cultivo de las células es necesario el empleo de una **incubadora SANYO CO₂**, que permite la regulación de la temperatura y la concentración de gases (aire y CO₂) en su interior. Con el fin de contrarrestar la evaporación

producida, el incubador lleva una bandeja que se rellena con agua destilada, manteniendo así la humedad relativa necesaria en su interior.

Las experiencias de cultivo se llevan a cabo a la temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, en una atmósfera constituida por aire con 5% de CO_2 y 95% de humedad. La temperatura es regulada mediante un termostato electrónico cuya exactitud se sitúa en torno a $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$. La regulación de la presión parcial de CO_2 se realiza mediante un sistema provisto de un sensor (el cual mide la conductividad térmica de la mezcla de gases), que permite detectar los cambios en la concentración de CO_2 siempre que estos sean superiores a un $\pm 0,1\%$.

II. Contenedor de nitrógeno líquido

Las líneas celulares MCF-7 utilizadas en este trabajo se almacenan en un contenedor de nitrógeno líquido a -186°C , marca **Thermolyne Locator 8**, (Cryobiological Storage System), modelo CY50900.

III. Cabinas de flujo laminar

Para evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares se utilizan cabinas de flujo laminar vertical y/o horizontal (**Cultair BC 100**, **Cultek** y **Telstar Bio-II-A/M**). Su funcionamiento se basa en hacer circular corrientes de aire con una velocidad máxima de $0,46\text{ m/s}$ a través de un sistema de filtros antes de entrar en la cabina de trabajo. La filtración del aire y el rendimiento del proceso de filtración (99,97 % de retención de todas las partículas mayores de $0,3\mu\text{m}$ de diámetro) garantiza el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

IV. Microscopio

Para la observación de los cultivos celulares se emplea un microscopio de fase inversa **Olympus TH4 200**, que a diferencia de los convencionales tiene localizado el tambor con los objetivos debajo de la pletina porta-muestras y la iluminación incide por la parte superior. El microscopio está dotado de tres objetivos de diferentes aumentos ($\times 10$, $\times 20$ y $\times 40$) y de un ocular con posibilidad de aplicación de un dispositivo fotográfico con contraste de fases.

V. Recuento celular

Para el recuento de los elementos celulares en suspensión se utilizó la *Cámara de Neubauer o hemocitómetro convencional*.

VI. Lector de placas de densidad óptica

Para llevar a cabo la lectura de las placas de cultivo resultantes de las experiencias de proliferación celular se empleó un lector densitométrico, **Titertek® Multiskan modelo MK11, ICN, Flow**, que mide de forma automática la coloración existente en las placas de cultivo (en nuestro caso, de 96 pocillos con fondo plano).

3.1.3.2 Medios para el cultivo celular

Cuando se necesitó preparar soluciones se utilizó agua de destilada, obtenida a partir de un equipo Millipore modelo Elix 3.

Como nutrientes de las células utilizadas en este estudio (células MCF-7), se han empleado los siguientes medios de cultivo sintéticos:

a) *Medio de mantenimiento:*

El mantenimiento del cultivo de las células MCF-7, se llevó a cabo mediante la utilización de un medio **Dulbecco's Modified Eagle's Medium** (DMEM), con Glucosa, L-Glutamina y rojo fenol (**+RF**) (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado con el 5% de suero bovino fetal (FBS, Fetal Bovine Serum) (Hyclone, Logan, UT, USA).

b) *Medios experimentales:*

Para llevar a cabo el cultivo de las células MCF-7 en la situación de control, se realizó con medio mínimo esencial **Dulbecco's Modified Eagle's Medium**, con Glucosa y L-Glutamina, sin rojo fenol (**-RF**) (Gibco). En este caso, la regulación del pH del medio se efectuó utilizando como tampón, **Bicarbonato sódico y Hepes buffer 1 M** (Cambrex), a concentraciones finales de 4,2 μ l y 20 mM, respectivamente. El medio experimental se suplementa con 10% de suero humano desprovisto de estrógenos (10% CDHuS, **Carbón Dextrano Human Serum**), o con 5% de suero bovino fetal desprovisto de estrógenos (5% CDFBS, Carbon Dextrano Fetal Bovine Serum).

La solución de carbón dextrano se logra mezclando 5% de carbón y 0,5% de dextrano T70.

c) Medio de congelación:

El medio de congelación es un compuesto por medio mínimo esencial (DMEM) con rojo fenol (+RF), suplementado con 10% FBS y el 7,5-10% de **Dimetil Sulfóxido** (Merck), con objeto de evitar la formación de cristales de agua, en el proceso de congelación-descongelación.

Para la preparación de todos los medios de cultivo se partieron de medios y reactivos estériles. En algunos casos se hizo aconsejable la reesterilización de los medios mediante su paso a través de unidades de filtración (0,22 de tamaño de poro, Millex, Millipore).

3.1.3.3 Reactivos

I. Tripsina-EDTA

Para llevar a cabo la siembra de las células en las cajas de 24 pocillos de fondo plano, Cellstar® (Greiner Bio-one) para cada experimento, se utiliza una solución estéril de tripsina (0,05% Tripsina-0,025% EDTA) que facilita la movilización de las células de su soporte sólido (ICN Flow Laboratories, Irvine, Escocia). Esta misma solución también se usa para realizar el subcultivo celular. Cuando el tapiz celular cubre toda la superficie del flacon de 75 Cellstar® (Greiner Bio-one), se toma una alícuota de suspensión celular y se pasa a un nuevo flacon con medio de cultivo nuevo (DMEM + RF) y así mantenemos el cultivo.

II. Tampón estándar de fosfato (PBS)

El tampón PBS se preparó disolviendo 3,56 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 0,52 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) y 8,5 g de NaCl (Sigma), en un litro de agua bidestilada. El pH de la disolución tampón se lleva a 7,2.

III. Carbón-dextrano T-70

Con o b j e t o d e e l i m i n a r l o s e s t r ó g e n o s d e l s u e r o s e h a u t i l i z a d o u n a s u s p e n s i ó n d e c a r b ó n a c t i v a d o (**Charcoal Activated**, Sigma, St Louis, USA) y **Dextrano T-70** (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia). E l d e x t r a n o e s u n a m a c r o m o l é c u l a q u e t i e n e l a c a p a c i d a d d e e x t r a e r d e l s u e r o l o s e s t r ó g e n o s e n d ó g e n o s , a s í c o m o o t r a s m o l é c u l a s d e b a j o p e s o m o l e c u l a r .

IV. Solución lisadora

Para lisar las células una vez teñidas, se utiliza una solución de **Bromuro de Etilhexadecil-Dimetilamonio** (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) en Triton X-100 al 5% , 2 m M M g C l ₂ , 15 m M N a C l , 5 m M P B S a u n p H d e 7,4. Posteriormente se traspasan a l a s c a j a s d e 96 p o c i l l o s C e l l s t a r [®] (Greiner Bio-one), donde se va a efectuar finalmente la lectura.

V. Reactivos para el test de Sulforrodamina-B

Después del crecimiento de las células durante 144 horas, este se detiene y l a s c é l u l a s s e f i j a n c o n **ácido Tricloroacético** al 10 % (Merck, Alemania). Posteriormente se tiñen con una solución al 0,4% de **Sulforrodamina-B** (Sigma) en ácido acético al 1% (Merck, Alemania).

VI. Disolventes

Se h a n u t i l i z a d o n - H e x a n o , M e t a n o l y 2 - I s o p r o p a n o l (U V - I R - H P L C p r e p a r a t i v a) p a r a a n á l i s i s i n s t r u m e n t a l d e P a n r e a c (E s p a ñ a) ; C l o r o f o r m o , á c i d o C l o r h í d r i c o , D i m e t i l S u l f ó x i d o (D M S O) , á c i d o A c é t i c o y á c i d o T r i c l o r o a c é t i c o s u m i n i s t r a d o s p o r M e r c k .

3.1.3.4 Compuestos químicos patrones

Como compuestos químicos patrones hemos utilizado: ICI 182,780, fue un regalo del profesor C . S o n n e n s c h e i n d e l a U n i v e r s i d a d d e T u f t s e n B o s t o n , E s t a d o s U n i d o s ; 17 β E s t r a d i o l , f u e r o n s u m i n i s t r a d a s p o r C a l b i o c h e m (R i c h m o n d , C A) .

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DISEÑO Y AMBITO GEOGRAFICO DEL ESTUDIO DE MADRID

La ciudad de Madrid y su área metropolitana constituyen la superficie urbana más grande de España, con problemas medioambientales similares a otras grandes urbes europeas. Dentro de Madrid, el distrito sanitario de Vallecas representa uno de los distritos con peores indicadores socioeconómicos y sanitarios de la región. En el año 2000 el gobierno regional aprobó un plan especial de promoción y desarrollo para este distrito que incluía objetivos específicos de salud pública, entre ellos la implementación de biomarcadores de exposición y efecto para evaluar la exposición de la población general a determinados contaminantes medioambientales. El proyecto se denominó **“BioMadrid”**. El objetivo principal de esta iniciativa era plantear un sistema de vigilancia enfocado a recién nacidos y su entorno. Para ello se diseñó un estudio piloto para comprobar la viabilidad de la implementación del sistema de biomonitorización y vigilancia en la región con los siguientes objetivos específicos: 1) analizar el resultado de la estrategia establecida para el reclutamiento de los participantes, 2) establecer el nivel de exposición de la población mediante el uso de biomarcadores, 3) obtener diferentes matrices biológicas para la medida de la exposición, con objeto de elegir la más adecuada para su implementación posterior en la población general, 4) incluir la determinación de un amplio número de contaminantes medioambientales, en el subgrupo seleccionado de población donde se iba a realizar el sistema de vigilancia propuesto, y 5) obtener valores de referencia en el área de estudio para los contaminantes seleccionados.

Para alcanzar los objetivos planteados se diseñó un estudio transversal reclutando mujeres embarazadas y sus parejas, en su octavo mes de gestación, residentes en dos distritos sanitarios de Madrid y área metropolitana: distrito de Vallecas de la ciudad de Madrid (Área sanitaria 1), y distritos sanitarios de Getafe y Parla del área metropolitana (Área sanitaria 10), como se puede observar en las figuras 5 y 6.

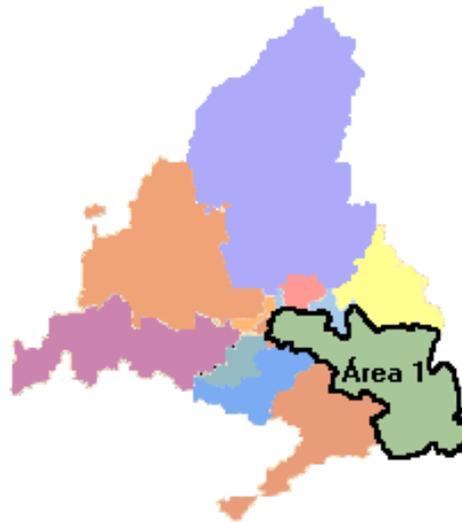


Figura 5. Área sanitaria 1: comprende 4 Distritos Sanitarios, Arganda, Moratalaz, Retiro y Vallecas. Tiene una superficie de 1.142 Km² y una población de 637.028 habitantes. Hospital de referencia: Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

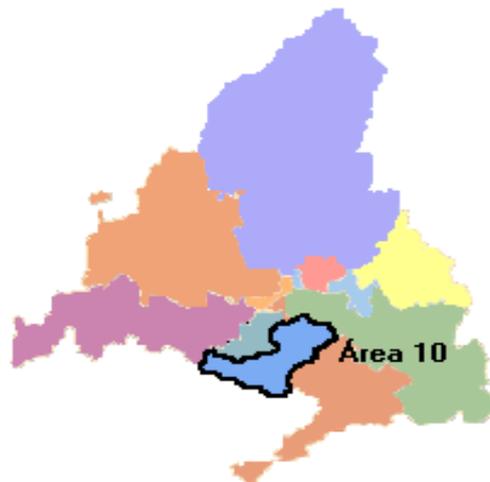


Figura 6. Área sanitaria 10: comprende 2 Distritos Sanitarios, Parla y Getafe. Tiene una superficie de 297 K m² y cuenta con una población de 249.045 habitantes. Hospital público, Hospital de Getafe.

Algunas de las características sociodemográficas de las áreas sanitarias seleccionadas están descritas en la siguiente tabla.

Características sociodemográficas de las áreas sanitarias 1 y 10, censo 2001

	Distrito urbano (Vallecas)	Distrito metropolitano (Getafe y Parla)		
Indicadores demográficos				
Renta <i>per cápita</i> (euros) ^a	8.647	9.317		
% casas sin servicio higiénico	1,7	0,7		
Población total:	286.374	281.166		
% < 15 años	14,7	15		
% > 64 años	18	9		
% mujeres en edad fértil (rango de 15 - 49 años)	51,3	57,7		
Nacimientos en 2001 ^b	2.667	3.189		
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Educación				
Enseñanza obligatoria sin terminar (en ≥ 16 años) %	37,9	45,1	29,4	34,6
Estudios universitarios (en ≥ 30 años) %	8,6	8,2	8,6	8,3
Ocupación				
% Parados	12,4	18,5	9,05	18,65
Trabajos manuales (en ≥ 16 años) %	65,9	51	68	50
Inmigrantes de países menos desarrollados				
% Residentes	6,9	6,5	6	5,5

^a Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid

^b Padrón continuo de habitantes para el 1 de Enero 2003

Tomada de Aragonés *et al.*, 2008.

3.2.1.1 Población del estudio de Madrid

Todas las mujeres embarazadas que atendían a las clases de preparación del parto en el sistema público de salud, y residían en las áreas sanitarias seleccionadas fueron invitadas a participar en el estudio. Las matronas aprovechando las clases de preparación al parto en los centros de salud correspondientes, explicaban a las futuras mamás los objetivos y procedimientos del estudio. Los criterios de inclusión fueron: 1) residir en las áreas de estudio seleccionadas durante al menos un año; 2) no haber recibido una transfusión de sangre en el año previo a la inclusión en el estudio; 3) para las mujeres se requería además tener al menos 18 años de edad; 4) embarazo no múltiple y 5)

intención de dar a luz en alguno de los hospitales públicos de referencia, de las áreas sanitarias incluidas. La participación en el estudio requería, también, que los dos miembros de la pareja aceptaran participar. A aquellas parejas que cumplían los criterios de inclusión y accedían a participar respondían un cuestionario epidemiológico y consentían en proporcionar diferentes muestras biológicas, tanto de las parejas implicadas como de sus hijos recién nacidos, constituyendo lo que se ha venido a llamar: **tripletes o trios “madre-padre-recién nacido”**. Ambos miembros de la pareja firmaban el correspondiente consentimiento informado necesario para participar en el estudio. La participación no suponía ninguna recompensa económica, pero sí el estímulo de la utilidad social y medioambiental que comportaba su participación y que era explicado por las matronas a los participantes.

Inicialmente el estudio piloto se planteó para reclutar 100 tripletes completos, lo que implicaba el reclutamiento inicial de un número mayor de parejas, concretamente un 50% más, es decir, 150 parejas, y a que en todo proceso de investigación que requiere reclutamiento y seguimiento de sujetos se producen pérdidas. El reclutamiento comenzó en Octubre del 2003 y concluyó en Mayo de 2004. Un total de 515 mujeres embarazadas, que cumplían los criterios de inclusión, fueron informadas de las características y objetivos del estudio e invitadas a participar. De las cuales, solamente unas 268 mujeres (52%) decidieron comunicárselo a sus parejas. Finalmente, 149 parejas fueron incluidas, lo que resultó en una tasa de participación del trío (padre, madre y bebé) del 29%. Dos mujeres dieron a luz antes de la fecha prevista y otras dos parejas, además de un padre, no acudieron a la cita concertada, declinando las llamadas posteriores realizadas para continuar su permanencia en el estudio. La población de estudio quedó definitivamente constituida por 145 mujeres embarazadas, 144 padres y 135 recién nacidos. Aproximadamente el 70% de las mujeres que acudieron a las clases de preparación al parto, rellenaron un breve cuestionario destinado a recoger información básica sobre variables sociodemográficas que permitiera evaluar la representatividad de la muestra obtenida. Las características de las mujeres participantes y no participantes quedan reflejadas en la siguiente tabla. Ambos grupos de mujeres fueron

similares en términos de edad, número de hijos y país de nacimiento, aunque se encontró un mayor nivel educativo entre las participantes.

Características de la población del estudio BioMadrid.

	Participantes		No participantes		p
	n: 134	%	n: 211	%	
País nacimiento					
España	114	85	193	91	0,133 ^b
Paridad					
1º hijo	87	66	149	71	0,294 ^b
Edad					
Media	30,5		29,9		0,252 ^c
Educación					
Primaria/secundaria	32	24	79	38	0,005 ^d
Bachillerato	56	43	90	43	
Universidad/Posgrado	43	33	40	19	
Ocupación^a					
Administrativos	33	25	38	18	0,004 ^d
Ama de casa	14	11	36	17	
Vendedores	16	22	33	16	
Sanitarios	12	9	14	7	
Profesorado	17	13	7	4	
Cocineros/camareros	7	5	12	6	
Peluqueros	7	5	8	4	
Labores de limpieza	1	1	12	6	
Otros	25	19	51	24	

^a Ocupación con 5 o más participantes

^b Test de proporciones para dos muestras

^c Test t para contrastar la igualdad de medias

^d Prueba Chi-cuadrado

Tomada de Aragonés *et al.*, 2008.

3.2.1.2 Cuestionarios

Además de la exploración física de los recién nacidos para obtener los principales datos clínicos y antropométricos, los padres respondieron a dos cuestionarios mediante entrevista personal:

- 1) Cuestionario General de la madre (Anexo I)
- 2) Cuestionario General del padre (Anexo II)
- 3) Cuestionario de Frecuencia Alimentaria de la madre y del padre durante los últimos meses de embarazo de la madre (Anexo IIIa y IIIb, respectivamente)

- 4) Datos clínicos y antropométricos del recién nacido, completado por los sanitarios presentes en el momento del parto (Anexo IV)

Para la realización de estos cuestionarios *ad hoc* se tuvo en cuenta el protocolo de INMA (Infancia y Medioambiente), con objeto de poder llevar a cabo futuras comparaciones con otros resultados de otros proyectos de INMA. La encuesta epidemiológica aportó información sobre características antropométricas, sociodemográficas, reproductivas, dieta y hábitos de vida de la madre así como todo lo relacionado con su embarazo.

3.2.1.3 Muestras biológicas

Entre las muestras biológicas solicitadas y reclutadas durante este estudio, se incluía la placenta, además de una muestra de sangre de cordón umbilical en el momento del parto y una muestra de leche materna a las tres semanas postparto; Todas ellas previo consentimiento de la pareja para recogerlas.

La población de estudio de esta tesis doctoral quedó formada por una submuestra de 121 mujeres, que participaron en el proyecto BioMadrid, para las cuales se pudo recoger la placenta. De las 121 placentas obtenidas, 55 procedían del área sanitaria 1 (Vallecas) y 66 del área sanitaria 10 (Getafe y Parla). Las placentas se sometían a congelación inmediatamente después del nacimiento, a -20°C y posteriormente se almacenaban en el Laboratorio Regional de Salud Pública (LRSP) de Madrid, donde se mantenían en condiciones de congelación a temperatura de -80°C . Dichas placentas estaban convenientemente etiquetadas con un número identificativo, mediante un código alfanumérico. Finalmente fueron enviadas al Laboratorio de Investigaciones Médicas, del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, para su procesamiento y análisis.

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de los Hospitales participantes: Hospital Universitario Gregorio Marañón y Hospital de Getafe, Madrid. La confidencialidad de los datos se mantuvo en todo momento, de acuerdo con la legislación al respecto sobre protección de datos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal).

3.2.2 DISEÑO Y ÁMBITO GEOGRÁFICO DEL ESTUDIO GRANADA

El área de estudio definida se ubica en la provincia de Granada (sureste peninsular) e incluye 54 municipios, con una población total a proximada de 500.000 habitantes y una extensión de 4.000 km² (Figura 7). La zona de estudio corresponde al ámbito geográfico del área de atención primaria del Distrito Metropolitano de Granada y parte del área sanitaria del Distrito Granada (zona Sur de la capital), cuyo hospital de referencia es el Hospital Universitario San Cecilio. El área cubre las comarcas de Valle de Lecrín, Vega Este y Oeste, Loja, Alhama y Montefrío, extendiéndose por el sector oeste y sur de la provincia de Granada (Figura 8).

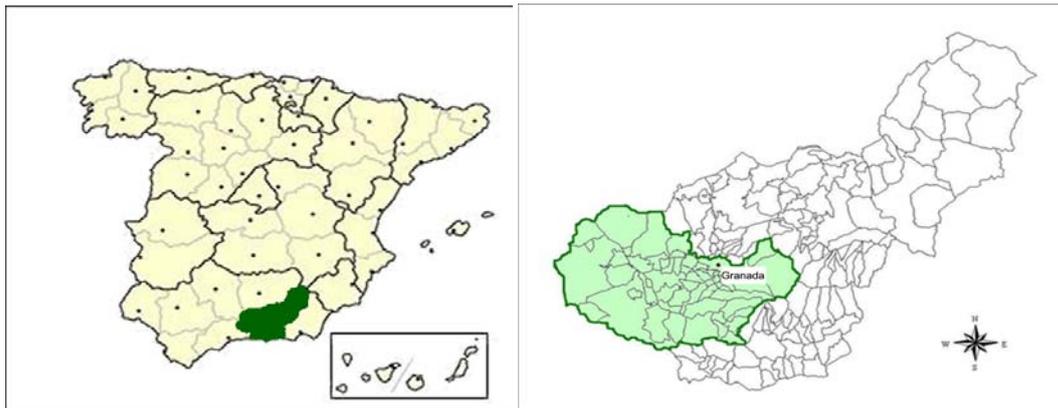


Figura 7. Ámbito geográfico de estudio de Granada



Figura 8. Distritos Sanitarios de la provincia de Granada

En el área de estudio se incluyen poblaciones de diferentes características sociodemográficas, que van desde la ciudad de Granada hasta pequeños núcleos rurales alejados de la capital, por lo que se establecieron tres zonas con características sociodemográficas, ambientales y de usos del suelo bien diferenciadas (Figura 9).

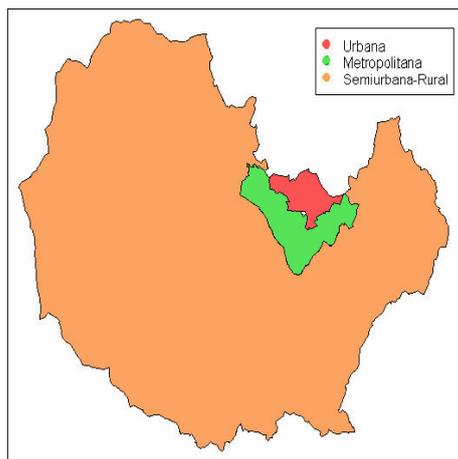


Figura 9. Clasificación de zonas dentro del área del estudio de Granada

- a) Urbana: ciudad de Granada, con 236.000 habitantes.
- b) Metropolitana: incluye municipios con más de 20.000 habitantes situados en el “cinturón” que rodea a la capital. Las zonas urbana y metropolitana están dedicadas básicamente a actividades del sector de servicios y en ellas se concentran las mayores densidades de población y de tráfico del área de estudio.
- c) Semiurbana-rural: incluye municipios con menos de 20.000 habitantes (algunos de ellos con menos de 1.000 habitantes), dedicados básicamente a la actividad agrícola y forestal.

3.2.2.1 Población de estudio de Granada

Entre octubre del año 2000 y julio del 2002 se constituyó en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, una cohorte poblacional bajo el nombre de Infancia y Medio Ambiente- Granada (INMA-Granada) con el objetivo de investigar la influencia de la exposición a compuestos químicos, que se comportan como hormonas y la aparición de malformaciones urogenitales

(criptorquidia e hipospadias) al nacimiento. Durante este periodo se reclutaron un total de 668 niños de un total de 4455 varones nacidos en el hospital. Las madres eran reclutadas e incluidas en el estudio cuando acudían al Hospital a dar a luz. La intervención del Servicio de Ginecología y de la Unidad de Partorio del Hospital fue decisiva en el éxito del reclutamiento.

Los padres del niño fueron informados de los objetivos y procedimientos del estudio al solicitar su participación, quedando plasmado en el "Consentimiento informado". Los criterios de inclusión y exclusión de sujetos en el estudio fueron los siguientes (López-Espinosa, 2006): 1) responder al cuestionario epidemiológico y permitir la disponibilidad de los datos para el estudio; 2) consentir la utilización de la información necesaria de la historia clínica para el estudio; 3) acceder a la toma de muestras biológicas como placenta, sangre de cordón umbilical, y leche materna, para su posterior procesamiento para el estudio y 4) permitir la realización del examen físico del niño. Se decidió descartar aquellos individuos que, por razones ajenas a la voluntad del investigador o al personal clínico, no se pudo obtener la muestra biológica para su procesamiento o bien hubo pérdida de las mismas, por fallos puntuales en el proceso de transporte, identificación y almacenamiento.

Entre la población reclutada se seleccionaron 308 sujetos cuyos padres fueron informados de los objetivos y procedimientos del estudio, a la hora de solicitar su colaboración, y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

3.2.2.2 Cuestionarios

Además de la exploración física de los recién nacidos para obtener los principales datos clínicos y antropométricos de los mismos, las madres contestaron a un cuestionario mediante entrevista personal, con lo cual en este estudio contamos con:

- 1) Cuestionario epidemiológico General de la madre, diseñado *ad hoc* (Anexo V), aunque también incluye una serie de cuestiones para el padre (preguntas 16-29 del cuestionario). Para poder responder a las preguntas después de haber confirmado su participación, el encuestador contactaba

con las madres tras su ingreso en el hospital, y así se cumplimentaba el cuestionario durante su estancia en el mismo. La encuesta epidemiológica aporta información sobre características antropométricas, sociodemográficas, reproductivas, dieta y hábitos de vida de la madre así como todo lo relacionado con su embarazo.

- 2) Datos clínicos del recién nacido (ANEXO VI), como el examen físico del niño, aportan información sobre las características antropométricas del recién nacido.

3.2.2.3 Muestras biológicas

Entre las muestras biológicas solicitadas y recolectadas durante este estudio, se incluía la placenta, además de una muestra de sangre de cordón umbilical en el momento del parto, y una muestra de leche materna. Todas ellas previo consentimiento de la partera para poder recogerlas. La población de estudio quedó formada por una submuestra de 308 mujeres que participaron en el proyecto INMA-Granada, para las cuales se pudieron recoger las placentas. Las muestras de placenta fueron analizadas en el Laboratorio de Investigaciones Médicas, del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital participante: Hospital Universitario San Cecilio, en Granada; La confidencialidad de los datos se mantuvo en todo momento, separando la información recogida de los datos de identificación de cada participante, de acuerdo con la legislación al respecto sobre protección de datos (Ley Orgánica 15/ 1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal).

3.2.3 METODOLOGÍA QUÍMICO ANALÍTICA

3.2.3.1 Extracción de las muestras de placenta

El procedimiento que se ha empleado para la extracción de las muestras de placenta está basado en la separación por cromatografía de adsorción en columna, utilizando como adsorbente la alúmina y como eluyente el disolvente n-hexano.

Para la extracción de los xenoestrógenos a partir de las muestras de tejido placentario, se desarrolló una metodología basada en el método descrito por Okond´Ahoka (Okond´Ahoka *et al.*, 1984), modificado y validado por nuestro grupo de trabajo (Rivas *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2004; López-Espinosa, 2006). El método de extracción es el siguiente:

1. Se deseca alúmina Merck 90 durante 4 horas a 600°C.
2. Se pesan 2 g de alúmina y se ajusta a un grado de hidratación del 5%.
3. Se rellena una columna de vidrio Pyrex, de 6 mm de diámetro interno, con la alúmina preparada.
4. Se pesan 0,4 g de la muestra de tejido placentario, mantenida hasta su procesamiento a una temperatura de -86°C . Previamente la alícuota de tejido placentario se homogeniza en un homogenizador de pistón con 5 mL de hexano.
6. El homogenado se vierte, mediante un embudo de cristal, en la columna de vidrio Pyrex.
7. Se añaden 20 mL de hexano a través de la columna y el eluido se recoge en un matraz de fondo redondo.
8. El proceso se repite cuatro veces (1,6 gramos de placenta en total)
9. El eluido se concentra en un rotavapor hasta un volumen final de 1 mL, cuidando no llegar a sequedad.
10. El extracto obtenido se deseca completamente en corriente de nitrógeno y se mantiene en la cámara frigorífica, hasta su procesamiento por HPLC.

3.2.3.2 Determinación de lípidos totales

El cálculo de los lípidos totales en cada una de las muestras de tejido placentario ensayadas se determinó mediante gravimetría, previa extracción líquido-líquido con una mezcla extractora compuesta por cloroformo-metanol-ácido clorhídrico (200:100:10) (Capilla, 1979).

El método consta de los pasos siguientes:

1. Se pesan 0,1 g de la muestra de placenta y se homogenizan en un homogeneizador de vidrio con un émbolo, adicionando 10 mL de la mezcla extractora.

2. El extracto se distribuye en tubos con tapón de teflón, se añaden 5 mL de ácido clorhídrico 0,1M y tras agitar vigorosamente se centrifuga a 3000 rpm, durante 10 minutos.

3. La capa etérea se trasvasa a un matraz previamente tarado y a la capa acuosa se le añade 5 mL de la mezcla extractora y se vuelve a centrifugar recogiendo de nuevo la capa de éter. Los disolventes se evaporan a presión reducida en el rotavapor a 50°C y la humedad se elimina en estufa. Se deja enfriar los matraces en el desecador y se pesan estos con los lípidos extraídos.

4. La cantidad de materia grasa que tiene la muestra viene definida por la siguiente expresión:

$$\% = \frac{P_2 - P_1}{P_0}$$

P_1 = peso en gramos del matraz seco.

P_2 = peso en gramos del matraz con la materia grasa.

P_0 = peso en gramos del tejido placentario.

3.2.3.3 Extracción semipreparativa de las muestras mediante HPLC

La cromatografía líquida semipreparativa permite la separación de los xenoestrógenos de los estrógenos naturales sin llegar a destruirlos y así poder diferenciar la actividad hormonal debida a los distintos compuestos presentes en la misma muestra (Brotons, 1994; Valenzuela, 1996; Rivas *et al.*, 2001; Olmos, 2005). Para ello, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) de la casa Varian, modelo Pro Star con detector UV-Visible, utilizando una longitud de onda de 280 nm con sensibilidad o rango (AUFS) 0,1 y tiempo de salida 0,3 s.

Los extractos de las muestras se eluyen mediante gradiente con dos fases móviles: n-hexano (Fase A) y n-hexano:metanol:isopropanol (40:45:15, v/v/v)

(Fase B), a un flujo de 1,0 ml/min. El programa de gradiente está basado en el método de Medina *et al.* (1986), con algunas modificaciones.

El residuo seco procedente de la extracción se resuspende en 800 μ l de hexano utilizándose 200 μ l del mismo en cada inyección (4X200 μ l).

Las condiciones de trabajo son: t = 0 min, 100% fase A; t = 17 min, 60% fase A; t = 25 min, 100% fase B; t = 32 min, 100% fase A.

Las fracciones obtenidas se identificaron como:

1. Fracción alfa (α) que se colecta durante los 11 primeros minutos y contiene los compuestos organohalogenados.
2. Fracción x que se colecta entre los minutos 11 y 13, diseñada como fracción de seguridad
3. Fracción beta (β) que se colecta entre los minutos 13 y 25 y contiene las hormonas naturales y los aditivos y monómeros del plástico, así como algunos fitoestrógenos. Las fracciones alfa y beta colectadas se llevan a sequedad en corriente de nitrógeno, con cuidado de no provocar salpicaduras con la consiguiente pérdida de muestra.

3.2.4 METODOLOGÍA BIOLÓGICA

3.2.4.1 Test biológico E-Screen

I. Líneas celulares

Se ha utilizado la línea celular de cáncer humano **MCF-7** (Michigan Cancer Foundation). Esta línea fue establecida por Soule y colaboradores (1973), a partir de un carcinoma de mama humano. Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama, puede ser atribuido a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo (Horwitz *et al.*, 1978), que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos (Lippman *et al.*, 1986). La línea celular MCF-7 presenta además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre los cuales se encuentran los andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D3, hormonas tiroideas, prolactina, insulina, calcitonina y factores estimuladores del crecimiento celular (Lippman *et al.*, 1986).

En el presente estudio, se ha empleado el stock de las células MCF-7 BUS cedidas por el Dr. C. S. Sonnenschein (Tufts University, Boston, E.E.UU.) y clonadas como C₇MCF-7 a partir del pase 173 de la MCF-7 original cedida por el Dr. McGrath de la Michigan Cancer Foundation.

II. Experimentos de proliferación celular: Test E-Screen

El test E-Screen se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Soto y colaboradores (Soto *et al.*, 1992), y modificada ligeramente por Villalobos y colaboradores (Villalobos *et al.*, 1995). Las células MCF-7 en confluencia se tripsinizaron y se sembraron en placas de 24 pocillos a concentración inicial de 20.000 células por pocillo, en medio de mantenimiento DMEM (+RF), suplementado con el 10% de suero fetal bovino. Una vez que las células se adhieren al soporte plástico de la placa (generalmente 24-48 horas), se retira el medio de mantenimiento y se añade medio experimental constituido por DMEM desprovisto de rojo fenol y suplementado con el 10% de suero humano desprovisto de estrogénos, es decir, tratado previamente con una solución de carbón/dextrano (CDHuS). Posteriormente, se añaden el 17 β estradiol y las diferentes diluciones de las fracciones alfa y beta al medio de cultivo. El ensayo finaliza a las 144 horas, mediante aspiración del medio, fijación y tinte de las células con la Sulforrodamina-B (SRB). Para ello las células se tratan con ácido tricloroacético 10% y se mantienen durante 30 minutos en condiciones de refrigeración. A continuación, se lavan con agua del grifo y se dejan secar. Las células fijadas con el tricloroacético se tinen durante 10 minutos con una dilución de SRB al 0,4% en ácido acético al 1%. El colorante se deja actuar durante 20 minutos y después, los pocillos se aclaran varias veces con una solución de ácido acético al 1%, para eliminar el colorante no unido a las células y se dejan secar al aire. Las "agrupaciones celulares" teñidas y secas, se solubilizan con tampón Tris (hidroximetil amino metano) 10 mM, (pH 10,5), mediante agitación suave. Por último, se transfieren alícuotas de 100 μ l a placas de 96 pocillos, para poder hacer la lectura de la densidad óptica correspondiente, medida a una longitud de onda de 492 nm con un espectrofotómetro (Titertek Multiskan).

Los resultados de densidad óptica obtenidos se convierten en número de células, utilizando un curva patrón previamente construida para cada línea celular y condiciones de cultivo. Esto permite comparar la proliferación celular inducida por el estradiol y las alícuotas correspondientes de las fracciones alfa y beta de los extractos tisulares.

III. Test biológico YES: Levaduras transfectadas con el receptor estrogénico humano

El test biológico YES descrito por primera vez por Routledge y Sumpter (1996), fue desarrollado para la identificación de sustancias químicas estrogénicas que interactúan con el receptor hER α (receptor estrogénico humano alfa), por el departamento de investigación genética de Glaxo Ltd. Como muestra la siguiente figura (Figura 10), la secuencia del DNA del hER α se integra dentro del primer cromosoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de hER α integrada se expresa en la levadura (1) y es capaz de unirse al elemento de respuesta estrogénico (ERE) que forma parte de un promotor híbrido que se encuentra en el plásmido. Este también contiene el gen portador Lac-Z, por lo que tras la unión se provoca la expresión del plásmido (2). La activación del receptor (3), por la unión de un ligando, causa la expresión del gen portador Lac-Z (4), el cual produce la enzima β -galactosidasa. Este enzima es secretado dentro del medio (5), donde actúa para convertir el sustrato cromogénico clorofenol rojo- β -galactopiranosida (CPRG), que de color inicial amarillo virará finalmente a rojo, coloración que se mide en un lector apropiado.

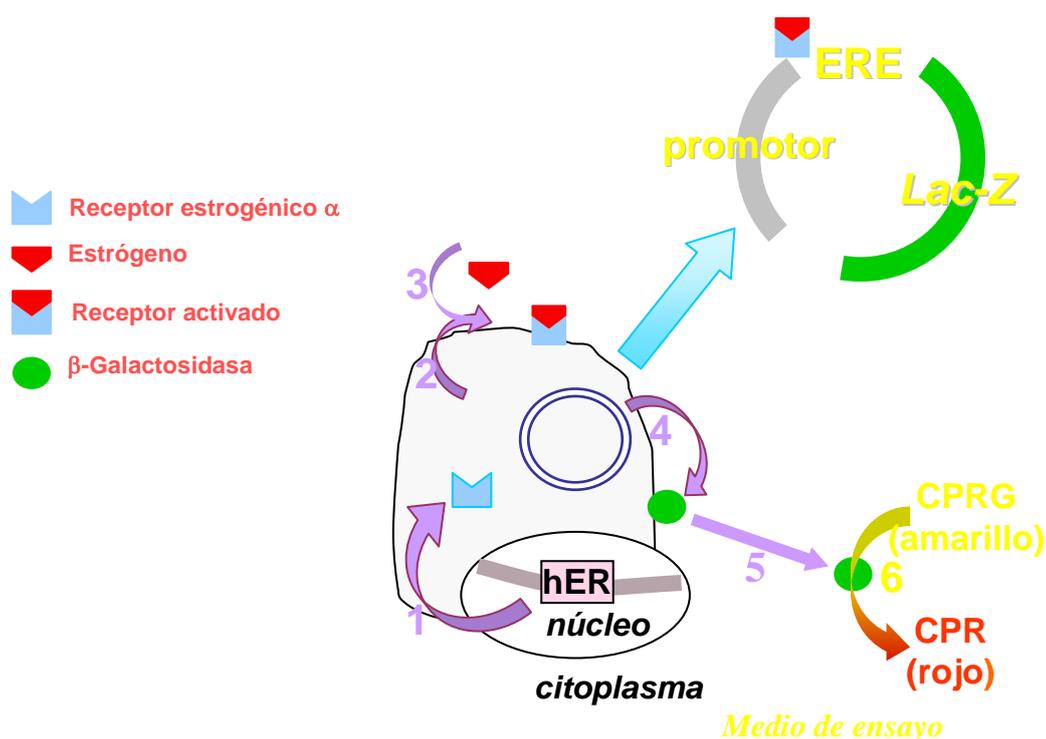


Figura 10. Esquema mecanismo de acción del test YES

Tomada de López-Espinosa, 2006

III. Evaluación de la estrogénicidad de los extractos de tejido placentario: fracciones alfa y beta

Para determinar la carga hormonal exógena que presentaban los extractos de las fracciones alfa y beta, obtenidas por cromatografía líquida preparativa (HPLC), se resuspendieron dichos extractos (secos) en 5 mL de medio de cultivo experimental (DMEN), suplementado con el 10% CDHuS y se agitaron con un vortex durante unos 5 minutos. Dicho ensayo se llevó a cabo siembre por duplicado para ambas fracciones. Posteriormente las fracciones se esterilizaron mediante la utilización de un filtro, de tamaño de poro de $0,22\mu\text{m}$, y se realizaron diluciones 1:1, 1:5 y 1:10 en medio de cultivo, con objeto de asegurar que los efectos tóxicos de las muestras, no enmascaren actividades estrogénicas o antiestrogénicas. Finalmente, las diluciones obtenidas se sometieron al test biológico junto al grupo control (células no tratadas) y a otros grupos celulares expuestos a 17β estradiol, a una concentración de 10 pM.

La actividad biológica de las muestras de tejido placentario extraídas y testadas en el ensayo E-Screen, permiten cuantificar el efecto hormonal

estrogénico y puede ser transformada en **unidades equivalentes de estradiol** (Eeq), es decir, en la concentración de estradiol que produciría un efecto proliferativo similar, después de hacer la lectura en la curva dosis-respuesta preparada previamente usando 17β estradiol. Este concepto ha sido referido como carga estrogénica total efectiva (TEXB) (Rivas *et al.*, 2001), ya que asigna un valor de estrogénicidad a las muestras biológicas y convierte un marcador de exposición en un marcador de equivalencia biológica y de efecto biológico (Olea *et al.*, 2002). En este estudio nos referiremos a TEXB alfa o beta cuando nombremos a una u otra de las fracciones cromatográficas anteriormente citadas.

3.2.5 ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO

El análisis epidemiológico de la información recabada mediante los cuestionarios, el examen físico de los recién nacidos y el análisis químico y biológico del tejido placentario, se centró fundamentalmente en:

1. Describir las características de la población de estudio.
2. Describir los niveles de carga estrogénica total de las fracciones alfa y beta de los tejidos placentarios.
3. Estudiar la relación entre la carga estrogénica y algunas variables de los padres y del recién nacido.
4. Estimar el riesgo asociado a la presencia en placenta de determinados niveles de carga estrogénica de las fracciones alfa y beta.

3.2.5.1 Variables de la madre

I.- Variable edad

- Edad de la madre en el parto: Variable cuantitativa continua. Esta variable se recategorizó posteriormente en las siguientes categorías para realizar el análisis estadístico: ≤ 31 y > 31 años, para Madrid y ≤ 32 y > 32 años, para Granada.

II.- Variables referentes a las características antropométricas

- Peso antes del embarazo: variable cuantitativa continua expresada en Kg.
- Peso en la última visita durante el embarazo registrada: variable cuantitativa continua expresada en Kg.

- Ganancia de peso durante el embarazo: variable cuantitativa continua, recodificada para el análisis estadístico en dos categorías: $\leq 10\text{Kg}$ y $> 10\text{Kg}$ (Madrid) y $\leq 12\text{Kg}$ y $> 12\text{Kg}$ (Granada).
- Índice de masa corporal o de Quetelet (IMC): variable cuantitativa continua calculada dividiendo el peso de la mujer en Kg antes del embarazo entre la talla en metros al cuadrado. Se recategorizó posteriormente en dos categorías teniendo en cuenta como valor de corte la media: $< 22,7$ y $\geq 22,7 \text{ Kg/m}^2$ para el estudio de Madrid y < 25 y $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ para el de Granada.

III.- Variables referentes a las características sociodemográficas

- Estado civil: Variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casada/ conviviendo con su pareja/ soltera.
- Municipio de residencia durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica. Esta variable se recategorizó posteriormente, en los siguientes grupos: municipios rurales (aquellos con menos de 10.000 habitantes)/ municipios urbanos (aquellos con más de 10.000 habitantes).
- Nivel de estudios de la madre: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: estudios de primaria/ medios/ superiores (Madrid y Granada).
- Actividad laboral: variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como profesiones afines. Posteriormente fue recodificada en categorías: en hogar y otros (Madrid) y hogar/ agricultura/ otros (Granada), para el análisis bivariado.
- Percepción de la exposición a productos químicos durante el embarazo: variable categórica dividida en dos grupos: sí/no, para Madrid y Granada.

IV.- Variables referentes a las características reproductivas de la madre

- Paridad: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: primípara y multípara.
- Número de hijos: variable cuantitativa continua.
- Utilización de anticonceptivos hormonales: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.

- Tratamiento de infertilidad: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- Presencia de enfermedades durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica con las categorías: sí/no.
- Consumo de fármacos antes de quedarse embarazada: variable categórica nominal policotómica con las categorías: sí/no.
- Consumo de fármacos durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica con las categorías: sí/no.
- Suplementos dietéticos durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.

V.- Variables referentes a los hábitos de consumo de alcohol y tabaco

- Consumo de alcohol: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- Consumo de tabaco: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: no fuma/ fuma.
- Percepción de exposición al tabaco: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.

VI. Variables referentes al estilo de vida y hábitos alimentarios del estudio de Madrid

- Empastes puestos a lo largo de su vida: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.
- Empastes puestos durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.
- Frecuencia de consumo de leche: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 al día/ 1 al día / > 1 al día.
- Frecuencia de consumo de yogurt: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤1 por semana / > 1 a la semana / ≥ 1 al día.
- Frecuencia de consumo de queso fresco y curado: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 al día / 1 al día.

- Frecuencia de consumo de huevos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: ≤ 1 por semana y > 1 a la semana
- Frecuencia de consumo de legumbres: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: $\leq 1-3$ veces al mes/ 1 vez semana/ > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de lechuga, tomate y cebolla: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: $\leq 1-3$ veces al mes/ 1 vez semana/ > 1 a la semana/ \geq al día.
- Frecuencia de consumo de vegetales verdes frescos (espinacas, judías): variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ < 1 a la semana / 1 por semana / > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de berenjenas y pimientos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana / > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de espárragos, alcachofas y maíz: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ < 1 a la semana / ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de fruta fresca y zumos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 por semana / > 1 a la semana/ ≥ 1 al día.
- Frecuencia de consumo de uvas y ciruelas: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ < 1 por semana / ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de aceitunas y frutos secos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ < 1 por semana/ 1 por semana/ > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de pollo, conejo y puerco: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 por semana / > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de carne (ternera, cordero y cerdo): variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: ≤ 1 por semana / > 1 a la semana.

- Frecuencia de consumo de carne de caza: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: < 1 al mes/ ≥ 1 al mes.
- Frecuencia de consumo de hamburguesa, panceta y tocino: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de hígado: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ 1-3 veces al mes/ ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de embutidos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana/ 1 al día.
- Frecuencia de consumo de pescado (blanco y azul): variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de marisco: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de pescado en conserva: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de pan y cereales: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ ≥ 1 al día.
- Frecuencia de consumo de patatas: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ 1 a la semana/ > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de pasta y arroz: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ 1 a la semana/ > 1 a la semana.
- Frecuencia de consumo de chocolate: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana/ ≥ 1 al día.
- Consumo de refrescos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ ≥ 1 al día.

- Consumo de agua durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ <1 a la semana/ ≥ 1 a la semana/ ≥ 1 al día.
- Consumo de café: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ ≥ 1 al día.
- Consumo de aceite de oliva: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ 1 al día/ > 1 al día.
- Consumo de otros aceites: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ ≥ 1 al día.
- Consumo de margarina y mantequilla: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ 1 al día.
- Consumo de galletas y bollería: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casi nunca/ ≤ 1 a la semana/ > 1 a la semana/ ≥ 1 al día.

VII. Variables referentes al estilo de vida y hábitos alimentarios del estudio de Granada

- Consumo de comida ecológica: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.
- Frecuencia de consumo de comida ecológica: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: raras veces/ 1-3 veces al mes/ diariamente o varias veces a la semana.
- Empastes puestos durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.
- Frecuencia de consumo de yogurt: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de queso fresco: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de queso añejo: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.

- Frecuencia de consumo de huevos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de legumbres: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de ensalada: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de vegetales verdes frescos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de otros vegetales: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de conservas de vegetales: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de fruta fresca: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de zumo de fruta fresca: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de zumo de fruta en tetrabrik: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de frutos secos: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.

- Frecuencia de consumo de aves (pollo, pavo): variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de carne*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de hígado: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de pescado blanco: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de pescado azul: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de marisco: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de pescado en conserva: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de carne en conserva: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de judías guisadas: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- Frecuencia de consumo de alubias en conserva: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.

- Frecuencia de consumo de comida orgánica o de cosecha propia: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al días.
- Frecuencia de consumo de chocolate: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al días.
- Consumo de agua dura ante el embarazo: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: ninguno/1-3 vasos diarios/más de tres vasos diarios.

3.2.5.2 Variables del padre

I. Variable edad

- Edad del padre: Variable cuantitativa continua. Esta variable se recategorizó posteriormente en las siguientes categorías: ≤ 32 y >32 años para el estudio de Madrid y ≤ 34 y >34 años, en el estudio de Granada.

II. Variables referentes a las características sociodemográficas

- Escolaridad del padre: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: estudios primarios/ medios/ superiores, para el estudio de Madrid y Granada.
- Actividad laboral: variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como profesiones afines. Posteriormente fue recodificada en las siguientes categorías: agricultura y otros (Madrid) y trabajo manual, agricultura y otros (Granada).
- Hábito tabáquico: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no (Madrid).

3.2.5.3 Variables del niño

I. Características antropométricas

- Peso al nacimiento: variable cuantitativa continua expresada en gramos. Se utilizaron las categorías: <2500 ó ≥ 2500 g para el análisis estadístico.

- Índice ponderal (IP): variable cuantitativa continua expresada en g/cm^3 . Para el análisis estadístico se utilizaron las categorías: $<2,3$ ó $\geq 2,3$ g/cm^3 para Madrid y $<2,5$ ó $\geq 2,5$ g/cm^3 , para Granada.
- Perímetro cefálico: variable cuantitativa continua expresada en cm. Se utilizaron las categorías: <35 ó ≥ 35 cm en el análisis estadístico de Madrid y Granada.
- Longitud: variable cuantitativa continua expresada en cm.
- Perímetro torácico: variable cuantitativa continua expresada en cm.

II. Características del parto

- Edad gestacional: variable cuantitativa continua expresada en semanas. Se establecieron las siguientes categorías para el análisis bivariado: < 37 semanas/ $37-39$ semanas/ > 39 semanas, y para el análisis multivariado: < 37 semanas y ≥ 37 semanas.
- Tipo de parto: variable categórica nominal policotómica en la que se recogían las siguientes categorías: espontáneo/cesárea/instrumental.

3.2.5.4 Variables del análisis biológico

- Niveles de carga estrógenica total efectiva (TEXB) de alfa y beta: variable cuantitativa continua expresada en Eq pM/mL de cultivo, Eq pM/g placenta y Eq/pM g lípido.
- Presencia o ausencia de carga estrógenica total efectiva (TEXB) de alfa y beta en el tejido placentario: considerando como presente si la TEXB en las fracciones alfa y beta tenía un valor igual o superior al límite de cuantificación ($\geq \text{LC}$) o ausente si se encontró por debajo del mismo ($< \text{LC}$).

3.2.5.5 Análisis de datos

I. Análisis univariado

Para las variables cuantitativas continuas se obtuvieron sus parámetros de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (valores mínimo, máximo y desviación típica). Para las variables categóricas se obtuvo la proporción de cada categoría con respecto al total de sujetos, excluyéndose los casos con valores faltantes.

II. Análisis bivariado

- Variables de la encuesta entre sí: Se utilizó el test de Pearson o Spearman, dependiendo de si las variables continuas tenían una distribución normal o no, respectivamente. Si una de las variables era cuantitativa con distribución normal y la otra cualitativa o cuantitativa categorizada, los tests utilizados fueron la prueba de Levene (dos categorías) o ANOVA de un factor (más de dos categorías); y si una de las variables era cuantitativa con distribución no normal y la otra cualitativa o cuantitativa categorizada, se utilizaron los tests de Mann-Whitney (dos categorías) o Kruskal-Wallis (tres categorías). Por último, si ambas variables eran cualitativas o cuantitativas categorizadas, se utilizaron las tablas de contingencia.

En el caso de la TEXB de la fracción alfa y beta, los valores por debajo del LC se sustituyeron por el valor de la concentración mínima de estradiol necesaria para producir un efecto proliferativo significativo diferente del observado en las células control (1 fmol/mL).

En todos los tests utilizados, se consideró la significación estadística para $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0,1$.

III. Análisis multivariado

En este caso, se estudiaron las posibles asociaciones entre algunas variables de la encuesta (cualitativas o cuantitativas categorizadas) y los niveles de TEXB (variables cuantitativas dependientes). El test aplicado en todos los casos fue el test ANOVA de dos vías.

En este test se consideró que la correlación era estadísticamente significativa a nivel $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0,1$.

IV. Aplicaciones informáticas

Los datos procedentes de las encuestas epidemiológicas fueron introducidos en una base de datos SPSS (versión 18), junto con los datos procedentes del análisis de las muestras biológicas de tejido placentario.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO DE MADRID

4.1.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE MADRID

Se presenta la información obtenida a partir de las preguntas recogidas en el cuestionario epidemiológico que cumplimentaron las madres incluidas en el estudio, con objeto de investigar los posibles factores determinantes de la exposición a xenoestrogénos- disruptores endocrinos, cuantificados mediante el biomarcador de exposición TEXB en muestras de tejido placentario.

A continuación, se muestran las variables de interés, incluyendo el valor de la media, mediana, desviación estándar, máximo y mínimo, para las variables cuantitativas y el valor de la frecuencia y porcentaje, para las variables cualitativas.

4.1.1.1 Características de la madre**4.1.1.1.1 Variables antropométricas****I) Edad**

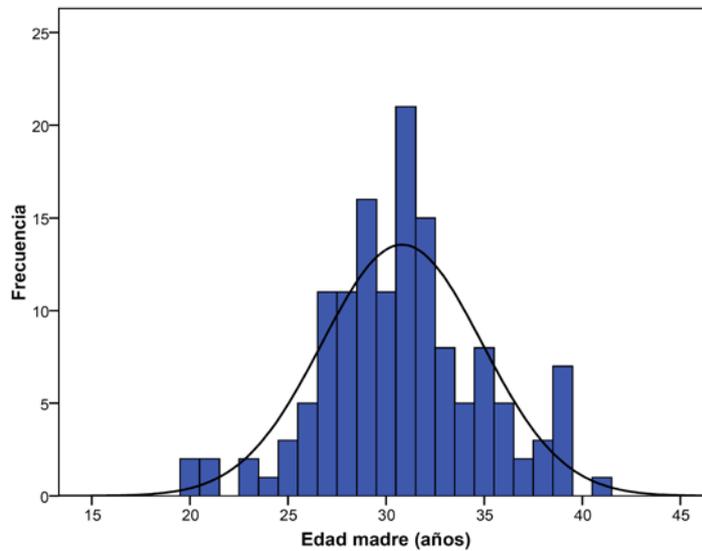
La edad media de las madres del estudio de Madrid, recogida en el tercer trimestre del embarazo, fue de aproximadamente 31 años ($DE \pm 4,1$), con un mínimo de 20 y un máximo de 41 años.

Edad (años)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	30,81 \pm 4,10	31,00		
<28			26	18,7
28-30			38	27,3
31-33			44	31,7
>33			31	22,3
Total			139	100,0

DE: Desviación Estándar

La variable se recodificó posteriormente en dos categorías ≤ 31 años y > 31 años, utilizando el valor de la mediana como punto de corte.

Edad (años)	n	%
≤ 31	85	61,2
> 31	54	38,8
Total	139	100,0



La distribución de esta variable, como muestra el histograma, presentó una distribución no normal.

II) Peso antes y al final del embarazo. Ganancia de peso.

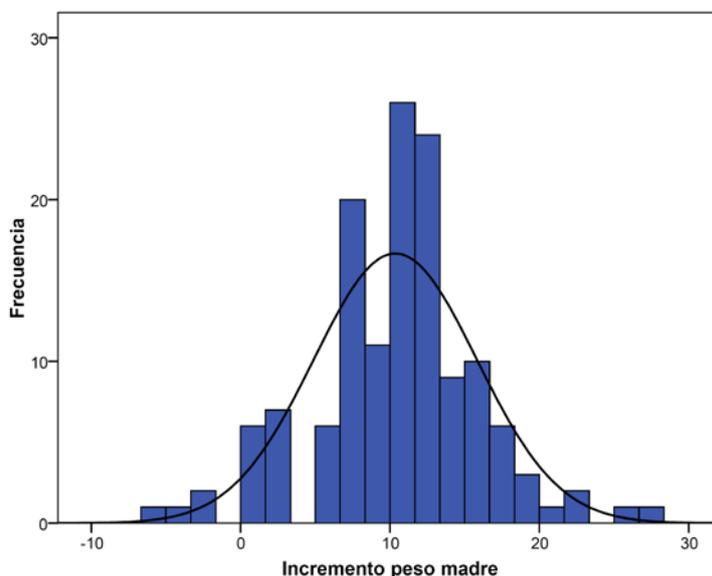
En la población del estudio de Madrid, las madres tenían al comienzo del embarazo un peso medio de $62,36 \pm 11,13$ Kg, con un rango de valores entre 41 y 95 Kg. En el momento del parto las madres tenían un peso medio de $72,75 \pm 11,45$ Kg, con un rango de valores entre 50 y 116 Kg, según muestra la tabla siguiente. Por lo tanto, el incremento medio del peso durante el embarazo fue de $10,35 \pm 5,46$ Kg, con un valor mínimo de -6 Kg y un valor máximo de 27 Kg. La variable “ ganancia de peso ” se recodificó para los análisis estadísticos posteriores en dos categorías, seleccionando como punto de corte el valor de la mediana (10Kg).

	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE
Peso antes	138	41,00	95,00	60,00	62,36	11,13
Peso final	138	50,00	116,00	72,00	72,75	11,45
Ganancia peso	137	-6,00	27,00	10,00	10,35	5,46

DE: Desviación Estándar

Ganancia de peso	n	%
≤ 10 Kg	70	51,1
> 10 Kg	67	48,9
Total	137	100,0

Para dos madres de la población reclutada no se pudo conseguir esta información. La gráfica siguiente muestra la distribución que sigue la ganancia de peso de la población estudiada de Madrid, comprobando que esta variable sigue una distribución cercana a la normalidad.



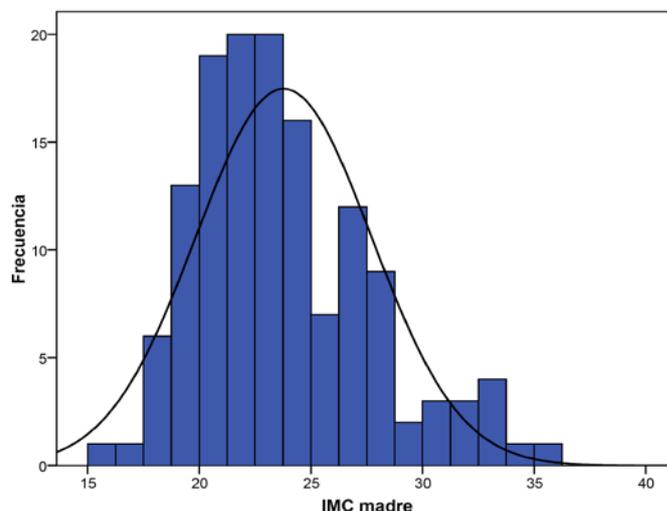
III) Índice de Masa Corporal (IMC)

El IMC se calculó dividiendo el peso de la mujer (en Kg) antes de quedarse embarazada, entre la talla en metros elevada al cuadrado (Kg/m^2). El valor medio obtenido fue de $23,78 \pm 3,94 \text{ Kg}/\text{m}^2$, peso normal según criterio de la Organización Mundial para la Salud (OMS).

	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE
IMC (Kg/m^2)	138	15,06	36,05	22,97	23,78	3,94

DE: Desviación estándar.

La distribución de la variable IMC, como muestra el histograma, presentó una distribución cercana a la normalidad.



En la siguiente tabla se muestra la distribución de las madres del estudio según su IMC, tomando como referencia los rangos establecidos por la OMS. Como podemos observar, el 63,1% de las madres se engloban en el rango correspondiente a peso normal, el 21,7% de las madres presentaban sobrepeso y un 8,7% obesidad.

IMC (Kg/m ²)	n	%
Bajo peso ($\leq 18,50$)	9	6,5
Peso Normal (18,50-24,99)	87	63,1
Sobrepeso (25,00-29,99)	30	21,7
Obesidad, Clase I (30,00-34,99)	11	8,0
Obesidad, Clase II (35-39,99)	1	0,7
Total	138	100,0

4.1.1.1.2 Variables sociodemográficas

I) Estado civil

El 74,10 % de las mujeres del estudio de Madrid estaban casadas y un 25,20% tenían pareja estable.

Estado civil	n	%
Casada	103	74,1
Convive con pareja estable	35	25,2
Separada o divorciada	1	0,7
Total	139	100,0

II) Lugar de residencia

Se consideró como área urbana, aquellas poblaciones con un número de habitantes igual o mayor a 10.000 habitantes y como área rural, aquellas poblaciones con un número menor de 10.000 habitantes. Prácticamente la totalidad de la población de estudio (92,4%) residía en un área urbana y llevaban viviendo en esos municipios una media de 17 años. Los municipios son: Madrid (46,6%), Getafe (22,1%) y Parla (13,7%). Para el 5,8% de la población reclutada no se pudo conseguir esta información.

Tipo municipio	n	%
Rural (<10.000 habs.)	10	7,6
Urbano (≥10.000 habs.)	119	92,4
Total	131	100,0

III) Nivel de estudios

La mayoría de las madres participantes en el estudio de Madrid contaban con la primaria terminada (28,7%). El 36,7% poseía estudios de grado medio y un 34,60% declaró tener estudios universitarios.

Nivel de estudios	n	%
Primaria completa	40	28,7
Formación Profesional	20	14,4
Bachiller Superior	31	22,3
Diplomatura	29	20,9
Licenciatura	19	13,7
Total	139	100,0

Para el análisis estadístico, estas categorías se recodificaron en tres grupos: estudios primarios, medios y superiores.

Nivel estudios	n	%
Primarios	40	28,7
Medios	51	36,7
Superiores	48	34,6
Total	139	100,0

IV) Actividad laboral durante el embarazo

Para llevar a cabo la descripción de la actividad laboral de las participantes durante su embarazo, se llevó a cabo una agrupación de las actividades laborales registradas en el cuestionario epidemiológico, teniendo en cuenta nivel de formación, afinidad del puesto y posibilidad de exposición a contaminantes ambientales durante el desarrollo de la misma. Se consideraron finalmente cuatro grupos, según se detalla en la tabla siguiente.

Resultados

Actividad laboral	n	%
Grupo 1: secretarias y auxiliares administrativas y profesoras.	65	50,4
Grupo 2: Dependientas de tiendas, almacenes y mercados.	25	19,4
Grupo 3: Personal sanitario y personal de limpieza.	25	19,4
Grupo 4: Camareras y cocineras	14	10,9
Total	129	100,0

Más del 50% de las madres reclutadas se incluyeron en el grupo 1, siendo mayoritarias las que desarrollaban tareas de secretariado y administración (27,2%) y las dedicadas a la enseñanza (10,8%). En los puestos descritos en el grupo 2, el mayor porcentaje se asignó al puesto de dependiente de tiendas, almacenes y mercados (11,6%). En el grupo 3, destacaríamos al personal sanitario (5,5%) y personal de limpieza de oficinas y hoteles (4,7%). En el grupo 4, aparecen como mayoritarios puestos de camarera (4,7%) y cocineros (2,4%).

V) Percepción de la exposición a productos químicos

Esta variable recoge la percepción que las madres tenían de haber estado expuestas a compuestos químicos durante el embarazo. Por ejemplo, el cuestionario epidemiológico incluía información referente a la exposición a insecticidas de uso doméstico (ej. utilización de insecticidas en el interior o exterior de su casa). El 31% de las mujeres del estudio respondió afirmativamente.

Percepción exposición productos químicos	n	%
Si	43	30,9
No	96	69,1
Total	139	100,0

La frecuencia de utilización de estos compuestos era mayoritariamente de dos veces al año (28,2%) y el uso de este tipo de productos era principalmente en el interior (60,5%).

4.1.1.1.3 Características reproductivas de la madre

I) Paridad

Esta variable recoge el número de niños nacidos vivos y/o muertos (abortos), previos al reclutamiento. Si no hay antecedentes previos de otros embarazos la madre se clasifica como primípara, en todos los demás casos la madre se clasifica como múltipara. El 57,60% de las madres del estudio de Madrid eran primíparas y el 72,9% de las mujeres múltiparas habían estado ya embarazadas al menos una vez.

Paridad	n	%
Primípara	80	57,6
Múltipara	59	42,4
Total	139	100,0

Embarazos previos	n	%
1	43	72,9
2	15	25,4
3	1	1,7
Total	59	100,0

II) Métodos anticonceptivos

Esta variable no aparece explícitamente en el cuestionario del estudio de Madrid, aunque se ha obtenido a partir de la pregunta sobre si “tomaba algún medicamento antes de quedarse embarazada”. El 10,1% de las madres del estudio declaró haber tomado anticonceptivos orales.

Uso de anticonceptivos	N	%
Sí	14	10,1
No	125	89,9
Total	139	100,0

III) Tratamiento por problemas de fertilidad

El 96,4% de las mujeres afirmaron no tener problemas de fertilidad. Sólo 5 mujeres afirmaron haber visitado a un médico para ser tratadas por problemas de fertilidad, y tan sólo una de ellas recibió tratamiento, con inductores de ovulación.

Tratamiento de infertilidad	n	%
Si	5	3,6
No	134	96,4
Total	139	100,0

4.1.1.1.4 Características del parto**I) Edad gestacional**

La mayoría de los niños (89,3%) nacieron con una edad gestacional por encima de 37 semanas, con un rango comprendido entre 35 y 42 semanas de gestación.

	n	Mínimo	Máximo	Media	DE
Edad gestacional (semanas)	112	35	42	39,16	1,42

DE: Desviación estándar

Para el análisis bivariante esta variable se codificó en tres categorías: ≤ 37 semanas, $> 37 - 39$ semanas y por encima de 39 semanas de gestación.

Edad gestacional	n	%
≤ 37 semanas	12	10,7
$> 37-39$ semanas	44	39,3
> 39 semanas	56	50,0
Total	112	100,0

II) Tipo de parto

La mayoría de los niños del estudio de Madrid nacieron mediante parto espontáneo (61,10%), y un 38,9% mediante parto inducido; El porcentaje de cesáreas en el estudio de Madrid fue de 15,9%, como se muestra en la tabla siguiente, con lo cual se superó ligeramente el límite del 15% de cesáreas aconsejado por la OMS.

Tipo de parto	n	%
Vaginal	69	61,1
Fórceps	19	16,8
Cesárea	18	15,9
Otros	7	6,2
Total	113	100,0

4.1.1.1.5 Antecedentes clínicos

I) Problemas durante el embarazo

El 29,5% de las madres relató algún problema durante el embarazo, siendo la infección de orina (21,6%), la diabetes gestacional (19,6%) y la pérdida de líquido y/o sangre (17,7%), las incidencias más frecuentemente registradas.

Problemas durante el embarazo	n	%
Si	41	29,5
No	98	70,5
Total	139	100,0

En algunas ocasiones la misma madre padeció varios de estos problemas a lo largo del embarazo. Dentro del epígrafe “otros” se incluyen patologías como: amenaza de aborto, placenta baja, fiebre, líquido teñido, amenaza de parto, etc.

Tipo de problema	n	%
Infección de orina	11	21,6
Diabetes gestacional	10	19,6
Pérdida líquido o sangre	9	17,7
Tensión arterial	5	9,8
Contracciones	4	7,8
Otros	12	23,5
Total	51	100,0

II) Consumo de medicamentos y suplementos dietéticos

En el cuestionario epidemiológico se incluyeron las preguntas: ¿tomaba algún medicamento de forma habitual antes de quedarse embarazada? y ¿ha tomado medicación durante el embarazo? Como muestran las tablas siguientes, el 20,9% de la población consumía de manera habitual algún medicamento antes de quedarse embarazada; si embargo, este porcentaje se eleva al 44,6% durante el embarazo.

¿Tomaba algún medicamento de forma habitual antes de quedarse embarazada?	n	%
Si	29	20,9
No	110	79,1
Total	139	100,0

¿Ha tomado medicación durante el embarazo?	n	%
Si	62	44,6
No	77	55,4
Total	139	100,0

En cuanto al consumo de suplementos dietéticos durante el embarazo, el 81,3% de las madres verificó que tomó uno o varios suplementos dietéticos, siendo los más habitualmente consumidos el ácido fólico y el hierro, ambos en un porcentaje del 39,8% de las mujeres incluidas en el estudio.

Consumo de suplementos dietéticos	n	%
Sí	113	81,3
No	26	18,7
Total	139	100,0

Tipo de suplemento	n	%
Ácido Fólico y similares	45	39,8
Hierro	45	39,8
Suplementos vitamínicos con Calcio	20	17,7
Terapia hormonal	3	2,7
Total	113	100,0

4.1.1.1.6 Hábitos de consumo de alcohol y tabaco durante el embarazo

I) Consumo de alcohol

La mayoría de las mujeres declararon un bajo consumo de alcohol durante el embarazo. El 82,2% de las madres declaró no tomar vino tinto en este periodo, y de las pocas madres que consumían lo hacían con una frecuencia de 1 vaso o más por semana (5,3 %; 1 vaso, 125 ml). El consumo de cerveza fue algo más elevado. Un 15,8% de las participantes declaró tomar una cerveza o más a la semana. La ingestión de vino blanco, rosado, jerez o vinos secos, fue muy esporádica.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Vino tinto	109 (82,2)	17 (12,8)	7 (5,3)
Vino blanco	123 (92,5)	10 (7,5)	-
Jerez	125 (94,0)	8 (6,0)	-
Cerveza	95 (71,4)	17 (12,8)	21 (15,8)

*Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 vaso al mes.

El consumo de licores de alta graduación (20 – 25°) y otras bebidas espirituosas con mayor grado alcohólico, como el brandy, ginebra, ron, whisky, vodka o aguardiente, fue prácticamente inexistente. El 98,5% de las madres declararon en la encuesta no tomar licores. Tan sólo dos madres indicaron que consumían licores de alta graduación, con una frecuencia de 1 vez por semana.

II) Hábito tabáquico

Aproximadamente el 53% de las mujeres del estudio de Madrid respondió afirmativamente a la pregunta “¿fuma o ha fumado a lo largo de su vida?”. Entre las mujeres fumadoras, cuando la pregunta de hábito tabáquico se refirió al periodo del embarazo, sólo respondieron afirmativamente el 33,8%. Las mujeres fumadoras consumían una media de 5 cigarrillos/día.

¿Fuma o ha fumado a lo largo de su vida?	n	%
Si	74	53,2
No	65	46,8
Total	139	100,0

¿Ha fumado durante el embarazo?	n	%
Si	25	33,8
No	49	66,2
Total	74	100,0

III) Exposición pasiva al tabaco

Respecto a la exposición pasiva al tabaco, el 28% de las mujeres respondieron afirmativamente cuando se les preguntó si alguna persona había fumado regularmente dentro de su casa desde que su po que estaba embarazada, cuantificando esta exposición pasiva como “escasa”, (el 15,1% expresó que la frecuencia de consumo de tabaco de terceras personas en el ámbito familiar era poca) o como “alta” (el 12,9% expresó que la frecuencia de consumo de tabaco de terceras personas en el ámbito familiar era de bastante a mucha).

¿Ha fumado alguna persona en su casa desde que sabe que está embarazada?	n	%
Sí	39	28,1
No	100	71,9
Total	139	100,0

También se les preguntó a las gestantes participantes sobre exposición pasiva al tabaco en los lugares de trabajo. El 50% de las mujeres respondió afirmativamente, es decir, la mitad de ellas compartía su espacio de trabajo con personas que fumaban.

¿Comparte su espacio de trabajo con personas que fuman?	n	%
Sí	70	50,4
No	69	49,6
Total	139	100,0

4.1.1.1.7 Exposición por empastes dentales

Se recogió en la encuesta epidemiológica la exposición a compuestos químicos de síntesis, empleados en empastes dentales y selladores. El 90% de las mujeres del estudio de Madrid indicaron tener empastes dentales de cualquier tipo. El número medio de empastes fue en esta población de $5,58 \pm 4,57$.

Empastes dentales	n	%
Si	125	89,9
No	14	10,1
Total	139	100,0

Para poder establecer si la posible exposición a contaminantes ambientales vehiculizada por empastes había sido reciente, en la encuesta de Madrid se preguntaba a las madres si “le habían realizado algún empaste durante el último año”. Una veintena de mujeres (14,4%) respondieron afirmativamente a esta pregunta.

Empastes durante el último año	n	%
Si	20	14,4
No	119	85,6
Total	139	100,0

4.1.1.1.8 Características referentes a aspectos relacionados con la dieta

A continuación se muestran los datos obtenidos en el análisis de las encuestas referentes a hábitos alimentarios, de las mujeres embarazadas del estudio de Madrid, expresando el consumo de cada grupo de alimentos en las distintas frecuencias establecidas (casi nunca, menos de una vez por semana, varias veces por semana, una vez al día, etc.).

I) Consumo de productos lácteos

En el caso de los lácteos, la frecuencia de consumo recomendada es de 2 a 3 raciones al día. De los datos recogidos en el cuestionario de frecuencia alimentaria, respecto al consumo de leche, se puede observar que las mujeres bebían entre uno y varios vasos de leche al día (entera, semidesnatada o desnatada), en los porcentajes que recoge la tabla siguiente.

	n (%)			
	Casi nunca*	< 1/día	1/día	> 1/día
Leche entera	63 (47,4)	20 (15,0)	25 (18,8)	25 (18,8)
Leche semidesnatada	57 (42,9)	19 (14,3)	18 (13,5)	39 (29,3)
Leche desnatada	87 (65,4)	11 (8,3)	10 (7,5)	25 (18,8)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 vaso al mes.

Por lo que respecta al consumo de yogurt, las madres del estudio se decantaban preferentemente por el consumo de yogurt entero frente al desnatado, como muestra la tabla siguiente.

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	≥ 1/día
Yogurt entero	22 (16,5)	23 (17,3)	56 (42,1)	32 (24,1)
Yogurt desnatado	68 (51,1)	14 (10,5)	33 (24,8)	18 (13,5)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Para describir la frecuencia alimentaria de consumo de queso en la población de estudio, se consideró una ración de 100 g en el caso del queso fresco y/o requesón, y una porción de 50 g para el curado. En la categoría de queso fresco se incluyó también el requesón y en la de queso curado, se consideraron otros quesos con menor curación, semicurados y cremosos. Los porcentajes de consumo se muestran en la tabla siguiente:

Resultados

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/día	1/día
Queso fresco	31 (23,3)	82 (61,7)	20 (15,0)
Queso curado	19 (14,4)	84 (63,6)	29 (22,0)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Por último, dentro del apartado de alimentos lácteos, se consideró el consumo de nata y/o crema de leche, tomando como unidad 1 cucharada. Como muestra la tabla siguiente, el consumo de nata y/o crema de leche en la población de estudio fue bastante esporádico, ya que la mayoría de las madres (94,7%) lo consumían con una frecuencia menor o igual a una cucharada por semana.

Nata	n	%
≤ 1/semana	126	94,7
> 1/semana	7	5,3
Total	133	100,0

II) Consumo de verduras

La frecuencia de consumo recomendada en la dieta mediterránea, para vegetales y hortalizas debe ser diaria. Para cuantificar la periodicidad de consumo de verduras y hortalizas se consideró un plato mediano.

Como muestra la siguiente tabla, las madres del estudio de Madrid comían ensalada de lechuga en un alto porcentaje, con una frecuencia de más de un plato por semana (47,4%), y un 21,1% lo hacían con un plato o más al día. En la categoría de lechuga también se incluían las endibias y la escarola. Para el tomate y la cebolla se consideró una pieza mediana, para llevar a cabo los cálculos de frecuencia de consumo.

	n (%)			
	≤ 1-3 /mes	1/semana	> 1/semana	≥ 1/día
Lechuga	12 (9,0)	30 (22,6)	63 (47,4)	28 (21,1)
Tomate	16 (12,0)	15 (11,3)	73 (54,9)	29 (21,8)
Cebolla	26 (19,5)	29 (21,8)	61 (45,9)	17 (12,8)

En la tabla siguiente se refleja la frecuencia de consumo de espinacas, donde también se incluyen a las acelgas, judías verdes y coles (col, coliflor y brócoli).

	n (%)			
	Casi nunca*	< 1/semana	1/semana	> 1/semana
Espinacas	27 (20,3)	35 (26,3)	40 (30,1)	31 (23,3)
Coles	35 (26,3)	41 (30,8)	35 (26,3)	22 (16,5)
Judías verdes	8 (6,0)	29 (21,8)	54 (40,6)	42 (31,6)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Para cuantificar el consumo de berenjenas-calabacines y pimientos se consideró como unidad de medida una pieza de estos vegetales. En nuestra población de estudio, el consumo de estos alimentos es más bien bajo, registrándose los mayores porcentajes en la frecuencia de menor o igual a una pieza por semana.

	n (%)		
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana
Berenjenas	18 (13,5)	87 (65,4)	28 (21,1)
Pimientos	24 (18,0)	81 (60,9)	28 (21,1)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Resultados

Para el cálculo del consumo de alcachofas se consideró una ración de 100 g, para los espárragos un plato, y para el maíz hervido, un plato o lata pequeña de 82 g. Como se puede apreciar en la siguiente tabla el consumo de estos vegetales, fue mayoritario en la frecuencia de mayor o igual a una vez por semana.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Alcachofas	46 (34,6)	40 (30,1)	47 (35,3)
Espárragos	26 (19,5)	47 (35,3)	60 (45,1)
Maíz hervido	60 (45,1)	33 (24,8)	40 (30,1)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

III) Consumo de legumbres

La frecuencia de consumo recomendada para las legumbres es de 2-3 raciones/semana. Si analizamos los datos obtenidos de la encuesta de frecuencia alimentaria, la población de estudio no alcanza el consumo recomendado, ya que sólo el 48,9% de las madres declara consumir legumbres (un plato medio de garbanzos, lentejas, judías pintas o blancas), varias veces por semana.

	n (%)		
	≤ 1-3 /mes	1/semana	> 1/semana
Legumbres	15 (11,3)	53 (39,8)	65 (48,9)

IV) Consumo de fruta

Siguiendo las recomendaciones de la dieta mediterránea, la frecuencia de consumo adecuada para la fruta debe ser diaria. En la tabla siguiente se especifica la frecuencia de ingesta de diversos tipos de frutas, considerando para el cálculo del consumo una pieza mediana. En la categoría de naranja se engloba también las mandarinas, y en la categoría de la manzana se incluye

también la pera, así como en la de melocotón, a la nectarina y el albaricoque. La fruta preferida de consumo casi diario en las madres del estudio de Madrid fue la naranja (45,1%).

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	≥ 1/día ^a
Plátano	22 (16,5)	44 (33,1)	54 (40,6)	13 (9,8) ^a
Naranja	5 (3,8)	11 (8,3)	57 (42,9)	60 (45,1)
Manzana	15 (11,3)	37 (27,8)	66 (49,6)	15 (11,3)
Melocotón	51 (38,3)	38 (28,6)	34 (25,6)	10 (7,5)
Sandía /melón	56 (42,1)	44 (33,1)	24 (18,0)	9 (6,8)
Kiwi	44 (33,1)	24 (18,0)	50 (37,6)	15 (11,3)
Zumo natural	21 (15,8)	32 (24,1)	42 (31,6)	38 (28,6)
Zumo envasado	43 (32,3)	26 (19,5)	39 (29,3)	25 (18,8)

^a 1 pieza al día, * Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

El consumo de otro tipo de frutas como por ejemplo las uvas (un racimo mediano) y las ciruelas (1 pieza o 37 g de ciruelas pasas) en las madres del estudio de Madrid, no fue muy importante.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Uvas	54 (40,6)	41 (30,8)	38 (28,6)
Ciruelas	75 (56,4)	20 (15,0)	38 (28,6)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Por lo que respecta al consumo de zumos, las madres del estudio se decantaron más por el zumo de naranja natural que por los zumos envasados.

V) Consumo de carnes, vísceras y embutidos

Los patrones de frecuencia de consumo de carne se recodificaron en las categorías mostradas en las tablas siguientes, pudiéndose afirmar que el consumo global de los distintos tipos de carne se ajustó a las recomendaciones

Resultados

establecidas por la dieta mediterránea, es decir, 1-3 veces por semana. En cuanto al consumo de carnes de ave, las mujeres encuestadas preferían el pollo sin piel, siendo su consumo generalmente bajo, menor o igual a una pieza a la semana. Sin embargo la carne de ternera, cerdo o cordero la consumían con mayor frecuencia (más de una vez por semana). Por último, el consumo de carne de caza (conejo, codorniz o pato) fue esporádico en nuestra población.

	n (%)		
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana
Pollo con piel	45 (33,8)	63 (47,4)	25 (18,8)
Pollo sin piel	22 (16,5)	71 (53,4)	40 (30,1)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Ternera, cerdo o cordero	n	%
≤ 1/semana	53	39,8
> 1/semana	80	60,2
Total	133	100

Carne de caza	n	%
< 1/mes	92	69,2
≥ 1/mes	41	30,8
Total	133	100

Por lo que respecta al consumo de hamburguesas, tocino y panceta, el 40% de las madres preferían las hamburguesas, con una frecuencia inferior a una por semana. Para el cálculo se consideró una hamburguesa de tamaño medio, de unos 100 g y para el tocino, dos lonchas o tiras, 50 g.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Hamburguesa	47 (35,3)	54 (40,6)	32 (24,1)
Panceta, tocino	69 (51,9)	42 (31,6)	22 (16,5)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

El consumo de hígado de ternera, cerdo o pollo, como se puede observar en la siguiente tabla, presentó una frecuencia de consumo baja, ajustándose a lo recomendado (no más de 2 veces al mes). El 66,9% de las mujeres no lo consumía o lo hacía con una frecuencia inferior a una ración (100 g) al mes.

Hígado	n	%
Casi nunca*	89	67,0
1-3 /mes	22	16,5
≥ 1/semana	22	16,5
Total	133	100,0

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

La tabla siguiente recoge los datos referidos a la frecuencia de consumo de fiambres y embutidos, reflejado como consumo mensual, semanal o diario. El consumo de embutidos (jamón, salchichón, salami, mortadela, etc.), se ajustó a una ración de unos 50 g. Como se puede observar, el 54% de las mujeres del estudio de Madrid consumían una ración de embutidos, una o más veces por semana.

Embutidos	n	%
Casi nunca*	32	24,1
< 1/semana	18	13,5
≥ 1/semana	72	54,1
1/día	11	8,3
Total	133	100,0

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

VI) Consumo de pescado

En cuanto a la ingesta de pescado, la frecuencia de consumo obtenida en el cuestionario se recodificó en las categorías reflejadas en la tabla siguiente. La mayor parte de las mujeres de nuestro estudio afirmó haber tomado pescado, con una frecuencia mayor o igual a una ración a la semana. Las mujeres consumían variedad de pescado, y a sea frito, hervido o a la plancha,

Resultados

acercándose a las recomendaciones de consumo medio de 4 raciones a la semana. El mayor porcentaje aparece para el pescado blanco (65,4%), seguido por el pescado frito variado (56,4%). En la categoría de pescado blanco se consideró merluza, lenguado y/o dorada. En la categoría de pescado azul, se incluyen atún, emperador o bonito y cuando hablamos de otros pescados azules, se refiere a caballa, sardinas, boquerón, anchoa o salmón.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Pescado azul	30 (22,6)	37 (27,8)	66 (49,6)
Otros pescados azules	30 (22,6)	40 (30,1)	63 (47,4)
Pescado frito variado	28 (21,1)	30 (22,6)	75 (56,4)
Pescado blanco	17 (12,8)	29 (21,8)	87 (65,4)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

VII) Consumo de marisco

El consumo de mariscos fue bastante desigual entre la población estudiada, destacando la ingesta de cefalópodos (calamares, chipirones, sepia, choco o pulpo) en un 20,3% de la población y con una frecuencia de 1 o más veces a la semana. La categoría de moluscos incluye almejas, mejillones u ostras. Para la categoría “otros” se engloban las gambas, langostinos, cangrejos o langosta, considerando una ración de 100 g para la realización del cálculo del consumo.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Moluscos	74 (55,6)	43 (32,3)	16 (12,0)
Cefalópodos	48 (36,1)	58 (43,6)	27 (20,3)
Otros	56 (42,1)	56 (42,1)	21 (15,8)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

VIII) Consumo de huevos

En cuanto al consumo de huevos, excelente aporte de proteínas de alto valor biológico, se ha encontrado que un 76,7% de las madres los tomaba con una frecuencia mayor de 1 ración (1 huevo) por semana, acercándose a la recomendación de 3 raciones a la semana.

Huevos	n	%
≤ 1/semana	31	23,3
> 1/semana	102	76,7
Total	133	100,0

IX) Consumo de alimentos enlatados

En cuanto a las conservas, un 62,4% de las mujeres encuestadas declaró que consumía latas de bonito o atún, con una frecuencia mayor o igual a una lata pequeña a la semana.

	n (%)		
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana
Lata bonito/atún	16 (12,0)	32 (24,1)	83 (62,4)
Lata de sardinas/caballa	57 (42,9)	45 (33,8)	31 (23,3)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

X) Consumo de pan, féculas y cereales

Los resultados obtenidos de la encuesta de frecuencia alimentaria nos indican que las madres del estudio de Madrid, consumieron preferentemente pan blanco (una pieza pequeña o 3 rebanadas de pan de molde), con un porcentaje de 55,7%, para las frecuencias de una o más veces al día.

Resultados

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	≥ 1/día
Pan blanco	8 (6,0)	14 (10,6)	37 (27,8)	74 (55,7)
Pan integral	66 (49,6)	22 (16,5)	24 (18,0)	21 (15,8)
Cereales	60 (45,1)	35 (26,3)	20 (15,0)	18 (13,5)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Para el cálculo del consumo de patatas se considero una pieza mediana, para la categoría de patata cocida y una ración de 100g, en el caso de las patatas fritas. En la categoría de bolsa de patatas fritas, se utilizó como medida una bolsa pequeña de 25-30g. Nuestra población de estudio consumía patatas con asiduidad, sobre todo fritas y cocidas, presentando por centajes aproximadamente del 30%, para frecuencias de una vez por semana o más veces a la semana.

	n (%)			
	Casi nunca*	< 1/semana	1/semana	> 1/semana
Patatas fritas	13 (9,8)	38 (28,6)	40 (30,1)	42 (31,6)
Patatas cocidas	13 (9,8)	36 (27,1)	48 (36,1)	36 (27,1)
Bolsa patatas	31 (23,3)	51 (38,3)	36 (27,1)	15 (11,3)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Respecto al consumo de pasta, el 41,4% de las madres consumían un plato de pasta (espagueti, fideos o macarrones), más de una vez por semana. La ingesta de arroz representó un porcentaje algo inferior, del 32,3%.

	n (%)		
	Casi nunca*	1/semana	> 1/semana
Pasta	8 (6,0)	70 (52,6)	55 (41,4)
Arroz	22 (6,5)	68 (51,1)	43 (32,3)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

XI) Ingesta de líquidos

El consumo de agua en la población estudiada de Madrid estaba basado en la ingesta de agua del grifo, considerando un vaso de 250 ml, la medida para efectuar los cálculos de consumo. Un 83,4% de las madres bebían varios vasos de agua del grifo al día y sólo un 15,8 % consumían varias veces al día agua embotellada durante el embarazo. El consumo de agua embotellada con gas fue esporádico.

	n (%)			
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana	≥ 1/día
Agua grifo	12 (9,0)	-	8 (6,1)	111 (83,4)
Embotellada	70 (52,6)	17 (12,8)	25 (18,8)	21 (15,8)
Agua con gas	111 (83,5)	7 (5,3)	15 (11,3)	-

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Respecto al consumo de café, casi un 30 % de las madres del estudio de Madrid continuó tomando café durante el embarazo, con una frecuencia de una taza o más al día.

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	≥ 1/día
Café	59 (44,4)	19 (14,3)	16 (12,0)	39 (29,9)
Descafeinado	61 (45,9)	24 (18,0)	16 (12,0)	32 (24,1)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

La frecuencia semanal de refrescos tipo coca-cola, fanta, etc., fue superior a los refrescos sin azúcar en la población de estudio.

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	≥ 1/día
Refrescos	33 (24,8)	51 (38,3)	42 (31,6)	7 (5,3)
Refrescos light	61 (45,9)	38 (28,6)	26 (19,5)	8 (6,0)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

XII) Consumo de aceites

En relación a la ingestión de grasas, se recabaron datos de forma independiente acerca del consumo de aceites vegetales y de mantequilla/margarina. Respecto al tipo de aceite vegetal consumido, los datos quedan reflejados en la tabla siguiente.

Aceite de oliva	n	%	Otros aceites	n	%
≤ 1/semana	13	9,8	Casi nunca*	91	68,4
> 1/semana	31	23,3	≤ 1/semana	18	13,5
1/día	47	35,3	> 1/semana	13	9,8
> 1/día	42	31,6	≥ 1/día	11	8,3
Total	133	100,0	Total	133	100,0

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Es interesante observar que el consumo de aceite de oliva, utilizado como aliño en la mesa (una cucharada sopera), supera el 65% de la población, con frecuencia de una o más veces al día, en detrimento de otros tipos de aceite, respaldando claramente la dieta mediterránea.

Los datos referidos al tipo de mantequilla y/o margarina utilizada, y a la frecuencia de consumo se agrupan en la tabla siguiente.

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	1/día
Margarina	52 (39,1)	39 (29,3)	27 (20,3)	15 (11,3)
Mantequilla	75 (56,4)	29 (21,8)	22 (16,5)	7 (5,3)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

XIII) Otros alimentos

El consumo de alimentos frutivos tales como dulces, chocolate, cacao fueron ingeridos de forma desigual por la población de estudio. Por ejemplo, para la categoría galleta tipo “María” se consideró una galleta como unidad para realizar el cálculo de la frecuencia de consumo. En la categoría bollería se

incluyó una unidad de magdalena, donut o croissant o una porción de tarta o bizcocho.

	n (%)			
	Casi nunca*	≤ 1/semana	> 1/semana	≥ 1/día
Galletas tipo María	21 (15,8)	34 (25,6)	42 (31,6)	36 (27,1)
Galletas con chocolate	48 (36,1)	54 (40,6)	22 (16,5)	9 (6,8)
Bollería	14 (10,5)	59 (44,4)	39 (29,3)	21 (15,8)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Las madres del estudio de Madrid tomaban una pequeña pieza de chocolate o dos bombones, con una frecuencia de una o más veces a la semana. Para el consumo de cola-cao, chocolate en polvo o si milares, representado por una cucharada sopera, un 28,6% de las madres afirmó que lo tomaba con una frecuencia de 1 o más veces al día.

	n (%)			
	Casi nunca*	< 1/semana	≥ 1/semana	≥ 1/día
Chocolate	24 (18,0)	45 (33,8)	56 (42,1)	8 (6,0)
Cola-Cao	44 (33,1)	20 (15,0)	31 (23,3)	38 (28,6)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

Los aperitivos (aceitunas y frutos secos), fueron consumidos por el 25% de las madres, con una frecuencia de varias veces por semana. Para realizar los cálculos de consumo, la categoría “aceitunas” se refería a una tapa de unas 15 aceitunas, y la de los frutos secos se valoraba como una bolsa pequeña de 30 g.

	n (%)			
	Casi nunca*	< 1/semana	1/semana	> 1/semana
Aceitunas	34 (25,6)	31 (23,3)	35 (26,3)	33 (24,8)
Frutos secos	25 (18,8)	40 (30,1)	34 (25,6)	34 (25,6)

* Casi nunca engloba consumos de 0 a menos de 1 al mes.

En conclusión, y a la vista de los resultados obtenidos a partir del cuestionario de frecuencia alimentaria de la población de Madrid, podemos decir que la dieta se asemeja bastante a los patrones de la dieta mediterránea. Cabría destacar el consumo de frutas, verduras y legumbres, bastante alto en comparación a otras poblaciones. Por otra parte, presenta un patrón de consumo de pescado bastante acorde con el patrón de la dieta mediterránea, mientras que el consumo de carnes es moderado y, por tanto, similar a los patrones de la dieta mediterránea si bien, el consumo de embutidos sí que estaría por encima de lo deseable. También, cabe comentar que el patrón de ingestión de productos lácteos y cereales (pan, pasta, arroz, cereales de desayuno, galletas) está muy en la línea de los estándares de la dieta mediterránea, al igual que en el caso de los lácteos. Asimismo, destacaríamos el empleo casi exclusivo del aceite de oliva en la elaboración de las comidas, como en el aderezo de ensaladas, etc. en detrimento de otros aceites vegetales y/o mantequilla, etc.

En definitiva y, considerando la media de consumo de las madres participantes en la muestra, se podría concluir que su dieta se asemeja bastante al patrón de dieta mediterránea en cuanto a macronutrientes, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

4.1.1.2 Características del padre

Se presentan a continuación algunas de las características sociodemográficas de interés para este estudio referentes al padre, obtenidas a partir de los cuestionarios epidemiológicos.

4.1.1.2.1 Edad

La edad media de los padres incluidos en el estudio fue de $32,5 \pm 4,7$, con un mínimo y un máximo de 22 y 52 años, respectivamente. La variable recodificada en cuartiles se presenta en la tabla siguiente:

Edad (años)	n	%
< 32	62	44,6
33-34	37	26,6
35-40	33	23,7
> 40	7	5,0
Total	139	100,0

4.1.1.2.2 Características sociodemográficas

I) Nivel de estudios

El 36,0% de los padres del estudio de Madrid tenían estudios primarios, un porcentaje algo más elevado que el que presentaron las madres (28,7%). Un 41,8% de los padres tenía estudios de grado medio, cifra algo superior al dato obtenido para las madres del estudio (36,7%). Por el contrario, los padres presentaron un porcentaje inferior en estudios superiores, llegando al 22,2% en comparación al de las madres (34,6%).

Nivel de estudios	n	%
Estudios de primarios	50	36,0
Formación profesional	34	24,5
Bachiller superior	24	17,3
Universitario grado medio	21	15,1
Universitario grado superior	10	7,1
Total	139	100,0

Para el análisis estadístico, estas categorías se recodificaron en tres grupos: estudios primarios, medios y superiores. Al igual que ocurría con las madres, un elevado porcentaje de los padres poseía una educación media o superior (64,0%).

Nivel de estudios	n	%
Estudios primarios	50	36,0
Estudios medios	58	41,8
Estudios universitarios	31	22,2
Total	139	100,0

II) Actividad laboral

Al igual que con las madres, para llevar a cabo la descripción de la actividad laboral de los padres, las actividades registradas en el cuestionario epidemiológico se agruparon teniendo en cuenta nivel de formación, afinidad del puesto y posibilidad de exposición a contaminantes ambientales durante el desarrollo de la misma.

Situación laboral	n	%
Trabajador	127	91,4
Parado	9	6,5
Estudiante	1	0,7
Baja laboral	2	1,4
Total	139	100,0

La mayoría de los encuestados eran padres que estaban trabajando en el momento de la entrevista (91,40%), aunque había un pequeño porcentaje de parados (6,5%), un estudiante y dos padres que se encontraban de baja laboral. Se consideraron finalmente cinco grupos de actividades laborales, según se detalla en la tabla siguiente.

Puesto de trabajo	n	%
Grupo 1: Programadores y analistas de aplicaciones informáticas, secretarios y auxiliares administrativos.	25	19,3
Grupo 2: Gerentes, directivos, profesores, diplomados, ingenieros técnicos y superiores.	12	9,2
Grupo 3: Técnicos, albañiles, pintores, carpinteros, ferrallistas, electricistas, mecánicos, peones, camareros, personal limpieza, ...	61	46,9
Grupo 4: Conductores y asimilados.	12	9,2
Grupo 5: Comercio y personal de orden público y seguridad.	20	15,4
Total	130	100,0

Las ocupaciones mayoritarias (46,9%) correspondieron a las incluidas en el grupo 3: camareros, personal de la construcción y servicios relacionados, y otras actividades que podrían entrañar riesgo de exposición a contaminantes ambientales (fotógrafo, enfermero, trabajadores de viveros, matarifes, etc.). El siguiente grupo de actividad en número de sujetos fue el grupo 1, con un 19,3%. El grupo 5, supuso un 15,4%, de los padres incluidos en el estudio.

4.1.1.2.3 Hábito tabáquico

Aproximadamente el 50% de los padres eran fumadores. En este grupo el 65,2% declararon que habían fumado durante el embarazo de su pareja, con una media de 14 cigarrillos/día ($\pm 8,37$), con un valor mínimo de 1 y un valor máximo de 40 cigarrillos.

¿Fuma o ha fumado a lo largo de su vida?	n	%
No	69	49,6
Si	70	50,4
Total	139	100,0

¿Ha fumado durante el embarazo de su mujer?	n	%
No	24	34,8
Si	45	64,3
NS/NC	1	0,9
Total	70	100,0

4.1.1.3 Características del niño

Se presentan a continuación algunas de las características del niño de interés para este estudio, recogidas en el momento del nacimiento, a partir de la historia médica. Para algunos de los niños no se pudo obtener esta información.

4.1.1.3.1 Variables antropométricas

I) Peso al nacer

El peso medio de los recién nacidos fue de 3.280 g, con un valor mínimo de 2.200 g y un máximo de 4.620 g.

	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
Peso al nacimiento (g)	114	2200	4620	3280,26	446,52

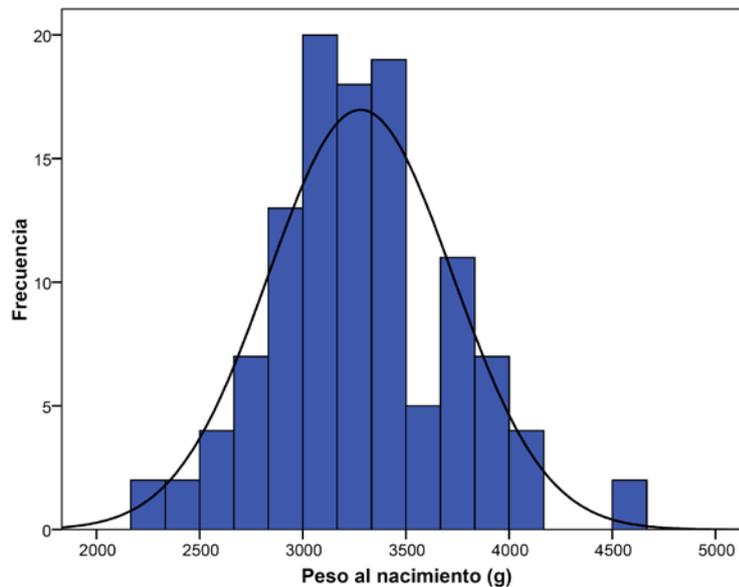
DE: Desviación estándar

Esta variable se categorizó en varios grupos, entre ellos los establecidos por la OMS como bajo peso (peso inferior a 2500 g) y peso normal (≥2500 g). Tan sólo 4 niños del estudio de Madrid nacieron con bajo peso.

Peso nacimiento (g)	n	%
< 2500	4	3,5
2500 – 2999	24	21,1
3000 – 4000	80	70,2
> 4000	6	5,3
Total	114	100,0

Peso niños	n	%
< 2500 g	4	3,5
≥ 2500 g	110	96,5
Total	114	100,0

El histograma siguiente muestra la distribución de valores para la variable “peso al nacer”. Como podemos observar la distribución para esta variable es cercana a la normalidad.



II) Longitud, perímetro abdominal y perímetro cefálico

En la siguiente tabla se describen los valores medios para la talla del niño, el perímetro cefálico y el abdominal, así como el rango de dichas medidas antropométricas.

	n	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE
Longitud (cm)	112	44,00	56,00	49,83	49,75	2,30
Perímetro cefálico (cm)	113	31,50	37,50	34,61	34,50	1,19
Perímetro torácico (cm)	63	27,00	35,00	31,89	32,00	1,84

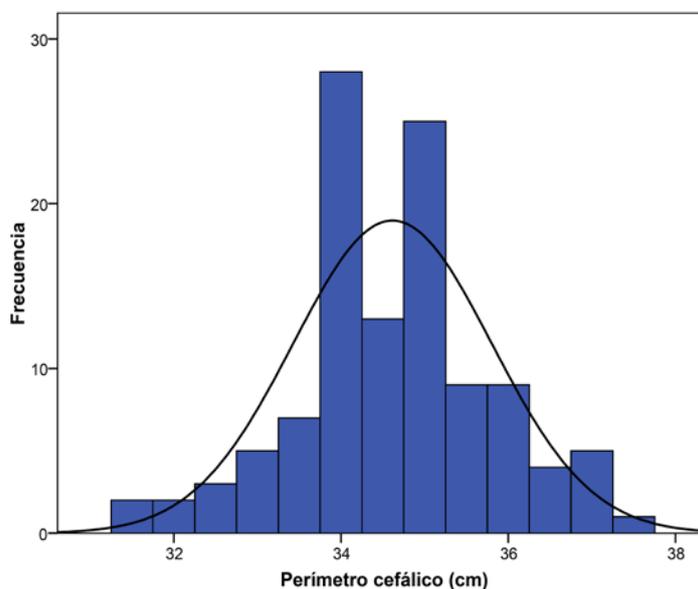
DE: Desviación estándar

Resultados

Para el análisis estadístico, el perímetro cefálico fue dividido en dos categorías (<35 y ≥ 35 cm), considerando 35 como el valor cercano al percentil 50, según los patrones de crecimiento infantil de la OMS. Se considera que un niño incluido dentro de los percentiles 3-97, posee un perímetro cefálico dentro de la normalidad.

Perímetro cefálico (cm)	n	%
< 35	60	53,1
≥ 35	53	46,9
Total	113	100,0

En la gráfica siguiente se muestra la distribución de valores para la variable perímetro cefálico, que como se puede observar sigue una distribución normal.



III) Índice Ponderal al nacer

El índice ponderal se calcula dividiendo el peso en gramos por cien, entre la longitud en cm elevada al cubo, con lo cual obtenemos una medida similar a la densidad g/cm^3 . La media del índice ponderal (IP) fue de $2,64 \pm 0,25 \text{ g/cm}^3$, con un valor mínimo de $2,11 \text{ g/cm}^3$ y máximo de $3,46 \text{ g/cm}^3$. Categorizando la

variable por el valor de la mediana nos encontramos que el mayor porcentaje, casi un 70% presenta un IP mayor o igual a 2,3 g/cm³.

Índice ponderal	n	%
≥ 2,3 g/cm ³	78	69,64
< 2,3 g/cm ³	34	30,36
Total	112	100,00

IV) Sexo de los recién nacidos

Entre los recién nacidos del estudio de Madrid, el número de varones superó al de niñas, con un porcentaje del 57,9% frente al 42,10% de niñas recién nacidas.

Sexo	n	%
Niños	66	57,9
Niñas	48	42,1
Total	114	100,0

4.2 ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO, MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN. ANÁLISIS UNIVARIADO MADRID.

La exposición al efecto combinado de compuestos químicos con actividad hormonal estrogénica se ha investigado en este trabajo mediante la cuantificación de la estrogenicidad de los extractos placentarios en el ensayo biológico E-Screen. Para ello se procedió al análisis de la actividad hormonal de las dos fracciones cromatográficas obtenidas, identificadas como alfa y beta y correspondientes a la elución cromatográfica de los xenoestrógenos organohalogenados (fracción alfa) y otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas (fracción beta). En ambos casos se estimó la

actividad correspondiente a la fracción completa (1:1) y diluida en medio experimental a un quinto (1:5) y un décimo (1:10), para la totalidad de las muestras.

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia de positividad, así como, la media aritmética, desviación estándar, mediana, valores mínimo y máximo de la carga estrogénica total efectiva de las fracciones alfa y beta, expresadas en Eeq pM/mL, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido.

4.2.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN ALFA

Cuando la fracción cromatográfica alfa fue testada mediante el ensayo E-Screen se obtuvo un valor medio de $1,97 \pm 3,64$ Eeq pM /g placenta (correspondiente a $112,34 \pm 236,26$ Eeq pM/g lípido).

TEXB-Fracción Alfa						
	Frecuencia (\geq LD)		Media	DE	Mediana	Máximo
	n	%				
	110	90,9				
Eeq pM/mL			3,45	6,43	1,30	40,00
Eeq pM/g plac			1,97	3,64	0,77	22,05
Eeq pM/g lipid			112,34	236,26	37,13	1.831,34

DE: Desviación estándar. LD: Limite de detección. TEXB: Carga estrogénica total efectiva. Los valores de eq uivalentes de es tradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Para los valores que no diferían del control se le asigno un valor igual a la mitad del LD (1 fmol).

4.2.2 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN BETA

En el ensayo E-Screen de la fracción beta, se obtuvo un valor medio de $6,56 \pm 18,99$ Eeq pM/g placenta (correspondiente a $333,26 \pm 924,12$ Eeq pM/g lípido).

TEXB-Fracción Beta						
	Frecuencia (\geq LD)		Media	DE	Mediana	Máximo
	n	%				
	110	90,9				
Eeq pM/mL			11,54	34,35	2,00	300,00
Eeq pM/g plac			6,56	18,99	1,14	159,78
Eeq pM/g lípido			333,26	924,12	58,34	7.756,23

DE: Desviación estándar. LD: Limite de detección. TEXB: Carga estrogénica total efectiva. Los valores de eq uivalentes de es tradiol fueron obt enidos al i nterpol ar los v alores de l a proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de e stradiol. Para los valores que no diferían del control se le asigno un valor igual a la mitad del LD (1 fmol).

4.2.3 CORRELACIÓN ENTRE LA TEXB DE LA FRACCIÓN ALFA Y BETA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO.

Se describen, a continuación, las correlaciones entre los valores de TEXB de las fracciones alfa y la beta, calculadas mediante el test de correlación de Spearman.

Los valores de la TEXB en la fracción alfa, expresados en Eeq pM/mL, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido, están asociados significativamente con los valores de TEXB en la fracción beta, expresados en las mismas unidades ($\rho=0,591$, $p<0,001$; $\rho=0,591$, $p<0,001$; $\rho=0,664$, $p<0,001$, respectivamente). En la tabla siguiente se exponen los resultados del análisis.

Fracción Alfa	Fracción Beta		
	Eeq pM/mL	Eeq pM/g plac	Eeq pM/g lipid
Eeq pM/mL	<0,001	<0,001	<0,001
Eeq pM/g plac	<0,001	<0,001	<0,001
Eeq pM/g lípid	<0,001	<0,001	<0,001

4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO DE GRANADA

4.3.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE GRANADA

Se presenta la información obtenida a partir de las preguntas recogidas en el cuestionario epidemiológico, que cumplimentaron las madres incluidas en el estudio, con o bjet o de i nvestig ar los posibles factores determinantes de la exposición a xenoestrogénos- disruptores endocrinos, cuantificados mediante el biomarcador de exposición TEXB en muestras de tejido placentario.

A continuación, se muestran las variables de interés, incluyendo el valor de la media, mediana, desviación estándar, máximo y mínimo, para las variables cuantitativas y el v alor de la frecuencia y por centaje, p ara l as variables cualitativas.

4.3.1.1 Características de la madre

4.3.1.1.1 Variables antropométricas

I) Edad

La edad media de las madres del estudio en el momento del parto fue de aproximadamente 32 años ($\pm 5,35$), c on u n m ínimo de 16 y u n m áximo de 46 años.

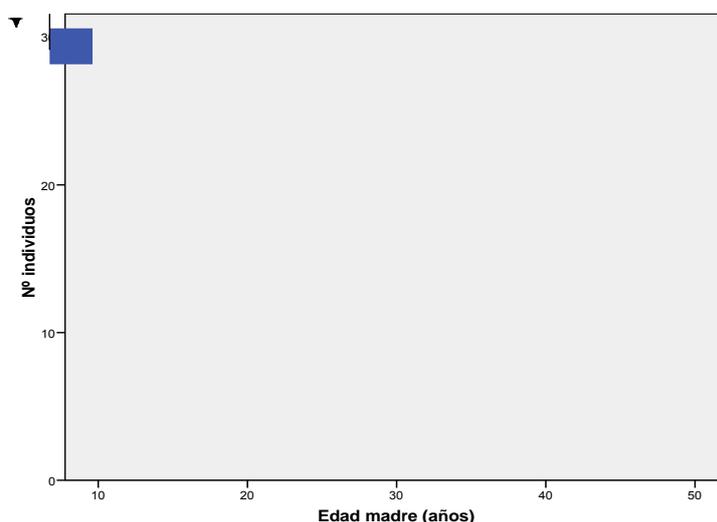
Edad (años)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	31,91 \pm 5,35	32,00		
< 20			5	1,62
20-26			35	11,36
27-30			71	23,05
31-35			117	37,99
> 35			80	25,98
Total			308	100

DE: Desviación estándar

La variable se recodificó para el análisis estadístico posterior en 2 categorías, utilizando el valor de la mediana como punto de corte.

Edad (años)	n	%
≤ 32	153	49,8
> 32	155	50,2
Total	308	100,0

La gráfica siguiente muestra el histograma correspondiente a la edad de las mujeres incluidas en el estudio. Como se puede observar, la distribución es normal.



II) Peso antes del embarazo

El valor medio del peso de las madres, justo antes del embarazo, fue de 61,63 Kg ($\pm 11,07$), con un valor mínimo de 40 Kg y un máximo de 112,50 Kg.

Peso (kg)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	61,63 \pm 11,07	60,00		
< 55			82	26,62
55-60			81	26,30
61-68			66	21,43
> 68			79	25,65
Total			308	100,00

DE: Desviación estándar

III) Peso y ganancia de peso al final del embarazo

El valor medio del peso de las madres después del embarazo fue de 75,00 Kg ($\pm 11,46$), con un rango de valores entre 52 y 120 Kg. Esto supone un incremento medio del peso durante el embarazo de 12,78 Kg, con un valor mínimo de -10 Kg y un valor máximo de 34 Kg.

Peso (kg)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	75,00 \pm 11,46	74,00		
< 67			90	29,22
67-74			81	26,30
75-82			75	24,35
\geq 83			62	20,13
Total			308	100,00

DE: Desviación estándar.

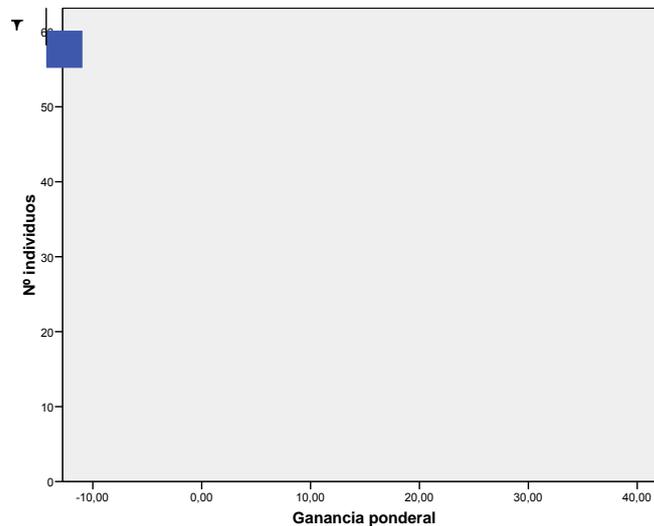
Ganancia peso (Kg)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	12,78 \pm 5,70	12,00		
\leq 7			32	10,40
>7-12			95	30,84
>12-20			153	49,68
>20			20	9,08
Total			308	100,00

DE: Desviación estándar

Esta variable se recodificó en dos categorías para el análisis estadístico posterior, utilizando como punto de corte el valor de la mediana (12 Kg).

Ganancia peso	n	%
\leq 12 Kg	157	50,97
> 12 Kg	151	49,03
Total	308	100,00

La gráfica siguiente muestra el histograma correspondiente a la ganancia de peso de las 308 mujeres incluidas en el estudio. Como podemos observar, esta variable siguió una distribución normal.



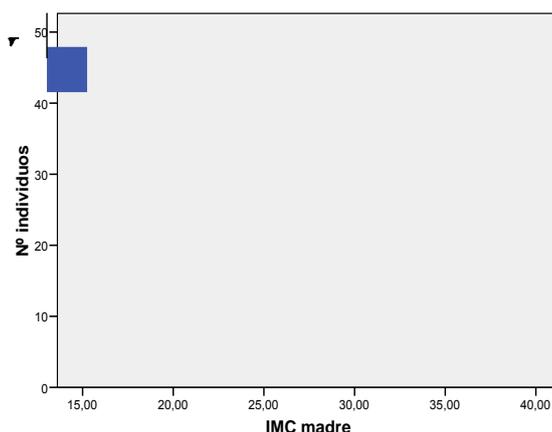
IV) Índice de Masa Corporal (IMC)

La media obtenida del IMC entre las madres participantes en Granada es de $23,49 \pm 4,13 \text{ Kg/m}^2$, lo que corresponde a valores de IMC que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se consideran en el rango de la normalidad.

	Media \pm DE	Mediana	n	%
IMC (kg/m²)	23,49 \pm 4,13	22,59	308	100,0

DE: Desviación estándar.

La siguiente gráfica muestra la distribución de dicha variable mediante un histograma. Como se puede observar sigue una distribución normal.



En la siguiente tabla se presenta la distribución de madres según su IMC tomando como referencia los rangos establecidos por la OMS. Como podemos observar, aproximadamente el 63% de las madres del estudio de Granada se engloban en el rango correspondiente a peso normal. El 22,29% de las madres presentaban sobrepeso y un 6,91% obesidad.

IMC según la OMS (Kg/m²)	n	%
Bajo peso ($\leq 18,99$)	24	7,90
Normal (19-24,99)	194	62,90
Sobrepeso (25-29,99)	69	22,29
Obesidad, Clase I (30-34,99)	15	4,90
Obesidad, Clase II (35-35,99)	6	2,01
Total	308	100

4.3.1.1.2 Variables sociodemográficas

I) Estado civil

La mayor parte de las mujeres del estudio de Granada estaban casadas (91,5%), o convivían con pareja.

Estado civil	n	%
Casada	282	91,55
Convive con pareja	25	8,12
Soltera	1	0,33
Total	308	100,00

II) Lugar de residencia

Algo más de la mitad de la población del estudio de Granada (58,4%) vivía en áreas consideradas como urbanas.

Tipo de municipio	n	%
Rural (<10.000 hab.)	128	41,56
Urbana (≥10.000 hab.)	180	58,44
Total	308	100,00

III) Nivel de estudios

La mayoría de las madres reclutadas poseían estudios primarios, tan solo el 3,9% admitió no tener estudios y un 17,6% declaró tener estudios universitarios.

Nivel de estudios	n	%
Sin estudios	12	3,9
Primarios	153	49,5
Medios	53	17,3
Formación profesional	36	11,7
Diplomatura	41	13,4
Licenciatura	13	4,2
Total	308	100,0

Para el análisis estadístico, estas categorías se recodificaron en tres grupos: Sin estudios o estudios primarios, medios y superiores.

Nivel de estudios	n	%
Sin estudios/ primarios	165	53,4
Medios	89	29,0
Superiores	54	17,6
Total	308	100,0

IV) Actividad laboral durante el embarazo

La mayoría de las madres reclutadas se dedicaban a las tareas domésticas (38,3%) o a tareas de tipo administrativo (22,7%). En la categoría de profesional liberal se han incluido las siguientes profesiones declaradas: traductora, profesora, abogada, guía, carrera de música y economista.

Actividad laboral	n	%
Administración	70	22,7
Agricultura	15	4,9
Autónoma	4	1,3
Hogar	118	38,4
Hostelería	23	7,5
Limpieza	26	8,4
Peluquería	10	3,2
Sanitaria	17	5,5
Profesional Liberal	25	8,1
Total	308	100,0

Tan solo el 4,9% de las madres participantes en el estudio se dedicaban a las actividades del campo.

Actividad laboral	n	%
Hogar	118	38,3
Agricultura	15	4,9
Otras	175	56,8
Total	308	100,0

V) Percepción de exposición a productos químicos

La mayoría de las madres del estudio de Granada (88,3%) no tenían percepción de haber estado expuestas a ningún tipo de compuesto químico, solamente un 11,7% declaró estar expuesta a productos químicos tales como pesticidas, desinfectantes, productos de limpieza, productos fitosanitarios y productos usados en la peluquería.

Percepción de exposición a productos químicos	n	%
Sí	36	11,7
No	272	88,3
Total	308	100,0

4.3.1.1.3 Características reproductivas de la madre

I) Paridad

En el estudio de Granada, las mujeres que habían estado embarazadas con anterioridad superaron a las que los hacían por primera vez. Dentro de las madres multíparas, un 73,50% habían estado ya embarazadas una vez con anterioridad.

Paridad	n	%
Primípara	142	46,1
Multípara	166	53,9
Total	308	100,0

Embarazos previos	n	%
1	122	73,50
2	32	19,27
3	7	4,22
> 3	5	3,01
Total	166	100,0

II) Métodos anticonceptivos

En la población del estudio de Granada, el 47,1% de las madres declaró haber usado algún método anticonceptivo.

Uso de anticonceptivos	n	%
Sí	145	47,1
No	163	52,9
Total	308	100,0

III) Tratamiento por problemas de fertilidad

Sólo el 1,6 % de las mujeres del estudio en Granada, se había sometido a tratamiento por problemas de fertilidad.

Tratamiento de infertilidad	n	%
Sí	5	1,6
No	303	98,4
Total	308	100

4.3.1.1.4 Antecedentes clínicos

I) Problemas durante el embarazo

El 62% de las madres manifestó algún problema durante el embarazo, siendo las incidencias más frecuentes las náuseas (51,9%) y los vómitos (48,4%) como muestran las siguientes tablas.

Problemas durante el embarazo	n	%
Sí	191	62,0
No	117	38,0
Total	308	100,0

Tipo de problema	n	%
Pérdida líquido amniótico	19	6,2
Náuseas	160	51,9
Vómitos	149	48,4
Hemorragia vaginal	43	14,0
Total	191	100,0

II) Consumo de fármacos y suplementos dietéticos

La mayor parte de las mujeres reclutadas no tomó ninguna medicación mientras intentaba quedarse embarazada. Sin embargo, aproximadamente el 42% de las mujeres encuestadas afirmó haber tomado alguna medicación durante la gestación.

Consumo de fármacos antes del embarazo	n	%
Sí	19	6,2
No	289	93,8
Total	308	100,0

Consumo de fármacos durante el embarazo	n	%
Sí	131	42,5
No	177	57,5
Total	308	100,0

A las madres se les preguntaba, además, en la encuesta epidemiológica si habían tomado durante el embarazo, ácido fólico, hierro, calcio u otro tipo de suplemento en la dieta. La mayor parte de las mujeres del estudio (84,4%) afirmaron que tomaron algún tipo de preparado vitamínico. Los suplementos dietéticos que más frecuentemente utilizaron fueron el ácido fólico (45,8%) y el hierro (38,8%), observando que fueron varios los suplementos que las madres tomaron al mismo tiempo.

Consumo de suplementos dietéticos	n	%
Sí	260	84,4
No	48	15,6
Total	308	100,0

Tipo de suplemento	n	%
Ácido Fólico	199	45,8
Hierro	169	38,8
Calcio	54	12,4
Otros preparados vitamínicos	13	3,0
Total	435	100,0

4.3.1.1.5 Hábitos de consumo de alcohol y tabaco durante el embarazo.

I) Consumo de alcohol

El cuestionario pasado a las mujeres de Granada solo permite clasificar a las mujeres según el consumo o no de alcohol de manera regular, sin especificar tipo de bebida ni frecuencia de hábito. Cabe destacar que 2 mujeres del estudio declararon haber bebido alcohol en exceso durante el embarazo.

Consumo de alcohol	n	%
Sí	2	0,7
No	306	99,3
Total	308	100,0

II) Consumo y exposición al tabaco

El 27,6% de las mujeres reclutadas del estudio de Granada fumaron durante el embarazo y un 59,7% reconocieron haber estado expuestas de forma pasiva al humo del tabaco, como se muestra en las tablas siguientes. A diferencia del estudio de Madrid, la información del cuestionario no permite cuantificar, en el estudio de Granada, si la exposición pasiva al tabaco era “escasa”, o “alta”, como se describió anteriormente para el estudio de Madrid.

Ha fumado durante el embarazo?	n	%
Sí	85	27,6
No	223	72,4
Total	308	100,0

Exposición pasiva al humo del tabaco	n	%
Sí	172	59,7
No	136	40,3
Total	308	100,0

4.3.1.1.6 Exposición por empastes dentales

I) Empastes dentales

El 7,5% de las mujeres del estudio de Granada se sometieron a la realización de un empaste dental blanco, durante el periodo del embarazo, aunque en el estudio de Granada no se dispone de información sobre el número de empastes realizados.

Empastes dentales blancos	n	%
Sí	23	7,5
No	285	92,5
Total	308	100

4.3.1.2 Características del padre

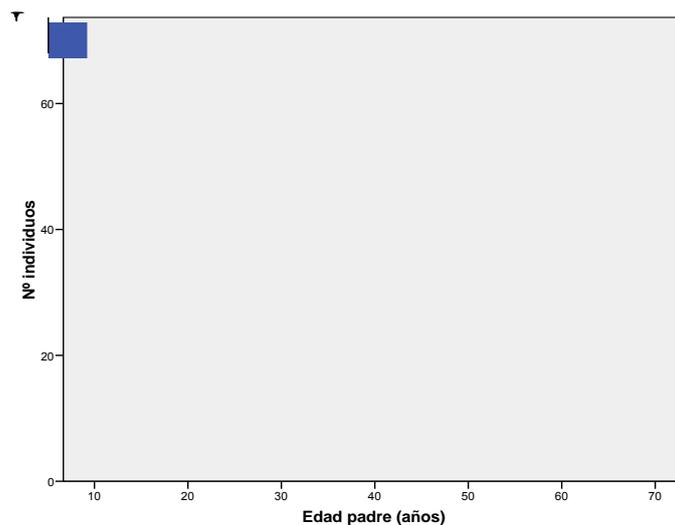
4.3.1.2.1 Edad

La edad media de los padres incluidos en el estudio fue de 34 años y 7 meses ($\pm 5,86$), con un valor mínimo de 19 y un máximo de 62 años.

Edad (años)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	34,60 \pm 5,86	35,00		
<25			13	4,23
25-29			41	13,35
30-35			149	48,55
36-40			61	19,87
41-45			34	11,07
>45			9	2,93
Total			307	100,00

DE: Desviación estándar

En la siguiente gráfica se representa el histograma de esta variable, apreciándose que su distribución es normal.



4.3.1.2.2 Características sociodemográficas

I) Nivel de estudios

Más de la mitad de los padres tenían estudios primarios (52,44%), un 7,17% afirmó que no tenía estudios, y un 17,92% de los padres poseía estudios superiores (licenciatura o diplomatura). Esta variable se recodificó en 3 categorías (Sin estudios-primarios/ medios/superiores).

Nivel de estudios	n	%
Sin estudios	22	7,17
Primarios	161	52,44
Medios	19	6,19
Formación profesional	50	16,28
Diplomatura	16	5,22
Licenciatura	39	12,7
Total	307	100

Nivel de estudios	n	%
Sin estudios / primarios	183	59,61
Medios	69	22,47
Superiores	55	17,92
Total	307	100,00

II) Actividad laboral

Las ocupaciones más habituales de los padres del estudio de Granada fueron la construcción (21,50%), el trabajo de tipo administrativo (16,94%) y la hostelería (12,38%).

Actividad laboral actual	n	%
Construcción	66	21,50
Limpieza	1	0,33
Campo	22	7,17

Resultados

Administrativo	52	16,94
Hostelería	38	12,38
Sanitario	8	2,61
Profesión Liberal	27	8,79
Autónomo	10	3,26
Mecánico, conductor	22	7,17
Pintor	21	6,84
Metalurgia	16	5,21
Otros	24	7,8
Total	307	100

En la categoría de profesional “liberal” se han incluido las siguientes profesiones declaradas: traductor, profesor, abogado, guía, músico y economista. En la categoría de “otros” se han incluido las siguientes profesiones: portero, pensionista, supermercado, trabajo temporal, carnicero y panadero.

Dentro de la variable “trabajo manual”, han sido incluidos trabajos tales como: carpintero, mecánico, albañil, pintor y carnicero, entre otras. Y dentro del grupo “ otros”, se han incluido trabajos tales como: administrativo, sanitario, abogado, autónomos etc. Como muestra la siguiente tabla, la mayoría de los padres del estudio de Granada (92,9%) tenía una actividad laboral diferente a la agricultura, hecho que se observó también en las madres del estudio.

Actividad laboral actual	N	%
Agricultura	22	7,1
Trabajo manual	127	41,2
Otros	158	51,7
Total	307	100

4.3.1.3 Características del niño

Se presentan a continuación las variables de interés para el estudio de Granada, con el condicionante de que para algunas variables, el número de datos recopilados fue menor de 308, debido a algunas de información en las historias clínicas revisadas.

4.3.1.3.1 Variables antropométricas

I) Peso al nacer

El peso medio de los niños recién nacidos se situó en torno a los 3306 g, con un valor mínimo de 2000 g y un máximo de 4590 g.

Peso del niño	Media \pm DE	Mediana	n	%
	3306,46 \pm 452,06	3300,00		
< 2500 g			12	4,11
2500-3000 g			60	20,50
> 3000-4000 g			205	70,21
> 4000 g			15	5,18
Total			292	100,00

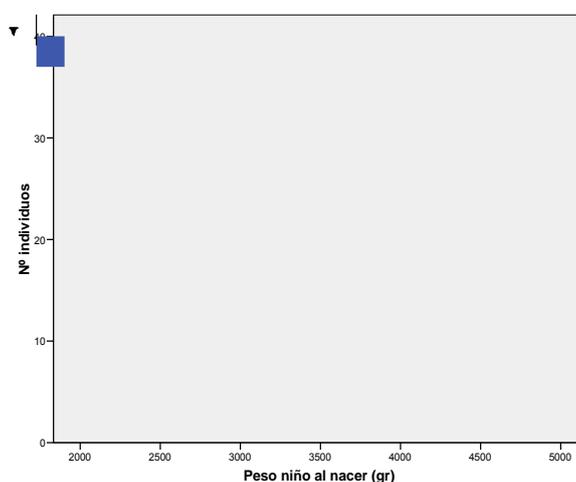
DE: Desviación estándar

A su vez, esta variable se categorizó en bajo peso (< 2500 g) y peso normal (\geq 2500 g), y como podemos observar en la siguiente tabla, 12 niños del estudio nacieron con un peso inferior a 2500 g.

Peso del niño	n	%
< 2500 g	12	4,11
\geq 2500 g	280	95,89
Total	292	100

Resultados

El siguiente histograma muestra una distribución normal para los valores de la variable, peso al nacer.



II) Longitud, perímetro torácico y perímetro cefálico

A continuación se muestran los valores medios para la talla de los niños, perímetro cefálico y torácico, así como el rango de estas medidas antropométricas.

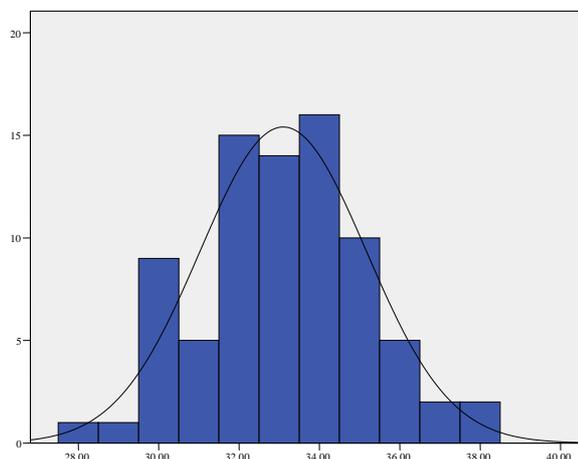
	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Longitud (cm)	50,77	2,88	50,50	40,00	63,00
Perímetro cefálico (cm)	34,80	1,29	35,00	32,00	38,00
Perímetro torácico (cm)	33,18	2,06	33,00	28,00	38,00

DE: Desviación estándar

Para el análisis estadístico, el perímetro cefálico fue dividido en dos categorías (<35 ó ≥ 35 cm) según el valor de la mediana. Este valor está situado en las curvas patrón de crecimiento infantil de la OMS, próximo al percentil 50.

Perímetro cefálico (cm)	n	%
< 35	40	37
≥ 35	68	63
Total	108	100

En la siguiente gráfica se muestra la distribución de valores mediante un histograma para la variable perímetro cefálico, que como se puede observar sigue una distribución normal.



III) Índice Ponderal al nacer

La media del índice ponderal (IP) en el momento del parto, para los niños del estudio de Granada, fue de $2,57 \pm 0,43 \text{ g/cm}^3$, con un valor mínimo de $1,20 \text{ g/cm}^3$ y un valor máximo de $5,50 \text{ g/cm}^3$.

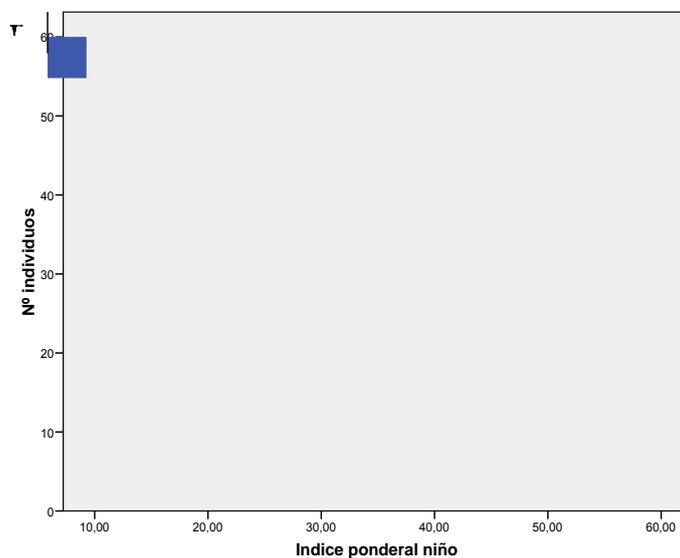
	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Índice ponderal (g/cm^3)	2,57	0,43	2,55	1,20	5,50

DE: Desviación estándar

Para el análisis estadístico, el IP fue dividido en dos categorías utilizando el valor de la mediana como punto de corte ($< 2,5 \text{ g/cm}^3$ y $\geq 2,5 \text{ g/cm}^3$).

Índice ponderal (g/cm^3)	n	%
< 2,5	54	43,2
$\geq 2,5$	71	56,8
Total	125	100,0

El histograma siguiente muestra la distribución de valores para la variable índice ponderal y se aprecia que sigue una distribución normal.



IV) Edad gestacional

La mayoría de los niños en el estudio de Granada (95,4%) nacieron con una edad gestacional por encima de 37 semanas, con un rango comprendido entre 37 y 42 semanas de gestación. Solo se pudo localizar esta información para 281 recién nacidos.

Edad gestacional	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Semanas	39,38	1,49	40	31	42

DE: Desviación estándar

Para el análisis bivariado, esta variable se codificó en tres categorías (32-37 semanas; > 37-39 semanas; y > 39 semanas), y para el multivariado se recodificó en dos categorías, < 37 y ≥ 37 semanas, criterio establecido por la OMS, para considerar un recién nacido prematuro.

Edad gestacional (semanas)	n	%
32- 37	13	4,6
>37-39	112	39,9
> 39	156	55,5
Total	281	100,0

V) Tipo de parto

El 72,5% (n=208) de los niños nacieron mediante parto espontáneo y un 15,7% (n=45) necesitó asistencia instrumental. El porcentaje de cesáreas recogido en el estudio de Granada (11,8%) no superó el límite del 15%, valor aconsejado por la Organización Mundial de la Salud.

Terminación del parto	n	%
Espontáneo	208	72,5
Cesárea	34	11,8
Instrumental	45	15,7
Total	287	100,0

VI) Sexo del recién nacido

Todos los recién nacidos del estudio de Granada eran varones, ya que se trataba de establecer la prevalencia de criptorquidia e hipospadias al nacimiento.

4.4 ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO, DE GRANADA, MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN. ANÁLISIS UNIVARIADO

La exposición al efecto combinado de compuestos químicos con actividad hormonal estrogénica se ha investigado en este trabajo mediante la cuantificación de la estrogénicidad de los extractos placentarios en el ensayo biológico E-Screen. Para ello se procedió al análisis de la actividad hormonal de las dos fracciones cromatográficas obtenidas, identificadas como alfa y beta y

correspondientes a la elución cromatográfica de los xenoestrógenos organohalogenados (fracción alfa) y otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas (fracción beta). En ambos casos se estimó la actividad correspondiente a la fracción completa (1:1) y diluida en medio experimental a un quinto (1:5) y un décimo (1:10), para la totalidad de las muestras.

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia de positividad, así como, la media aritmética, desviación estándar, mediana, valores mínimo y máximo de la carga estrogénica total efectiva de las fracciones alfa y beta, expresadas en Eeq pM/mL, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido.

4.4.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN ALFA

El 71,4% de la fracción alfa perteneciente a los extractos de placenta que se analizaron mediante el ensayo E-Screen fueron estrogénicos, presentando un valor medio de 3,84±9,73 Eeq pM/g placenta (correspondiente a 177,07±398,60 Eeq pM/g lípido).

TEXB-Fracción Alfa						
	Frecuencia (≥ LD)		Media	DE	Mediana	Máximo
	n	%				
	220	71,4				
Eeq pM/mL			6,18	13,41	0,80	91,63
Eeq pM/g plac			3,84	9,73	0,47	111,50
Eeq pM/g lípid			177,07	398,60	17,73	3041,69

DE:

Desviación estándar. LD: Limite de detección. TEXB: Carga estrogénica total efectiva. Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Para los valores que no diferían del control se le asigno un valor igual a la mitad del LD (1 fmol).

Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de la media y mediana están expresados en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta y Eeq pM/g lípido.

4.4.2 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN LA FRACCIÓN BETA

En el caso de la fracción beta, un 84,7% de los extractos de placenta presentaban estrogenicidad medible mediante el ensayo E-Screen, con un valor medio de 22,82±64,48 Eeq pM/g placenta (correspondiente a 1190,97±2603,31 Eeq pM/g lípido).

TEXB-Fracción Beta						
	Frecuencia (\geq LD)		Media	DE	Mediana	Máximo
	n	%				
	260	84,7				
Eeq pM/mL			35,56	70,43	5,08	353,30
Eeq pM/g plac			22,82	64,48	3,02	912,41
Eeq pM/g lipid			1190,97	2603,31	107,38	17588,62

DE: Desviación estándar. LD: Limite de detección. TEXB: Carga estrogénica total efectiva. Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Para los valores que no diferían del control se le asignó un valor igual a la mitad del LD (1 fmol).

Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de la media y mediana están expresados en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta y Eeq pM/g lípido.

4.4.3 CORRELACION ENTRE LA TEXB DE LA FRACCIÓN ALFA Y BETA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO.

Se describen, a continuación, las correlaciones entre los valores de TEXB de las fracciones alfa y la beta, calculadas mediante el test de Spearman. En la tabla siguiente se exponen los resultados del análisis.

Fracción Alfa	Fracción Beta		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac	Eeq(pM)/g lipid
Eeq(pM)/mL	<0,001	<0,001	<0,001
Eeq(pM)/g plac	<0,001	<0,001	<0,001
Eeq(pM)/g lípido	<0,001	<0,001	<0,001

Los valores de la TEXB en la fracción alfa, expresados en Eeq (pM)/mL, Eeq (pM)/g placenta y Eeq (pM)/g lípido, fueron asociados significativamente con los valores de TEXB en la fracción beta expresados en las mismas unidades ($\rho=0,328$, $p<0,001$; $\rho=0,340$, $p<0,001$; $\rho=0,325$, $p<0,001$, respectivamente).

4.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO, MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN EN AMBAS POBLACIONES.

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia y la carga estrógenica total efectiva (TEXB) en las 428 muestras de tejido placentario disponibles, de los recién nacidos participantes, recogiendo la frecuencia de positividad, así como, la media aritmética, media geométrica y su correspondiente desviación estándar, mediana y rango, de las fracciones alfa y beta, expresadas en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta y Eeq pM/g lípido.

TEXB	Fracción alfa \geq LD		Fracción beta \geq LD	
	n	%	n	%
Granada	220/307	71,3	260/307	84,7
Madrid	110/121	90,9	110/121	90,9
Total	330/428	81,1	370/428	87,8

LD: Limite de detección. TEXB: Carga estrogénica total efectiva. Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Para los valores que no diferían del control se le asignó un valor igual a la mitad del LD (1 fmol).

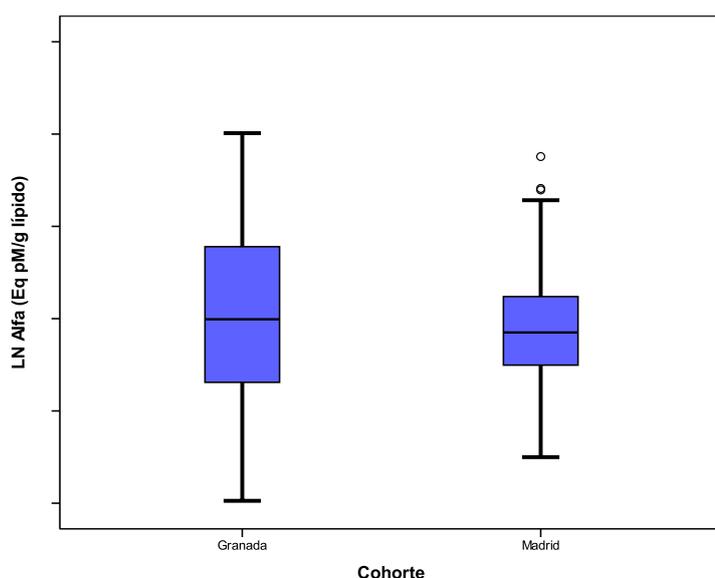
Cuando comparamos los porcentajes de positividad (TEXB \geq LD) para la fracción alfa y para la fracción beta, analizados en las poblaciones incluidas, utilizando el test de Pearson χ^2 , encontramos diferencias estadísticamente significativas para TEXB de la fracción alfa ($p < 0,001$), y para TEXB de la fracción beta ($p = 0,091$).

Fracción Alfa	Eeq pM/g placenta				
	Media	GM	GSD	Mediana	Rango
Granada	6,05	1,39	6,06	1,34	111,43
Madrid	2,17	1,01	3,14	0,97	21,98
Total	4,70	1,24	4,99	1,13	111,43

GM: Media Geométrica; GSD: Desviación Estándar Geométrica

Fracción Alfa	Eeq pM/g lípido				
	Media	GM	GSD	Mediana	Rango
Granada	257,48	58,60	6,49	53,85	3040,64
Madrid	123,30	47,08	3,66	40,47	1828,63
Total	210,92	54,31	5,45	48,25	3040,64

GM: Media Geométrica; GSD: Desviación Estándar Geométrica



Cuando comparamos los valores de TEXB de la fracción alfa analizados en las poblaciones incluidas, utilizando el test de Mann-Whitney, no encontramos

Resultados

diferencias estadísticamente significativas, ni al expresar la carga total en Eeq (pM)/g placenta ($p=0,192$), ni para los valores de TEXB expresados en Eeq (pM)/g lípido ($p= 0,359$).

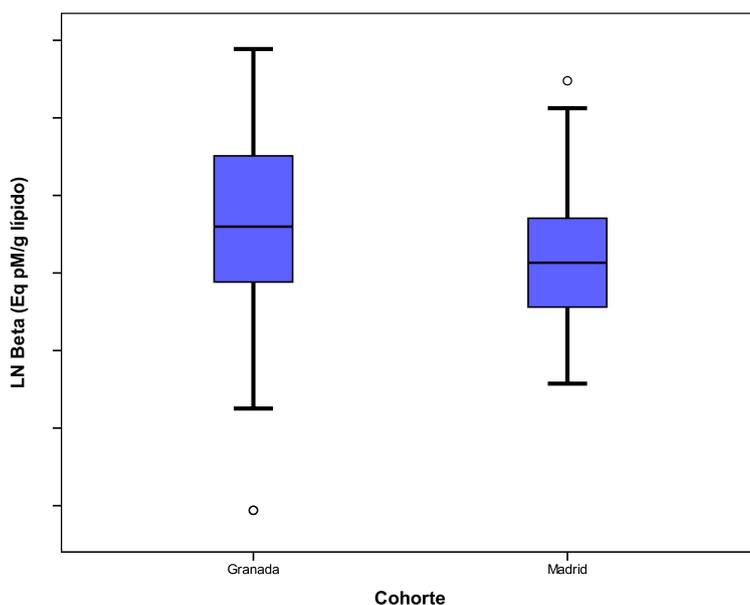
Fracción Beta	Eeq pM/g placenta				
	Media	GM	GSD	Mediana	Rango
Granada	7,22	4,53	7,46	1,21	159,64
Madrid	24,55	1,86	4,28	4,12	912,35
Total	19,18	3,44	6,68	2,77	912,35

GM: Media Geométrica; GSD: Desviación Estándar Geométrica

Fracción Beta	Eeq pM/g lípido				
	Media	GM	GSD	Mediana	Rango
Granada	1309,75	203,46	9,12	180,39	-
Madrid	366,28	85,48	5,02	71,12	-
Total	1017,41	155,52	8,02	123,18	-

GM: Media Geométrica; GSD: Desviación Estándar Geométrica

Cuando comparamos los valores de TEXB para la fracción beta, analizados en las poblaciones incluidas, utilizando el test de Mann-Whitney, encontramos diferencias estadísticamente significativas: $p < 0,001$ para los valores de TEXB expresados en Eeq pM/g placenta y $p < 0,001$ para los valores de TEXB expresados en Eeq pM/g lípido.



4.6 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS BIVARIADO POBLACION MADRID

4.6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

4.6.1.1 Relación entre la edad de la madre y TEXTB de la fracción alfa y beta

Se ha estudiado la relación existente entre la carga estrogénica total efectiva (TEXTB), de las fracciones alfa y beta de las muestras de tejido placentario, y la variable edad de las madres ya que, la edad está considerada como uno de los mayores determinantes de la concentración de xenobióticos bioacumulados en los tejidos corporales.

Mediante el test de correlación de Spearman, se relacionó la variable continua edad de la madre, con los valores de TEXTB de la fracción alfa y beta. Según este test, los niveles de carga estrogénica total efectiva (TEXTB) de la fracción alfa y de la beta no estaban significativamente relacionados con la edad de las madres, como muestra la siguiente tabla.

Resultados

TEXB	Edad de la madre			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	0,019	0,842	0,008	0,928
Fracción Beta	-0,039	0,677	-0,045	0,629

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n= 118

También se realizó la tabla de contingencia para comparar la edad de la madre y la carga estrogénica, comprobándose que no existe una asociación estadísticamente significativa entre presencia de TEXB (valor por encima del LD) o no presencia (valor por debajo del LD) de la fracción alfa o beta, y la edad de la madre. Se consideraron como muestras con valor por encima del LD, aquellas con un valor igual o superior a 10^{-13} Eeq pM/g placenta.

TEXB	\geq LD	Edad madre		χ^2	p
		≤ 31 años	> 31 años		
Alfa	Sí	66	41	0,214	0,644
	No	6	5		
Beta	Sí	66	41	0,214	0,644
	No	6	5		

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n=118. LD: Límite Detección

Cuando estudiamos si existen diferencias significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en las fracciones alfa y beta de madres con edad >31 años, con respecto a las que tienen una edad ≤ 31 años, no aparecen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las fracciones estudiadas. Se observa que, los valores medios de TEXB de la fracción alfa son mayores en aquellos tejidos placentarios de madres con mayor edad y si embargo los mayores valores en la fracción beta corresponden a mujeres con menor edad (Test de Mann-Whitney).

TEXB	U	Edad madre		p
		Medias (\pm DE)		
		≤ 31 años	> 31 años	
Alfa: Eeq pM/g plac.	1474,00	1,87 (3,75)	2,18 (3,59)	0,315
Eeq pM /g lípido	1501,00	107,32 (253,61)	124,30 (216,47)	0,392
Beta: Eeq pM/g plac.	1544,00	7,27 (21,75)	5,80 (14,53)	0,537
Eeq pM /g lípido	1552,00	345,74 (1005,31)	330,79 (823,10)	0,566

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. DE: Desviación estándar

Relación entre la edad de la madre y otras variables de la encuesta

Según el t test de Spearman, existía una relación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el número hijos, con mayor número de embarazos asociados con madres de mayor edad. Sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa al relacionar edad de la madre con las variables: semana de gestación, peso al nacimiento, PC (Perímetro Cefálico), IP (Índice Ponderal), Índice de Masa corporal (IMC) e Incremento de peso, como podemos observar en la siguiente tabla.

Variables	Edad de la madre	
	ρ	p
Características Madre		
Número hijos	0,284	0,002
IMC	0,132	0,155
Ganancia peso	-0,095	0,307
Características niño		
Perímetro cefálico	0,031	0,757
Semana gestación	-0,013	0,898
Peso niño	-0,050	0,611
Índice ponderal	-0,008	0,936

4.6.1.2 Relación entre el índice de masa corporal de la madre y TEXB de la fracción alfa y beta

Se estudió el índice de masa corporal (IMC), justo antes del embarazo, ya que podría ser una medida de la bioacumulación de xenoestrógenos en tejido placentario, la movilización de compuestos xenobióticos de los reservorios de grasa y la transferencia de los mismos a través de la placenta al niño. Se utilizó el test de correlación de Spearman para determinar la relación del IMC con los niveles de TEXB de la fracción alfa y beta. Encontramos una asociación negativa, estadísticamente significativa, entre los niveles de carga estrogénica total efectiva (TEXB) de la fracción alfa y el IMC de la madre.

TEXB	IMC de la madre			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	p	ρ	p
Fracción Alfa	-0,216	0,019	-0,149	0,107
Fracción Beta	-0,096	0,299	-0,041	0,667

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n=118

Sin embargo mediante tablas de contingencia, no se encontró asociación estadística significativa entre la presencia o ausencia de estrogénicidad de las fracciones alfa y beta y el IMC, utilizando como punto de corte el valor considerado por la OMS como sobrepeso. El 90,36% de las mujeres de este estudio que poseían un IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$, tenían estrogénicidad en la fracción alfa de su tejido placentario y el 91,56% tenían valores medibles de estrogénicidad en la fracción beta.

TEXB	≥ LD	IMC		χ ²	p
		< 25 Kg/m ²	≥ 25 Kg/m ²		
Alfa	Sí	75	32	0,330	0,855
	No	8	3		
Beta	Sí	76	31	0,261	0,609
	No	7	4		

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n=83 (< 25Kg/m²) y n=35 (≥ 25 Kg/m²).
LD: Limite de detección

Se aplicó también, el test de Mann-Whitney, para estudiar la relación entre los valores de estrogénicidad y el IMC, considerando como punto de corte la categoría a partir de la cual la OMS considera IMC con sobrepeso. Se encontró que existía una asociación estadísticamente significativa entre los valores de estrogénicidad encontrados en la fracción alfa de madres con IMC < 25 Kg/m², con respecto a las que tenían un IMC ≥ 25 Kg/m², siendo los valores medios de TEXB en dicha fracción mayores en madres con IMC < 25 Kg/m². Aunque no se encontró asociación significativa para la fracción beta, se puede observar en este caso que los valores medios son mayores en las madres con IMC por encima de 25 Kg/m².

TEXB	U	IMC		p
		< 25 (Kg/m ²)	≥ 25 (Kg/m ²)	
Alfa:				
Eeq pM/g placenta	1101,00	2,14(3,45)	1,64 (4,22)	0,038
Eeq pM/g lípido	1230,50	129,98 (268,78)	75,90 (142,18)	0,190
Beta:				
Eeq pM/g placenta	1276,50	5,58 (12,13)	9,36 (30,07)	0,298
Eeq pM/g lípido	1361,00	319,10 (704,91)	398,28 (1343,65)	0,590

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. IMC < 25Kg/m² n=83; IMC ≥ 25 Kg/m² n=35
DE: Desviación estándar

Relación entre el índice de masa corporal de la madre y otras variables de la encuesta.

Según el test de correlación de Spearman, existía una asociación estadísticamente significativa entre el IMC justo antes de quedarse embarazada y el incremento de peso. Sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa al relacionar el IMC de la madre con las variables: PC (perímetro cefálico), peso al nacimiento, IP (Índice Ponderal), semana de gestación y número de hijos, como podemos observar en la siguiente tabla.

Variables	IMC antes del embarazo	
	ρ	p
Características niño		
Perímetro cefálico	0,045	0,649
Peso niño	0,101	0,303
Índice ponderal	0,109	0,273
Semanas de gestación	0,061	0,542
Características madre		
Ganancia peso	0,253	0,006
Número de hijos	0,015	0,868
Edad	0,132	0,115

4.6.1.3 Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y TEXB de la fracción alfa y beta

Se ha considerado la variable ganancia de peso durante el embarazo ya que podría condicionar la movilización de contaminantes disruptores endocrinos, almacenados en los reservorios de grasa durante la vida de las madres, que podrían estar disponibles para el feto durante el embarazo. Cuando se utilizó el test de correlación de Spearman, no encontramos asociación estadísticamente significativa entre los niveles de TEXB de las fracciones alfa y beta y el incremento de peso.

TEXB	Ganancia de peso			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	0,129	0,164	0,057	0,540
Fracción Beta	0.050	0,593	-0,002	0,980

TEXB: Carga estrogénica Total efectiva, n= 117

Según muestra la tabla de contingencia, cuando la variable ganancia de peso se categorizó ($\leq 10\text{Kg}$ vs. $>10\text{ Kg}$), no se encontró tampoco ninguna asociación estadísticamente con la carga estrogénica de las fracciones alfa o beta, en función de si ganaron peso por encima o debajo de ese rango.

TEXB	$\geq \text{LD}$	Ganancia de peso		χ^2	P
		$\leq 10\text{Kg}$	$> 10\text{ Kg}$		
Alfa	Sí	46	60	0,017	0,896
	No	5	6		
Beta	Sí	46	60	0,017	0,896
	No	5	6		

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n=117. LD: Limite Detección

Sin embargo, al relacionar la ganancia de peso con la carga estrogénica mediante el test de Mann-Whitney, encontramos diferencias cercanas a la significación estadística entre la ganancia de peso y la carga estrogénica de la fracción alfa (Eeq $\mu\text{M/g plac}$), para aquellas madres con incrementos de peso $> 10\text{ Kg}$.

TEXB	U	Ganancia de peso		p
		Medias (\pm DE)		
		$\leq 10\text{Kg}$	$> 10\text{ Kg}$	
Alfa: Eeq pM/g plac.	1383,00	1,54 (3,09)	1,86 (4,09)	0,099
Eeq pM /g lípido	1501,00	118,06 (293,11)	83,58 (147,50)	0,317
Beta: Eeq pM/g plac.	1462,00	5,58 (14,18)	7,65 (22,52)	0,224
Eeq pM /g lípido	1559,00	314,95 (716,96)	363,30 (1084,20)	0,496

TEXB: Carga estrogénica total efectiva [n= 51 ($\leq 10\text{ Kg}$), n= 66 ($> 10\text{ Kg}$)].
 DE: Desviación estándar

4.6.1.4 Relación entre el municipio de residencia y TEXB de la fracción alfa y beta

La cercanía de la vivienda de la madre a zonas donde se utilizan compuestos químicos con actividad estrogénica, por ejemplo industrias, labores agrícolas, etc. puede estar relacionado con los niveles de actividad estrogénica encontradas en el tejido placentario. En el estudio de Madrid se ha intentado ver si la residencia (rural o urbana) de la madre durante el embarazo, está relacionada con los niveles de carga total encontrados en las muestras de placenta.

La dificultad a priori que se nos plantea en el estudio de Madrid es que la mayoría de las madres tienen residencia urbana. Las tablas de contingencia para relacionar la presencia/ausencia de estrogénicidad en la fracción alfa y en la beta, con el tipo de municipio donde reside, muestran que no existe asociación estadísticamente significativa.

TEXB	\geq LD	Tipo municipio		χ^2	p
		Urbano	Rural		
Alfa	Sí	93	8	0,684	0,408
	No	8	0		
Beta	Sí	91	8	0,872	0,350
	No	10	0		

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n= 109. LD: Limite Detección

Según el test de Mann-Whitney, al relacionar los niveles de estrogenicidad obtenidos en la fracción alfa y en la beta, con la residencia, no se encontró ninguna asociación significativa, aunque si se pueden apreciar valores considerablemente superiores de carga estrogénica para las madres que habitaban en la zona urbana, como podemos observar en la siguiente tabla.

TEXB	U	Lugar residencia		p
		Medias (\pm DE)		
		Rural	Urbana	
Alfa: Eeq pM/g plac.	398,50	3,56 (5,30)	1,88 (3,66)	0,949
Eeq pM /g lípido	338,00	143,27 (215,76)	97,95 (181,63)	0,443
Beta: Eeq pM/g plac.	373,50	16,80 (28,23)	5,33 (17,03)	0,722
Eeq pM /g lípido	355,00	517,05 (772,78)	289,18 (907,38)	0,323

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. Rural n=8 y Urbano n=101. DE: Desviación estándar

Relación entre lugar de residencia y otras variables de la encuesta

Estudiamos la relación existente entre el lugar de residencia y algunas de las variables incluidas en el estudio. Así por ejemplo, el 62,37% de las mujeres que vivían en la zona urbana, tenían estudios medios, aunque no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el lugar de residencia y el nivel de estudios. Tampoco se observó una asociación estadísticamente significativa entre la residencia y el tipo de trabajo desarrollado por las mujeres durante el embarazo; sin embargo, el 88,54% del total de mujeres dedicadas a otras actividades diferentes del hogar, vivían en un área urbana. No encontramos, tampoco, asociación estadística entre el hábito tabáquico o la paridad y la variable lugar de residencia, pero si se observó que un mayor número de madres fumadoras durante el embarazo, residían en áreas urbanas.

	Categorías	Lugar residencia		χ^2	p
		Urbano	Rural		
Nivel de estudios	Primarios	6	0	0,768	0,681
	Medios	63	6		
	Superiores	32	2		
Actividad laboral	Hogar	11	2	1,733	0,188
	Otros	85	5		
Paridad	Primípara	55	3	0,856	0,355
	Múltipara	46	5		
Hábito tabáquico	Sí	19	0	1,583	0,208
	No	35	3		

Todas las variables con n=109, excepto en la variable actividad laboral n=103 y hábito tabáquico n=57.

4.6.1.5 Relación entre el nivel de estudios y TEXB de la fracción alfa y beta

Dado que el nivel de estudios puede identificar, dentro de la población, a un grupo particular de individuos en los que confluyen situaciones comunes, se ha investigado la relación entre esta variable y la exposición a la mezcla de xenoestrógenos organohalogenados (fracción alfa) y otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas (fracción beta).

Según la tabla de contingencia, al relacionar la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y beta con el nivel de estudios, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa, aunque sí se encontró un número mayor de mujeres con positividad para TEXB en la fracción alfa y beta, entre las mujeres que tenían estudios medios.

TEXB	≥ LD	Nivel estudios			χ^2	p
		Primarios	Medios	Superiores		
Alfa	Sí	6	66	35	0,663	0,718
	No	0	7	4		
Beta	Sí	6	66	35	0,663	0,718
	No	0	7	4		

TEXB: Carga estrogénica total efectiva. n = 118. n=6 Primarios, n=73 Medios y n=39 Superiores. LD: Limite Detección

Al utilizar el test de Kruskal-Wallis, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa y beta y el nivel de estudios, apareciendo de nuevo niveles medios mayores de TEXB alfa, en el tejido placentario de mujeres con estudios medios.

TEXB	χ^2	Nivel de estudios			p
		Primarios	Medios	Superiores	
Alfa:					
Eeq pM/g plac.	3,724	1,78 (1,31)	2,11 (3,91)	1,81 (3,53)	0,155
Eeq pM /g lípido	1,805	58,73 (30,06)	135,77 (281,37)	81,58 (152,57)	0,406
Beta:					
Eeq pM/g plac.	0,857	7,44 (13,17)	6,96 (21,59)	6,09 (15,15)	0,652
Eeq pM /g lípido	0,255	235,85 (412,69)	396,13(1103,39)	250,70 (587,91)	0,880

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=6 (Primarios), n=73 (Medios) y n=39 (Superiores).
DE: Desviación estándar

Por último, se consideró estudiar mediante el test de Mann-Whitney la variable nivel de estudios, comparando al grupo de mujeres con estudios primarios y/o secundarios, con aquellas que tenían estudios superiores, no encontrándose ninguna relación estadísticamente significativa.

TEXB	U	Nivel de estudios		p
		Primarios/Medios	Superiores	
Alfa: Eeq pM/g plac.	1259,00	2,09 (3,77)	1,81 (3,53)	0,107
Eeq pM /g lípido	1347,00	129,92 (271,22)	81,58 (152,57)	0,268
Beta: Eeq pM/g plac.	1456,00	7,00 (21,01)	6,09 (15,15)	0,629
Eeq pM /g lípido	1536,00	383,95 (1066,10)	250,70 (587,91)	0,979

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 79 (Primarios/medios) y n=39 (Superiores).
DE: Desviación estándar

Relación entre nivel de estudios y otras variables de la encuesta

Encontramos, aplicando tablas de contingencia, una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y el nivel de estudios de las madres. Así, el 97,9% de las madres del estudio de Madrid, que contaban con estudios medios o superiores, se dedicaban a otro tipo de actividades laborales diferentes a las del hogar.

Nivel de estudios	χ^2	Actividad laboral		p
		Hogar	Otros	
Primarios	14,463	4	2	0,001
Medios		9	60	
Superiores		3	33	

Hogar, n=16 y otros, n=95.

La prueba de Kruskal-Wallis no estableció una asociación estadísticamente significativa entre el nivel de estudios y el número de hijos, aunque como muestra la tabla siguiente, se puede observar que el número medio de hijos era algo mayor en las madres con estudios medios y superiores.

	χ^2	Nivel de estudios			p
		Medias (\pm DE)			
		Primarios	Medios	Superiores	
	0,187				0,911
Número de hijos	0,83 (1,33)	1,05 (1,15)	1,05 (1,25)		

Primarios n=6, Medios n=73 y Superiores n=39. DE: Desviación estándar

4.6.1.6 Relación entre la actividad laboral y TEXB de la fracción alfa y beta

Se ha estudiado la relación entre el tipo de actividad desarrollada durante el embarazo y la carga estrogénica, y a que la exposición ocupacional de la madre, puede influir en la exposición intrauterina del feto a compuestos DEs. La

variable actividad laboral se recodificó, inicialmente en dos categorías: trabajo en hogar y otros.

En la tabla de contingencia que relaciona la presencia (\geq LD) o ausencia ($<$ LD) de estrogénicidad, de la fracción alfa y beta, con la actividad laboral, no aparece ninguna asociación estadísticamente significativa.

TEXB	\geq LD	Actividad laboral		χ^2	p
		Hogar	Otros		
Alfa	Sí	15	89	0,000	0,992
	No	1	6		
Beta	Sí	15	86	0,174	0,677
	No	1	9		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 111.

LD: Limite de detección

Tampoco encontramos asociación estadística entre el tipo de trabajo desarrollado por la mujer y los niveles de TEXB de su tejido placentario, cuando se aplicó el test de Kruskal-Wallis, aunque los valores medios de la TEXB de la fracción alfa y beta eran mayores entre las mujeres que trabajaban fuera del hogar.

TEXB	χ^2	Actividad laboral		p
		Medias (\pm DE)		
		Hogar	Otros	
Alfa:				
EeqpM/g placenta	1,503	1,32 (1,03)	2,02 (3,87)	0,220
EeqpM/g lípido	0,486	61,31 (63,49)	119,95 (260,27)	0,486
Beta:				
EeqpM/g placenta	0,149	4,45 (8,37)	7,27 (21,08)	0,699
EeqpM/g lípido	0,081	200,73 (311,42)	373,23 (1031,22)	0,775

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Hogar n=16 y Otros n=95.

DE: Desviación estándar

Relación entre la actividad laboral y otras variables de la encuesta

Al relacionar la actividad laboral con el hábito tabáquico, según observamos en la tabla de contingencia, no se encontró una asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, las mujeres fumadoras (81,54%), desarrollaban preferentemente actividades fuera del hogar.

Actividad laboral	X ²	Hábito tabáquico		p
		No	Si	
Hogar	0,151	8	3	0,698
Otros		32	16	

n=59. No fuma n=40 y Fuma n=19

Mediante el test de Kruskal-Wallis, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el tipo de actividad laboral desarrollada durante el embarazo y variables tales como peso al nacimiento, índice ponderal (IP) o perímetro cefálico (PC) del recién nacido.

	X ²	Actividad laboral		p
		Medias (± DE)		
		Hogar	Otros	
Peso (g)	2,046	3062,00 (165,44)	3272,09 (435,66)	0,153
IP (g/cm³)	0,240	2,58 (0,26)	2,63 (0,26)	0,625

n=97. Hogar, n= 14 y Otros, n= 83. DE: Desviación estándar. IP: Índice ponderal

Si encontramos una asociación cercana a la significación estadística entre el número de hijos y el tipo de trabajo desarrollado por la mujer durante el embarazo, al aplicar también el test de Kruskal-Wallis.

	χ^2	Actividad laboral		p
		Medias (\pm DE)		
		Hogar	Otros	
Número de hijos	3,391	2,18 (0,41)	2,32 (0,53)	0,066
Semana gestación	0,379	27,73 (14,74)	22,95 (15,95)	0,538

DE: Desviación estándar.

4.6.1.7 Relación entre la percepción de exposición a contaminantes ambientales y TEXB de la fracción alfa y beta

Al enfrentar la variable dicotómica presencia/ausencia de TEXB, a la variable dicotómica percepción de la exposición (sí/no) a productos químicos, mediante tablas de contingencia, no se encontró asociación estadísticamente significativa. Del total de mujeres que afirmaban estar expuestas a productos químicos, el 88,57% presentaban un valor medible de TEXB tanto en alfa como en beta.

TEXB \geq LD	Percepción de exposición		χ^2	p	
	Sí	No			
Alfa	Sí	31	76	0,261	0,609
	No	4	7		
Beta	Sí	31	76	0,261	0,609
	No	4	7		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=118. LD: Limite Detección

Según el test de Mann-Whitney, no existe tampoco asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa o de la fracción beta y la percepción de la exposición a productos químicos, aunque observamos que los valores medios de carga estrogénica en la fracción beta, son mayores para el grupo de madres que sí tenían percepción de este tipo de exposición.

TEXB	U	Percepción de exposición		p
		Medias (\pm DE)		
		Sí	No	
Alfa:				
EeqpM/g placenta	1315,00	1,74 (3,24)	2,10 (3,87)	0,418
EeqpM/g lípido	1355,00	85,73 (146,87)	125,83 (268,47)	0,566
Beta:				
EeqpM/g placenta	1366,00	13,46 (22,34)	3,84 (7,03)	0,610
EeqpM/g lípido	1359,00	569,00(1447,65)	243,31(588,35)	0,582

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. DE: Desviación estándar

4.6.1.8 Relación entre paridad y TEXB de la fracción alfa y beta

La paridad puede ser un elemento modificador de la exposición interna a sustancias químicas con actividad estrogénica. El hecho de ser primípara o múltipara, así como, en el número de hijos, podría influir sobre los niveles de TEXB de las fracciones alfa y beta. Al relacionar la variable paridad con la presencia o ausencia de estrogénicidad (tablas de contingencia), no se encontró asociación estadísticamente significativa, presentando una situación equiparable en niveles de estrogénicidad por encima del LD para ambas fracciones, siendo el porcentaje de madres primíparas ligeramente superior en la fracción beta (54,20% en la fracción alfa y 55,14% en la fracción beta).

TEXB \geq LD	Paridad		χ^2	P	
	Primípara	Múltipara			
	Alfa	Sí			58
	No	6	5		
Beta	Sí	59	48	0,377	0,539
	No	5	6		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 118.

LD: Limite Detección

Si aplicamos el test de Mann-Whitney para relacionar los niveles de estrogenicidad de las fracciones alfa y beta en el grupo de las madres primíparas y comparar estos valores con el de múltiparas, no se encuentra asociación estadística, aunque los niveles medios de estrogenicidad en pM/g placenta, para las madres primíparas, era ligeramente superior tanto para la fracción alfa como para la beta.

TEXB	U	Paridad		p
		Medias (± DE)		
		Primípara	Múltipara	
Alfa: Eeq pM/g plac.	1696,00	2,11 (4,01)	1,86 (3,28)	0,862
Eeq pM /g lípido	1696,00	103,58 (185,50)	126,21(291,40)	0,863
Beta: Eeq pM/g plac.	1718,00	6,91 (16,39)	6,44 (16,39)	0,957
Eeq pM/g lípido	1710,00	305,61 (709,86)	380,57 (1152,02)	0,925

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Primípara n=64 y Múltipara n=54.
DE: Desviación estándar

Al aplicar el test de correlación de Spearman, no se encontró tampoco, asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa y el número de hijos.

TEXB	Número de hijos			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	0,009	0,925	0,014	0,877
Fracción Beta	-0,016	0,860	-0,021	0,824

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 118

Relación entre paridad y otras variables de la encuesta

Según la prueba de Mann-Whitney no existía ninguna asociación estadísticamente significativa entre la paridad y las variables del niño como peso al nacer e índice ponderal (IP). Si podemos observar que los valores medios de peso de los niños eran ligeramente superiores en las madres múltiparas.

TEXB	U	Paridad		p
		Medias (\pm DE)		
		Primípara	Múltipara	
Peso niño (g)	1274,00	3225,74 (443,97)	3326,20 (425,43)	0,427
IP (g/cm³)	1187,00	2,65(0,23)	2,62 (0,28)	0,290

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 54 (primíparas) y n= 50 (múltiparas)
DE: Desviación estándar

4.6.1.9 Relación entre hábito tabáquico y TEXB de la fracción alfa y beta

El consumo de tabaco durante el embarazo, puede influir en los niveles de exposición transplacentaria a xenobióticos. Al relacionar la variable dicotómica, hábito tabáquico (fuma o no fuma), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Si se observó que del total de mujeres fumadoras, el 91,04% tenían un valor de TEXB-alfa por encima del LD en su tejido placentario y el 88,06% para TEXB-beta.

TEXB	\geq LD	Hábito tabáquico		χ^2	p
		No	Sí		
Alfa	Sí	37	16	0,677	0,173
	No	5	3		
Beta	Sí	38	15	0,217	1,526
	No	4	4		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n = 61. LD: Limite Detección

Según el test de Mann-Whitney, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y TEXB, para ambas fracciones. Aún así, los niveles medios de TEXB de la fracción alfa y beta, eran mayores en las mujeres fumadoras que en las no fumadoras.

TEXB	U	Hábito tabáquico		p
		Medias (\pm DE)		
		No	Si	
Alfa: Eeq pM/g plac.	376,00	2,06 (3,37)	3,47 (5,97)	0,720
Eeq pM /g lípido	395,00	158,43(336,73)	139,28(219,68)	0,950
Beta: Eeq pM/g plac.	340,00	7,95(19,51)	14,14(36,31)	0,358
Eeq pM /g lípido	355,00	452,01(971,60)	616,56(1749,99)	0,493

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. No fumadoras n= 42 y Fumadoras n=19.
DE: Desviación estándar

Relación entre hábito tabáquico y otras variables de la encuesta

Según el test de Mann-Whitney no existía una asociación con significación estadística, entre el peso del niño o el IP, y el hábito tabáquico de la madre, observándose que los valores medios de los pesos de los niños de las madres que fumaron durante el embarazo, eran ligeramente inferiores respecto de las que no lo hicieron.

	U	Hábito tabáquico		p
		Medias (\pm DE)		
		No	Si	
Peso (g)	308,00	3237,63 (412,39)	3198,24 (357,28)	0,460
IP (g/cm³)	242,00	2,60 (0,23)	2,72 (0,27)	0,140

DE: Desviación estándar

Según el test de Mann-Whitney, tampoco había asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico durante el embarazo y el tiempo de gestación en semanas, como muestra la tabla siguiente.

	U	Hábito tabáquico		p
		Media (\pm DE)		
		No	Si	
Semana gestación	288,50	39,46 (1,33)	39,67 (1,61)	0,268

n=57; Si fuma n=39 y No fuma n=18. DE: Desviación estándar

Resultados

Cuando utilizamos las tablas de contingencia con el objeto de describir la influencia del hábito tabáquico durante el embarazo con el tipo de parto, se observó que no existía asociación estadísticamente significativa.

Hábito tabáquico	χ^2	Tipo de parto				p
		Medias (\pm DE)				
		Vaginal	Fórceps	Cesárea	Otros	
No	2,536	25	9	4	1	0,469
Si		9	4	3	2	

n=57. DE: Desviación estándar.

4.6.1.10 Relación entre problemas en el embarazo y TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la variable dicotómica, problemas en el embarazo (sí o no), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de positividad para la carga estrogénica de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. De todas las mujeres que presentaban un valor de estrogenicidad por encima de LD, tanto en la fracción alfa como en beta, tan sólo el 34,58% presentó problemas durante el embarazo, según muestra la siguiente tabla de contingencia.

TEXB \geq LD		Problemas en el embarazo		χ^2	p
		No	Sí		
Alfa	Sí	70	37	1,717	0,190
	No	5	6		
Beta	Sí	70	37	1,717	0,190
	No	5	6		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n = 118. LD: Limite Detección

Según el test de Mann-Whitney, se halló una asociación estadística entre problemas en el embarazo y los niveles de estrogenicidad para la fracción beta (Eeq pM/g lípido) como muestra la siguiente tabla. Podemos apreciar que en

general los valores medios de carga estrogénica son superiores en las madres que no presentaron problemas en el embarazo.

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n = 118. DE: Desviación estándar.

TEXB	U	Problemas en el embarazo		p
		Medias (\pm DE)		
		No	Si	
Alfa: Eeq pM/g plac.	1486,00	2,14 (3,59)	1,74(3,87)	0,479
Eeq pM /g lípido	1361,00	117,27(195,75)	108,14(302,59)	0,160
Beta: Eeq pM/g plac.	1327,00	9,08(23,50)	2,56 (5,18)	0,110
Eeq pM /g lípido	1200,00	440,79(1117,40)	163,98(429,85)	0,021

4.6.1.11 Relación entre empastes y TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la variable dicotómica, presencia de empastes (si o no), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Si se observó que dentro del grupo de mujeres con empastes, el 89,52% tenían un valor de TEXB por encima del LD en su tejido placentario, en la fracción alfa y en beta, como muestra la tabla de contingencia siguiente.

TEXB	\geq LD	Empastes		χ^2	p
		No	Sí		
Alfa	Sí	13	94	1,502	0,220
	No	0	11		
Beta	Sí	13	94	1,502	0,220
	No	0	11		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n = 118

Si utilizamos el t est de Mann-Whitney para relacionar la presencia de empastes con la carga estrogénica, tampoco se obtuvo ninguna asociación estadística. Aunque sí podemos observar, que los valores medios de

Resultados

estrogenicidad son superiores en el grupo de mujeres con presencia de empastes.

TEXB	U	Empastes		p
		Medias (\pm DE)		
		No	Si	
Alfa: Eeq pM/g plac.	576,00	1,88 (3,02)	2,01 (3,77)	0,360
Eeq pM/g lípido	619,00	93,83 (141,47)	116,43 (248,79)	0,585
Beta: Eeq pM/g plac.	553,00	4,97 (9,05)	6,91 (20,13)	0,266
Eeq pM/g lípido	550,00	263,23 (345,95)	349,11(984,14)	0,255

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n = 13, sin empastes y n= 105, con empastes.
DE: Desviación estándar.

Según muestra el test de correlación de Spearman, no se halló asociación estadísticamente significativa al relacionar número de empastes con la carga estrogénica.

TEXB	Número empastes			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	p	ρ	p
Fracción Alfa	0,009	0,926	-0,013	0,891
Fracción Beta	0,001	0,992	-0,008	0,931

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n = 117

4.6.2 CARACTERÍSTICAS DEL NIÑO

4.6.2.1 Relación entre el peso del recién nacido y TEXB de la fracción alfa y beta.

Es conocido que determinados factores mantienen una relación muy estrecha con el peso del recién nacido, por ejemplo, el consumo de drogas y tabaco durante el embarazo se relaciona con un bajo peso al nacer. Cabe también pensar que otros factores medioambientales, como la exposición intrauterina a determinadas sustancias químicas, pudieran jugar un papel relevante.

Así, para determinar la relación existente entre los niveles de estrogenicidad de las fracciones alfa y beta y el peso del niño a nacimiento, se utilizó el test de correlación de Spearman y tablas de contingencia. El peso del niño se categorizó en dos grupos (bajo peso <2500 g y peso normal \geq 2500 g) y se enfrentó a la variable ausencia/presencia de TEXB por encima del LD (tablas de contingencia). Según muestra la tabla siguiente, el test de correlación de Spearman, no encontró asociación estadística entre peso del niño y la carga estrogénica total efectiva. La mayoría de los niños con un peso \geq 2500 g, presentaban estrogenicidad positiva tanto para la fracción alfa (90,20%) como para la fracción beta (89,21%).

TEXB	Peso niño			
	ρ	p	P	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	-0,045	0,644	0,058	0,554
Fracción Beta	-0,038	0,701	0,032	0,746

TEXB=Carga estrogénica total efectiva

TEXB	\geq LD	Peso del niño		χ^2	p
		< 2500 g	\geq 2500 g		
Alfa	Sí	3	92	0,956	0,328
	No	1	10		
Beta	Sí	4	91	0,481	0,488
	No	0	11		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva n=106. LD: Limite Detección

Sin embargo, al aplicar el test de Mann-Whitney, encontramos que existe una tendencia a la asociación significativa entre la TEXB de la fracción alfa (Eeq pM/g lípido) y el peso del niño, teniendo valores medios mayores de TEXB los niños con un peso igual o superior a 2500 g.

TEXB	U	Peso del niño		p
		Medias (\pm DE)		
		< 2500 g	\geq 2500 g	
Alfa: Eeq pM/g plac.	140,00	0,52 (0,55)	2,07(3,85)	0,289
Eeq pM/g lípido	94,00	16,43 (21,05)	121,40 (251,17)	0,068
Beta: Eeq pM/g plac.	195,00	22,74 (44,22)	6,59 (18,86)	0,881
Eeq pM/g lípido	168,00	888,45 (1736,24)	346,28 (949,27)	0,551

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=4 (< 2500 g) y n=102 (\geq 2500 g).
DE: Desviación estándar.

4.6.2.2 Relación entre el índice ponderal y TEXB de la fracción alfa y beta

La exposición transplacentaria a contaminantes químicos puede estar relacionada con el índice ponderal con el que nacen los niños, por eso, se ha estudiado la relación de los niveles de TEXB y el índice ponderal (IP) del recién nacido. Al enfrentar la variable presencia/ausencia de TEXB, a la variable IP categorizada en los dos grupos (< 2,5 g/cm³ y \geq 2,5 g/cm³), no se encontró asociación estadística significativa, según muestra la tabla de contingencia.

TEXB	\geq LD	Índice ponderal		χ^2	p
		< 2,5 g/cm ³	\geq 2,5 g/cm ³		
Alfa	Sí	30	63	0,113	0,737
	No	3	8		
Beta	Sí	28	65	1,070	0,301
	No	5	6		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 104. LD: Limite Detección

Se aplicó el test de Mann-Whitney, con la variable IP categorizada en dos grupos anteriormente citados y tampoco se observó asociación estadísticamente significativa, aunque se puede apreciar que los valores de carga estrogénica son superiores para los niños con IP \geq 2,5 g/cm³, en ambas fracciones.

TEXB	U	Índice ponderal		p
		Medias (\pm DE)		
		< 2,5 g/cm ³	\geq 2,5 g/cm ³	
Alfa:				
EeqpM/g placenta	1155,00	1,29 (1,93)	2,39 (4,40)	0,980
EeqpM/g lípido	1120,00	74,19 (122,72)	139,39 (288,52)	0,719
Beta:				
EeqpM/g placenta	1041,00	12,75(33,51)	18,10(32,39)	0,362
EeqpM/g lípido	993,00	584,45(1467,73)	1335,64(2532,32)	0,213

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. DE: Desviación estándar.

4.6.2.3 Relación entre las semanas de gestación y TEXB de la fracción alfa y beta

Durante el desarrollo fetal, variaciones en la relación de los niveles de estrógenos/andrógenos podrían de terminar cambios evidentes o sutiles al nacimiento, resultando por ejemplo un parto semanas antes de lo esperado. Es por eso, que hemos estudiado si la actividad biológica de compuestos químicos-DE contenidos en las muestras de placenta pudiera estar relacionada con la duración de la gestación del niño. Se estudió primero, esta relación, mediante el test de correlación de Spearman. Asimismo, se calcularon tablas de contingencia con el fin de ver la influencia de la presencia/ausencia de TEXB en la edad gestacional (< 37 y \geq 37 semanas). También se estudió la relación entre la variable cuantitativa continua, niveles de TEXB alfa y beta, en función de la edad gestacional (Test de Kruskal-Wallis).

Según el test de correlación de Spearman, no se encontró relación estadísticamente significativa al relacionar las variables semanas de gestación y la carga estrogénica total efectiva, como muestra la siguiente tabla.

Resultados

TEXB	Semanas gestación			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	0,115	0,245	0,159	0,106
Fracción Beta	0,041	0,679	0,061	0,539

TEXB=Carga estrogénica total efectiva

Según muestra la tabla de contingencia, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de estrogenicidad y las semanas de gestación. Sin embargo, podemos observar que de los niños que presentaban valores positivos de estrogenicidad en la fracción alfa, el 96,84% tenían más de 37 semanas. Para el caso de la fracción beta el porcentaje era ligeramente inferior, 95,79%.

TEXB	≥ LD	Semana de gestación		χ ²	p
		< 37 semanas	≥ 37 semanas		
Alfa	Sí	3	92	0,956	0,328
	No	1	10		
Beta	Sí	4	91	0,481	0,488
	No	0	11		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Limite Detección

Según el test de Mann-Whitney, encontramos una tendencia a la asociación significativa entre TEXB de la fracción alfa y la variable semanas de gestación, con mayores niveles de carga estrogénica en los tejidos placentarios de madres que dieron a luz niños con una edad gestacional ≥ 37 semanas. Sin embargo, para el caso de beta aunque no había asociación estadística, los mayores niveles aparecen en los niños con edad gestacional por debajo de 37 semanas.

TEXB	U	Semana de gestación		p
		Medias (\pm DE)		
		< 37 semanas	\geq 37 semanas	
Alfa: Eeq pM/g plac.	140,00	0,52 (0,55)	2,07(3,85)	0,289
Eeq pM /g lípido	94,00	16,43(21,05)	121,40(251,17)	0,068
Beta: Eeq pM/g plac.	195,00	22,74(44,22)	6,59(18,86)	0,881
Eeq pM /g lípido	168,00	888,45(1736,24)	346,28(949,27)	0,551

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=4 (\leq 37 semanas) y n=102 ($>$ 37 semanas).
DE: Desviación estándar.

4.6.2.4 Relación del sexo del niño y TEXB de la fracción alfa y beta

Según se plasma en la tabla de contingencia, al relacionar la carga estrogénica con la variable sexo del niño (niños o niñas), no se encontró asociación estadísticamente significativa.

TEXB \geq LD	Sexo del niño		χ^2	p	
	Niños	Niñas			
	Alfa	Sí			54
	No	7	4		
Beta	Sí	55	40	0,045	0,832
	No	6	5		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Limite Detección

4.7 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS BIVARIADO POBLACIÓN GRANADA

4.7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

4.7.1.1 Relación entre la edad de la madre y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que con la población de Madrid, se ha estudiado la relación existente entre la carga estrogénica total efectiva (TEXB) de las fracciones alfa y beta de las muestras de tejido placentario en las muestras de Granada, y la edad de las madres. Se considerará en todo el estudio como significación estadística la $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ y la tendencia a la significación estadística cuando $p \leq 0,1$.

Según el test de Spearman, los niveles de carga estrogénica total efectiva de la fracción alfa, estaban significativamente relacionados con la edad de las madres: a mayor edad, mayores valores de carga estrogénica en el tejido placentario.

TEXB	Edad de la madre			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	p	ρ	p
Fracción Alfa	0,124	0,033	0,137	0,018
Fracción Beta	0,048	0,410	0,065	0,264

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Se consideran muestras con valor por encima del LD, aquellas con un valor igual o superior a 10^{-13} Eeq pM/g placenta. Según la tabla de contingencia, existe una asociación estadísticamente significativa entre los valores positivos del biomarcador-TEXB (valor por encima del LD) y los no positivos (valor por debajo del LD) y la edad de la madre, para la fracción beta. En esta tabla la edad de la madre aparece categorizada por encima y por debajo del valor medio de la población de estudio (32 años). Del total de las madres con un valor medible de TEXB en la fracción beta, un 52,69% tenían una edad >32 años.

TEXB	≥ LD	Edad de la madre		χ ²	p
		≤ 32 años	> 32 años		
Alfa	Sí	105	114	1,094	0,315
	No	48	40		
Beta	Sí	123	137	4,346	0,037
	No	30	17		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Limite de detección.

Cuando estudiamos si existen diferencias significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en las fracciones alfa y beta de madres con edad ≤ 32 años, con respecto a las que tienen una edad > 32 años, aparecen diferencias estadísticamente significativas para ambas fracciones. Se observa que, los valores medios de TEXB de la fracción alfa y beta son mayores en aquellos tejidos placentarios de madres con mayor edad (Test de Mann-Whitney).

TEXB	U	Edad de la madre		p
		Media (± DE)		
		≤ 32 años	> 32 años	
Alfa: Eeq pM/g plac	9121,00	3,44(11,74)	5,09(10,20)	0,009
Eeq pM/g lípido	9091,00	130,37(335,54)	228,53(472,16)	0,006
Beta: Eeq pM/g plac	9358,50	20,30(80,27)	20,80(38,20)	0,012
Eeq pM/g lípido	9300,00	931,54(2302,83)	1262,26(2703,06)	0,009

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Madres con edad ≤32años n=153 y >32años n=155.

DE: Desviación estándar.

Relación entre la edad de la madre y otras variables de la encuesta

Según el test de Spearman, existía una relación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el número de hijos, con mayor número de hijos a más edad, y una tendencia hacia una asociación estadísticamente negativa entre la edad y las semanas de gestación (mayor edad, menos semanas de gestación). También se establece una relación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el IMC antes de quedarse embarazada,

Resultados

con mayores IMC en madres de mayor edad. Asimismo, existía una relación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y la ganancia de peso durante el embarazo, siendo esta última menor en las madres de mayor edad.

Variables	Edad de la madre	
	ρ	P
Características Madre		
Número hijos	0,361	<0,001
IMC	0,140	0,014
Ganancia de peso	-0,124	0,031
Características niño		
Perímetro cefálico	0,051	0,652
Semana gestación	-0,106	0,075
Peso niño	-0,017	0,959
Índice ponderal	-0,004	0,936

Según el test de Mann-Whitney, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre edad de la madre y paridad, y como se puede ver en los valores medios de ambos grupos, las mujeres multíparas tenían de media una edad mayor que las primíparas. No se halló asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y la variable edad de la madre, encontrándose entre las fumadoras a las mujeres más jóvenes.

	U	Medias (\pm DE)		p
		Primípara	Multípara	
Edad de la madre (años)	7414,00	30,49 (5,04)	33,75 (5,14)	<0,001
		Fuma		
	8317,00	31,36 (6,37)	32,61 (4,87)	0,210
		No fuma		

Primíparas, n=138; Multíparas, n=166; Fumadoras, n=83; No fumadoras, n=221
DE: Desviación estándar.

Según el test de Kruskal-Wallis, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el nivel de estudios.

Las mujeres que tuvieron un hijo con mayor edad, eran las que tenían estudios universitarios. Para la variable actividad laboral, no se encontró asociación estadísticamente significativa, aunque cabe destacar que las madres que desempeñaban trabajos en el campo, eran las que tenían mayor edad.

	X	Medias (\pm DE)			p
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Edad de la madre (años)	9,572	31,64 (5,83)	32,29 (4,72)	34,29 (4,19)	0,008
	0,814	Agricultura 33,87 (5,82)	Hogar 31,89 (5,89)	Otros 32,17 (5,16)	0,666

Sin estudios/ primarios, n=163; estudios medios n=92; estudios superiores n=49. Hogar n=109; agricultura n=15; otros tipos de trabajo n=173. DE: Desviación estándar.

4.7.1.2 Relación entre el índice de masa corporal de la madre y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid se estudió el IMC antes del embarazo, ya que podría ser un indicador de una mayor exposición de xenoestrógenos en el tejido placentario.

Según el test de correlación de Spearman, no existía una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de carga estrogénica total efectiva de las fracciones alfa y beta y el IMC de la madre antes del embarazo.

TEXB	IMC de la madre			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	p	ρ	p
Fracción Alfa	0,009	0,878	0,047	0,422
Fracción Beta	-0,039	0,503	-0,016	0,778

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según la tabla de contingencia, se halló una tendencia hacia la asociación estadística significativa entre la presencia o ausencia de estrogénicidad en la fracción alfa y el IMC. Del grupo de madres de este estudio que poseían un IMC < 25K g/m², un 68,05% tenían estrogénicidad en la fracción alfa de su tejido

Resultados

placentario y en el grupo de madres con $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$, correspondía un porcentaje superior, 78,65%. Por otra parte, del total de madres con un valor medible de TEXB para la fracción alfa en el tejido placentario ($n=216$), un 67,74% tenían un $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$ antes del embarazo.

TEXB	$\geq LD$	IMC		χ^2	p
		$< 25 \text{ Kg/m}^2$	$\geq 25 \text{ Kg/m}^2$		
Alfa	Sí	147	70	3,447	0,063
	No	69	19		
Beta	Sí	185	73	0,636	0,425
	No	31	16		

IMC madre $< 25 \text{ Kg/m}^2$ $n=216$ e IMC madre $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ $n=89$.
LD: Límite de detección.

Según el test Mann-Whitney, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en la fracción alfa o beta de madres con $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$, con respecto a las que tenían un $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$, pero los valores medios de TEXB en ambas fracciones, eran mayores en madres con $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$.

TEXB	U	IMC		p
		Medias (\pm DE)		
		$< 25 \text{ Kg/m}^2$	$\geq 25 \text{ Kg/m}^2$	
Alfa: Eeq pM/g plac.	8694,00	4,19(9,65)	4,56(13,95)	0,897
Eeq pM/g lípido	8390,00	180,06(413,11)	180,30(418,48)	0,508
Beta: Eeq pM/g plac.	8643,00	17,10(34,79)	29,20(102,96)	0,792
Eeq pM/g lípido	8757,00	1097,03(2507,52)	1114,05(2555,22)	0,929

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. IMC madre $> 25 \text{ Kg/m}^2$ $n=216$; IMC madre $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ $n=89$. DE: Desviación estándar.

Relación entre el índice de masa corporal de la madre y otras variables de la encuesta

Según el test de correlación de Spearman, existía una asociación estadísticamente significativa entre el IMC, justo antes de quedarse embarazada y el índice ponderal (IP) neonatal, perímetro cefálico y ganancia de peso, siendo

esta relación positiva para las primeras dos variables, con mayores IMC en madres con niños con mayor IP y perímetro cefálico y negativa para la tercera, con mayores ganancias de peso durante el embarazo en madres con menor IMC. Además, existía una tendencia a la asociación estadísticamente significativa entre el IMC y el peso del niño, así como con el número de hijos, con mayores IMC en madres que tuvieron niños con un peso mayor y mayor número de hijos.

Variables	IMC antes del embarazo	
	ρ	p
Características niño		
Perímetro cefálico	0,222	0,021
Peso niño	0,104	0,076
Índice ponderal	0,243	0,007
Semanas de gestación	0,060	0,320
Características madre		
Ganancia peso	-0,198	<0,001
Número de hijos	0,109	0,056

4.7.1.3 Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid es interesante considerar cómo la ganancia de peso durante el embarazo, podría condicionar la movilización de contaminantes químicos almacenados en los reservorios de grasa durante la vida de las madres y por consiguiente, ponerlos a disposición del feto.

El Test de Spearman no reveló ninguna asociación estadísticamente significativa entre los niveles de TEXB de alfa y beta y la ganancia de peso durante el embarazo.

TEXB	Ganancia de peso			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Alfa	-0,006	0,920	-0,002	0,974
Beta	-0,050	0,392	-0,039	0,511

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según nuestra tabla de contingencia, tampoco había asociación estadísticamente significativa entre la ganancia de peso y TEXB de la fracción alfa o beta, y no existían grandes diferencias entre el número de mujeres con presencia de TEXB en alfa o beta en función de si ganaron más o menos peso durante el embarazo.

TEXB	\geq LD	Ganancia de peso		χ^2	p
		\leq 12 Kg	$>$ 12 Kg		
Alfa	Sí	106	111	0,994	0,319
	No	48	39		
Beta	Sí	132	125	0,330	0,566
	No	22	25		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva
 Ganancia de peso \leq 12Kg n=154 y ganancia $>$ 12Kg n=150.
 LD: Limite de detección.

Aunque no había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en la fracción alfa o beta, de madres con ganancia de peso \leq 12Kg, con respecto a las que ganaron más de 12Kg (Test de Mann-Whitney), los valores medios de TEXB en ambas fracciones eran mayores en madres con ganancia de peso superior a 12Kg.

TEXB	U	Ganancia de peso		p
		Medias (\pm DE)		
		≤ 12 Kg	> 12 Kg	
Alfa: Eeq pM/g plac.	10189,000	3,67(8,25)	4,96(13,31)	0,512
Eeq pM/g lípido	10192,000	161,58(375,52)	200,77(451,79)	0,454
Beta: Eeq pM/g plac.	10078,500	19,56(35,73)	22,00(83,09)	0,550
Eeq pM/g lípido	10298,000	1082,84(2133,89)	1124,51(2121,46)	0,772

TEXB=Carga es trogénica total efectiva. Ganancia de peso ≤ 12 Kg n= 154; Ganancia de peso > 12 Kg n=150. DE: Desviación estándar.

Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y otras variables de la encuesta

Al aplicar el test de correlación de Spearman encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el peso del niño y la ganancia de peso de la madre durante el embarazo, naciendo con mayores pesos aquellos niños de madres que ganaron más peso durante esta etapa.

Cuando aplicamos esta misma prueba para relacionar el número de hijos y la ganancia de peso, se vio que había asociación estadística, con menores ganancias de peso durante el embarazo entre las que tenían más hijos. También se encontró relación estadísticamente significativa entre el IMC y la ganancia de peso, a mayor IMC antes del embarazo menor ganancia de peso. Sin embargo, no encontramos asociación estadística entre la ganancia de peso y las variables del niño como: perímetro cefálico, índice ponderal y semanas de gestación, aunque la tendencia era que a mayor perímetro cefálico y mayor número de semanas de gestación, mayor ganancia de peso; y a mayor índice ponderal, menor ganancia de peso.

Variables	Ganancia peso	
	ρ	p
<i>Características Madre</i>		
Número hijos	-0,163	0,004
IMC	-0,261	<0,001
Edad madre	-0,124	0,031
<i>Características niño</i>		
Perímetro cefálico	0,039	0,733
Semana gestación	0,058	0,332
Peso niño	0,116	0,046
Índice ponderal	-0,046	0,609

4.7.1.4 Relación entre municipio de residencia y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid, se consideró que la cercanía de la vivienda de la madre a zonas donde se utilizan sustancias con actividad estrogénica, podría estar relacionado con los niveles de estos compuestos, encontrados en el tejido placentario.

Según muestra la tabla de contingencia, cuando relacionamos la presencia/ausencia de estrogenicidad en la fracción alfa y beta con el lugar de residencia (rural o urbana) de la madre durante el embarazo, se observa que no existe asociación estadísticamente significativa, aunque para la fracción beta, la asociación tiende a la significación estadística. Cabe destacar, que el número de mujeres que presentaban TEXB de la fracción alfa y beta en su tejido placentario por encima del LD, era mayor en mujeres que residían en una zona rural.

TEXB \geq LD	Lugar de residencia		χ^2	p	
	Rural	Urbana			
Alfa	Sí	131	85	0,481	0,488
	No	49	38		
Beta	Sí	147	109	2,694	0,095
	No	33	14		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n= 303
LD: Limite de detección.

Según el test de Mann-Whitney, al relacionar los niveles de estrogenicidad obtenidos en la fracción alfa y en la beta, con la residencia, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa, incluso la tendencia a una asociación significativa, encontrada en el test anterior para el caso de la fracción beta desaparecía. Sin embargo, de nuevo, los niveles medios de TEXB en ambas fracciones, eran más elevados en los tejidos placentarios de las que mujeres que residían en una zona urbana.

TEXB	U	Lugar de residencia		p
		Medias (\pm DE)		
		Rural	Urbana	
Alfa: Eeq pM/g plac.	10256,00	4,11 (9,64)	4,46 (12,01)	0,940
Eeq pM/g lípido	17759,00	175,39 (392,15)	185,51 (432,25)	0,905
Beta: Eeq pM/g plac.	9757,00	12,75 (26,61)	26,44 (79,38)	0,583
Eeq pM/g lípido	9925,00	925,08 (2304,32)	1240,63 (2668,62)	0,758

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Rural n=180; Urbana n=123.
DE: Desviación estándar.

Relación entre el municipio de residencia y otras variables de la encuesta

En el estudio estadístico encontramos una asociación significativa entre el lugar de residencia y el nivel de escolaridad. El 66,25% de las mujeres que, no tenían estudios o solamente tenían estudios primarios, vivían en una zona rural. También apareció relación entre la residencia y el tipo de trabajo desarrollado por las mujeres durante el embarazo. El 69,14% y 80,00% del total de mujeres que se dedican a tareas del hogar y a la agricultura, respectivamente, vivían en un área rural. No existía asociación estadística entre el hábito tabáquico o la paridad y la variable "lugar de residencia", pero se observó que un mayor número de multíparas y de fumadoras durante el embarazo, residían en áreas rurales.

	Categorías	Lugar de residencia		χ^2	p
		Urbana	Rural		
Nivel de estudios	Sin/primarios	54	106	9,169	0,010
	Medios	42	53		
	Superiores	28	21		
Actividad laboral	Hogar	29	65	9,753	0,008
	Agricultura	3	12		
	Otros	89	101		
Hábito tabáquico	Fumadora	34	50	0,005	0,945
	No fumadora	90	130		
Paridad	Primípara	61	77	1,219	0,270
	Múltipara	63	103		

4.7.1.5 Relación entre el nivel de estudios y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid, también se consideró el nivel de estudios, dado que puede identificar dentro de la población a un grupo particular de individuos en los que confluyen situaciones comunes. Según la tabla de contingencia, al relacionar la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y beta con el nivel de estudios, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa. Aunque si se observó, que era mayor el número de mujeres con TEXB en la fracción alfa entre las mujeres sin estudios o aquellas que tenían estudios primarios.

TEXB	≥ LD	Nivel de estudios			χ^2	p
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
Alfa	Sí	116	66	36	0,461	0,794
	No	45	30	13		
Beta	Sí	131	85	43	2,817	0,245
	No	30	11	6		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Límite Detección

Al utilizar el test de Kruskal-Wallis, se encontró una tendencia hacia la asociación estadística entre TEXB de la fracción beta (Eeq pM/g lípido) y el nivel de estudios, apareciendo niveles medios mayores en el tejido placentario de mujeres con estudios medios. Esta tendencia también se observa para el caso de la fracción alfa, cuando se considera en las unidades Eeq pM/g placenta.

TEXB	χ^2	Nivel de estudios			p
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Alfa:					
Eeq pM/g plac.	0,384	3,65(8,45)	5,57(15,43)	3,82(7,54)	0,825
Eeq pM/g lípido	0,921	151,83(369,93)	205,43(459,19)	224,45(459,46)	0,631
Beta:					
Eeq pM/g plac.	1,890	14,66(33,72)	34,45(102,25)	18,33(33,61)	0,389
Eeq pM/g lípido	5,369	828,79(2016,98)	1533,90(3218,98)	1183,06(2442,01)	0,068

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Sin estudios/primarios, n=161; Medios n=96 y superiores n=49. DE: Desviación estándar.

Relación entre nivel de estudios y otras variables de la encuesta

Según muestra la tabla de contingencia, se halló una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y el nivel de estudios de las madres. Aproximadamente el 72% y el 87% de las mujeres dedicadas a tareas del hogar o agricultura, respectivamente, no tenían estudios o solamente tenían estudios primarios. La mayoría de las madres dedicadas a otro tipo de trabajos tenían estudios superiores.

Categorías	Nivel de estudios			χ^2	p
	Sin/primarios	Medios	Superiores		
Hogar	68	24	3	39,653	<0,001
Actividad laboral Agricultura	13	2	0		
Otros	81	70	41		

Cuando aplicamos el test de Kruskal-Wallis, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el número de hijos y el nivel de estudios. Los valores medios del número de hijos por mujer eran mayores en las madres sin estudios o con estudios primarios.

	χ^2	Nivel de estudios			p
		Medias (\pm DE)			
Número de hijos	6,765	Sin/primarios	Medios	Superiores	0,034
		1,86(0,92)	1,63(0,77)	1,23(0,17)	

Sin estudios/ primarios n=161; Medios n=96 y superiores n=49.
DE: Desviación estándar.

4.7.1.6 Relación entre la actividad laboral y TEXB de la fracción alfa y beta

Como en el estudio de Madrid se consideró la exposición ocupacional de la madre a productos químicos, ya que podría influir en la exposición intrauterina del feto a estas sustancias. Por esta razón, se ha estudiado la relación entre el tipo de actividad desarrollada por la mujer durante el embarazo y la exposición fetal a sustancias estrogénicas a través de la medida de la carga química total (TEXB) en el tejido placentario.

Debido al interés que existe sobre la posible asociación entre la exposición ocupacional a xenobióticos y la aparición de defectos en el nacimiento, la variable actividad laboral se recodificó en tres categorías: trabajo en hogar, agricultura y otros. Al relacionar la presencia (\geq LD) o ausencia ($<$ LD) de estrogénicidad en la fracción alfa y beta con la actividad laboral (tabla de contingencia), se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y la carga estrogénica total efectiva de la fracción beta, pero no en la fracción alfa. En el 100% y en el 66,66% de las madres que trabajaban en agricultura, se pudo determinar un valor de estrogénicidad en la fracción beta y en alfa.

TEXB	≥ LD	Actividad laboral			X ²	p
		Hogar	Agricultura	Otros		
Alfa	Sí	68	10	136	0,220	0,896
	No	26	5	56		
Beta	Sí	84	15	156	8,381	0,015
	No	10	0	36		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Límite Detección

No apareció asociación estadística entre el tipo de trabajo desarrollado por la mujer y los niveles de TEXB de su tejido placentario, cuando se aplicó el test de Kruskal-Wallis. Aún así, la TEXB de la fracción alfa (Eeq pM/g plac) era prácticamente igual entre mujeres que trabajaban en el hogar y en la agricultura y menor para el grupo que realizaban otro tipo de trabajo; y en el caso de la fracción beta, mayor entre el colectivo de dedicación al hogar.

TEXB	X ²	Actividad laboral			p
		Medias (± DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Alfa: Eeq pM/g plac.	0,850	4,74(14,21)	4,64(6,42)	3,91(9,33)	0,654
Eeq pM/g lípido	0,235	162,97(354,69)	178,05(264,27)	177,36(425,79)	0,889
Beta: Eeq pM/g plac.	1,502	30,66(103,60)	13,63(20,59)	16,81(34,06)	0,472
Eeq pM/g lípido	1,439	1285,42(2883,53)	1545,70(4300,93)	993,33(2147,62)	0,487

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Hogar n=94; Agricultura n=15 y otros trabajos n=192. DE: Desviación estándar.

Relación entre la actividad laboral y otras variables de la encuesta

Según la tabla de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre la paridad y la actividad laboral. Un 76,08% de las madres que eran primíparas, se dedicaban a actividades laborales diferentes a la agricultura o el hogar. En cambio, del total de mujeres que trabajaban en el hogar, un 69,47% eran multíparas y un 73,33% entre las que trabajaban en el campo.

Resultados

	Categorías	Actividad laboral			χ^2	p
		Hogar	Agricultura	Otros		
Hábito tabáquico	Fuma	32	2	50	3,685	0,158
	No fuma	63	13	142		

Al aplicar el test Kruskal-Wallis, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el tipo de actividad laboral desarrollada durante el embarazo y variables tales como peso e índice ponderal del recién nacido.

	χ^2	Actividad laboral			p
		Medias (\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Peso (g)	1,739	3407,27(444,95)	3246,27(472,24)	3352,92(453,45)	0,419
IP (g/cm³)	0,051	2,46(0,51)	2,53(0,31)	2,52(0,29)	0,975

Hogar n=94; Agricultura n=15 y otros trabajos n=192. DE: Desviación estándar.

Asimismo, al aplicar el test de Kruskal-Wallis, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el número de hijos y la actividad laboral desarrollada por la mujer durante el embarazo. El número medio de hijos por mujer era mayor entre las agricultoras, seguido de las que realizaban tareas en el hogar.

	χ^2	Actividad laboral			p
		Medias (\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Número de hijos	0,479	1,99(1,09)	2,20(1,04)	1,61(0,818)	<0,001
Sem. Gestación	0,728	39,42(1,65)	39,29(1,49)	39,39(1,42)	0,695

Hogar n=94; Agricultura n=15 y otros trabajos n=192. DE: Desviación estándar.

4.7.1.7 Percepción exposición a productos químicos y TEXB de la fracción alfa y beta

Al enfrentar la variable dicotómica presencia/ausencia de TEXB, a la variable dicotómica percepción de la exposición (sí/no) a productos químicos, no se observó ninguna relación estadística entre ambas variables (tabla de contingencia). Aún así, se pudo apreciar que del total de mujeres que afirmaban estar expuestas a productos químicos, un 71,43% presentaban un valor medible de TEXB en alfa y un 88,57% en beta.

TEXB \geq LD	Percepción de exposición		χ^2	p	
	Sí	No			
Alfa	Sí	25	193	0,001	0,979
	No	10	78		
Beta	Sí	31	228	0,190	0,663
	No	4	43		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Límite Detección

Según el test de Mann-Whitney, no se halló ninguna asociación estadísticamente significativa entre TEXB de la fracción alfa, ni de la fracción beta y la percepción de la exposición a productos químicos. De todas formas, es destacable que el valor medio de los niveles de la fracción alfa, entre las que afirmaron estar expuestas, era mayor.

TEXB	U	Percepción de exposición		p
		Medias (\pm DE)		
		Sí	No	
Alfa: Eeq pM/g plac.	3735,00	6,11(12,63)	4,04(10,79)	0,137
Eeq pM/g lípido	4291,00	224,61(402,58)	173,57(415,18)	0,580
Beta: Eeq pM/g plac.	4373,50	11,33(23,74)	21,87(66,57)	0,791
Eeq pM/g lípido	4350,00	1039,51(3005,50)	1106,32(2445,99)	0,752

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Sí percepción n= 35; No percepción n=271.
DE: Desviación estándar.

Relación entre la variable percepción de exposición a productos químicos y otras variables de la encuesta

Con respecto a la variable exposición a productos químicos durante el embarazo, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa al enfrentar esta variable con otras de la encuesta, como por ejemplo hábito tabáquico o paridad (Tabla de contingencia).

	Categorías	Percepción de exposición		X ²	p
		Sí	No		
Hábito Tabáquico	Fuma	9	76	0,147	0,701
	No fuma	27	195		
Paridad	Primípara	16	125	0,036	0,849
	Múltipara	20	146		

Sin embargo, al aplicar el test de Mann-Whitney se pudo comprobar que la variable semanas de gestación sí que se relacionaba estadísticamente con la variable percepción de la exposición a productos químicos, presentando un valor medio de semanas de gestación superior, entre las madres que declararon no tener percepción de exposición a compuestos químicos.

	U	Percepción de exposición		p
		Medias (± DE)		
		Sí	No	
Número de hijos	4738,00	1,78(0,87)	1,75(0,951)	0,760
Sem. Gestación	2825,00	38,83(1,66)	39,45(1,46)	0,021

Si percepción n= 35; No percepción n=271. DE: Desviación estándar.

4.7.1.8 Relación entre paridad y TEXB de la fracción alfa y beta

Como en el estudio de Madrid también se consideró la paridad en el estudio de Granada, ya que podría ser un elemento modificador de la exposición interna a sustancias con actividad estrogénica. Por esta razón se ha insistido

sobre el hecho de ser primípara o múltipara, así como en el número de hijos y su influencia sobre la presencia/ausencia de TEXB de las fracciones alfa y beta.

Al relacionar la variable paridad con la presencia o ausencia de estrogenicidad, la fracción alfa poseía casi una asociación estadísticamente significativa con la paridad de las madres. Teniendo mayor frecuencia de aparición de estrogenicidad en la fracción alfa, aquellas madres que eran múltiparas (un 57,34% del total de mujeres con un valor de TEXB por encima del LD). Para el caso de la fracción beta, sí encontramos una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables. Al igual que la fracción alfa, un mayor número de madres con una estrogenicidad positiva en la fracción beta eran múltiparas (56,37%).

TEXB ≥ LD	Paridad		χ ²	p	
	Primípara	Múltipara			
Alfa	Sí	93	125	3,564	0,059
	No	48	40		
Beta	Sí	113	146	4,071	0,044
	No	28	19		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Límite Detección

Si usamos el test de Mann-Whitney para relacionar los niveles de estrogenicidad de las fracciones alfa y beta en el grupo de las madres primíparas y comparar estos valores con el múltiparas, vemos que para la fracción alfa la asociación era significativa, y tendía a la significación estadística en beta (Eeq pM/g pl acenta). Los niveles medios de estrogenicidad para las madres múltiparas eran mayores que para las primíparas en ambas fracciones.

Resultados

TEXB	U	Paridad		p
		Medias \pm DE		
		Primípara	Múltipara	
Alfa: Eeq pM/g plac.	8807,000	2,54 (6,98)	5,76 (13,37)	0,007
Eeq pM/g lípido	9114,000	124,14(281,88)	226,44 (494,13)	0,019
Beta: Eeq pM/g plac.	9399,000	17,19 (36,07)	23,63 (79,65)	0,090
Eeq pM/g lípido	9707,000	1012,73 (2496,78)	1085,57 (2536,75)	0,205

TEXB=Carga estrogénica total efectiva; Primíparas n=141 y múltiparas n=165.
DE: Desviación estándar.

Al aplicar el test de correlación de Spearman, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa y el número de hijos, siendo esta mayor cuanto mayor número de hijos tuviera la madre.

TEXB	Número de hijos			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	0,138	0,018	0,118	0,043
Fracción Beta	0,072	0,222	0,051	0,387

TEXB= Carga estrogénica total efectiva.

Relación entre paridad y otras variables de la encuesta

Según el test de Mann-Whitney, no existía ninguna asociación estadísticamente significativa entre la paridad y variables del niño como peso al nacer e índice ponderal (IP). Aún así, se observó que los niños de madres múltiparas tenían un peso e IP medio mayor.

	U	Paridad		p
		Medias (\pm DE)		
		Primípara	Múltipara	
Peso niño (g)	9818,00	3296,24 (472,76)	3347,34 (443,06)	0,148
IP (g/cm³)	3401,00	2,48 (0,36)	2,60 (0,39)	0,142

Primíparas n=141, múltiparas n=165. DE: Desviación estándar.

Según podemos ver en la tabla de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de parto y la paridad. De las 208 mujeres que tuvieron un parto espontáneo en el estudio de Granada, el 60,58% eran multíparas. Con respecto a las semanas de gestación, no se encontró una correlación entre esta variable y la paridad.

	Categorías	Paridad		χ^2	p
		Primípara	Multípara		
Tipo de parto	Espontáneo	82	126	18,568	<0,001
	Cesárea	15	19		
	Instrumental	33	11		
Semanas de gestación	32-37 sem.	7	6	0,346	0,841
	>37-39 sem.	51	61		
	>39 sem.	71	85		

La variable número de hijos, se asoció de manera estadísticamente significativa con el peso del niño, con mayores pesos cuanto mayor era el número de embarazos. La relación entre el número de hijos y el índice ponderal (IP) del recién nacido, tendía a la significación estadística, con mayor IP cuanto mayor era el número de hijos nacidos (Test de correlación de Spearman).

Variables	Número de hijos	
	ρ	p
Peso niño (g)	0,128	0,029
IP niño (g/cm ³)	0,160	0,076

4.7.1.9 Relación entre hábito tabáquico durante el embarazo y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid se consideró el consumo de tabaco durante el embarazo, y a que podría influir en los niveles de exposición transplacentaria a xenobióticos.

Para estudiar la relación entre el hábito tabáquico de la madre y la presencia/ausencia de TEXB de ambas fracciones, se utilizó la tabla de

Resultados

contingencia. Al relacionar la variable dicotómica, hábito tabáquico con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Sin embargo, se observó que del total de mujeres fumadoras, el 71,76% y el 85,88% tenían un valor de TEXB de la fracción alfa y beta respectivamente, por encima del LD en su tejido placentario.

TEXB \geq LD	Hábito tabáquico		χ^2	p	
	Fuma	No fuma			
Alfa	Sí	61	159	0,002	0,965
	No	24	64		
Beta	Sí	73	188	0,103	0,749
	No	12	35		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Límite Detección

Según el test de Mann-Whitney, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y la TEXB de ambas fracciones. Aún así, los niveles medios de TEXB de la fracción alfa, eran mayores entre las mujeres fumadoras al compararlas con las no fumadoras.

TEXB	U	Hábito tabáquico		p
		Medias (\pm DE)		
		Fuma	No fuma	
Alfa: Eeq pM/g plac.	8173,00	4,31(11,63)	4,19(9,25)	0,480
Eeq pM/g lípido	8504,00	168,82(403,59)	134,55(354,76)	0,724
Beta: Eeq pM/g plac.	8190,50	20,01(68,78)	22,13(45,53)	0,517
Eeq pM/g lípido	8310,00	957,13(2184,25)	1459,89(3194,97)	0,643

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Fumadoras n=85 y no fumadoras n=223.
DE: Desviación estándar.

Relación entre hábito tabáquico y otras variables de la encuesta

El hábito de fumar durante el embarazo se relacionó con el peso del niño, con pesos menores al nacer para niños de madres fumadoras. No se hallaron asociaciones estadísticas entre hábito tabáquico y otras variables del niño como el IP o perímetro cefálico, y aunque los valores medios eran prácticamente idénticos para ambos grupos.

	U	Hábito tabáquico		p
		Medias (\pm DE)		
		Fumadora	No fumadora	
Peso del niño (g)	4,003	3156,93(387,47)	3364,84(462,76)	0,046
IP (g/cm³)	1,676	25,71(2,68)	25,72(4,70)	0,198
P. Cefálico (cm)	0,411	34,52(1,38)	34,90(1,24)	0,523

Fumadoras n=85, no fumadoras n=223. DE: Desviación estándar.

Según el test de Mann-Whitney, las semanas de gestación no estaban relacionadas de forma estadísticamente significativa con el hábito de fumar durante el embarazo, presentando unos valores medios similares en ambos grupos de estudio.

	U	Hábito tabáquico		p
		Medias (\pm DE)		
		Fuma	No fuma	
Semanas gestación	7130,00	39,43(1,75)	39,37(1,39)	0,262

Fumadoras n=85 y no fumadoras n=223. DE: Desviación estándar.

Al construir la tabla de contingencia, tampoco apareció una relación estadísticamente significativa entre el haber fumado o no durante el embarazo y el tipo de parto.

	Categorías	Tipo de parto			χ^2	p
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
Hábito tabáquico	Fuma	60	8	10	0,958	0,619
	No fuma	148	26	34		

4.7.1.9 Relación entre problemas en el embarazo y TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la variable dicotómica, problemas en el embarazo (si o no), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. De todas las mujeres que presentaban un valor de estrogenicidad por encima de LD en la fracción alfa, sólo el 63,23% presentó problemas durante el embarazo, según muestra la tabla de contingencia. Para el caso de la fracción beta el porcentaje era inferior (61,02%).

TEXB \geq LD	Problemas en el embarazo		χ^2	p	
	No	Sí			
Alfa	Sí	75	129	0,163	0,686
	No	38	59		
Beta	Sí	99	155	1,428	0,232
	No	14	33		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva, n= 301. LD: Límite Detección

Según el test de Mann-Whitney, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre problemas en el embarazo y los niveles de estrogenicidad, como muestra la siguiente tabla. Podemos apreciar que en general los valores medios de carga estrogénica de la fracción alfa, son superiores en las madres que no presentaron problemas en el embarazo y sin embargo, son inferiores en la fracción beta para este grupo de mujeres.

TEXB	U	Problemas en el embarazo		p
		Medias (\pm DE)		
		No	Si	
Alfa: Eeq pM/g plac.	10361,00	4,08 (10,42)	3,65(8,02)	0,721
Eeq pM/g lípido	10313,00	281,04(1189,79)	171,14(400,28)	0,673
Beta: Eeq pM/g plac.	9469,50	15,70(29,96)	19,36 (38,39)	0,839
Eeq pM/g lípido	9605,00	797,68(1424,39)	1294,85(2970,97)	0,997

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=113, no problemas; n=188, sí problemas.
DE: Desviación estándar.

4.7.2 CARACTERÍSTICAS DEL NIÑO ESTUDIO DE GRANADA

4.7.2.1 Relación entre el peso del niño y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en estudio de Madrid, también estudiaremos en Granada la variable peso del recién nacido, en relación con la carga estrogénica total. En todos los casos, se considerará la significación estadística para $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0,1$.

Cuando utilizamos el test de correlación de Spearman, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la carga estrogénica de la fracción alfa y beta y la variable peso del niño.

TEXB	Peso del niño			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	0,021	0,722	0,042	0,479
Fracción Beta	-0,007	0,913	0,004	0,948

TEXB=Carga estrogénica total efectiva

Resultados

Según la tabla de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y el peso del niño. El 72,66% de los niños con un peso ≥ 2.500 gramos presentaban estrogenicidad positiva en la fracción alfa y el 84,17% en beta.

TEXB	\geq LD	Peso del niño		χ^2	p
		< 2500 g	\geq 2500 g		
Alfa	Sí	4	202	9,344	0,002
	No	8	76		
Beta	Sí	11	234	0,742	0,389
	No	1	44		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva, n=290. LD: Limite de Detección

Según el test de Mann-Whitney, existía una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa y el peso del niño, presentando valores medios de TEXB muy superiores, los niños con un peso igual o mayor de 2500 g.

TEXB	U	Peso del niño		p
		< 2500 g	\geq 2500 g	
Alfa:				
Eeq pM/g placenta	1105,50	1,13(2,52)	4,53(11,45)	0,061
Eeq pM/g lípido	872,50	25,10(66,68)	191,89(429,22)	0,006
Beta:				
Eeq pM/g placenta	1496,00	14,71(24,07)	20,88(65,45)	0,728
Eeq pM/g lípido	1458,00	799,24(1066,21)	1117,22 (2607,44)	0,626

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=12, (< 2500 g) y n=278 (\geq 2500 g).
DE: Desviación estándar.

Relación entre el peso del niño y otras variables de la encuesta

Al realizar el test de Spearman, se observó que el perímetro cefálico estaba correlacionado con el peso e índice ponderal (IP) del niño, así como con las semanas de gestación.

Variables	Peso del niño	
	ρ	p
Perímetro cefálico	0,613	< 0,001
IP niño	0,365	< 0,001
Semanas gestación	0,354	< 0,001

4.7.2.2 Relación entre el índice ponderal (IP) y TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid, en Granada también se estudió la variable IP, y a que la exposición transplacentaria a contaminantes químicos puede condicionar el índice ponderal con el que nacen los niños.

Al realizar el test de correlación de Spearman, se pudo observar que la carga estrogénica, de la fracción alfa y beta, no estaba relacionada estadísticamente de forma significativa con el IP, como muestra la siguiente tabla.

TEXB	Índice ponderal			
	ρ	p	ρ	p
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Fracción Alfa	-0,034	0,709	-0,029	0,750
Fracción Beta	-0,022	0,807	0,016	0,861

TEXB=Carga estrogénica total efectiva

Sin embargo, al realizar la tabla de contingencia, apareció una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción beta y el IP. El 62,13% de las madres con un nivel detectable de TEXB en la fracción beta de su tejido placentario, tuvieron niños con un IP $\geq 2,5 \text{ g/cm}^3$. Aunque para el caso de la

Resultados

fracción alfa no existía tal asociación; aún así, podemos observar un mayor número de madres con TEXB en esta fracción que tuvo niños con un índice ponderal mayor o igual a 2,5 g/cm³.

TEXB	≥ LD	Índice ponderal		χ ²	p
		< 2,5 g/cm ³	≥ 2,5 g/cm ³		
Alfa	Sí	35	51	0,703	0,402
	No	19	20		
Beta	Sí	39	64	6,719	0,009
	No	15	7		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Limite Detección

Al aplicar el test de Mann-Whitney, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el IP y TEXB de la fracción beta, presentando unos valores medios más elevados los niños con un IP por encima de 2,5 g/cm³. Para el caso de la fracción alfa no existía tal asociación pero, como se puede observar, también los valores medios de TEXB de esta fracción, son mayores entre el grupo de niños con un IP mayor.

TEXB	U	Índice ponderal		p
		Medias (± DE)		
		< 2,5 g/cm ³	≥ 2,5 g/cm ³	
Alfa:				
EeqpM/g placenta	1683,00	3,91(8,56)	5,05(12,04)	0,555
EeqpM/g lípido	1648,00	180,12(479,00)	195,26(377,31)	0,437
Beta:				
EeqpM/g placenta	1185,50	12,75(33,51)	18,10(32,39)	0,003
EeqpM/g lípido	1165,00	584,45(1467,73)	1335,64(2532,32)	0,002

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. n=54 (<2,5g/cm³) y n=71(≥2,5g/cm³).
DE: Desviación estándar.

Relación entre el índice ponderal y otras variables de la encuesta

Según muestra la tabla de contingencia, no existía ninguna asociación estadística entre el índice ponderal y las semanas de gestación o tipo de parto, pero se observó que, un 59,70% de los niños nacidos con más de 39 semanas, y un 59,09% de los niños nacidos de forma espontánea, tenían un IP $\geq 2,5$ g/cm³.

Categorías	Índice ponderal		χ^2	P	
	< 2,5 g/cm ³	$\geq 2,5$ g/cm ³			
Semanas gestación	32-37 sem.	3	5	0,962	0,618
	>37-39 sem.	23	24		
	>39 sem.	27	40		
Tipo de parto	Espontáneo	36	52	0,825	0,662
	Cesárea	7	7		
	Instrumental	10	10		

4.7.2.3 Relación entre las semanas de gestación y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al igual que en el estudio de Madrid, también se consideró las semanas de gestación para el estudio de Granada. Al relacionar las semanas de gestación con la TEXB de la fracción alfa y beta, no se observó relación significativa en ninguno de los casos (Test de Spearman).

TEXB	Semanas gestación			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	p	ρ	p
Fracción Alfa	-0,087	0,153	-0,057	0,352
Fracción Beta	0,006	0,925	0,025	0,676

TEXB=Carga estrogénica total efectiva

Resultados

Según muestra la tabla de contingencia, se halló una tendencia hacia una asociación significativa entre la presencia de estrogenicidad de la fracción beta y las semanas de gestación. Un total de 236 muestras, presentaron un valor medible de estrogenicidad en la fracción beta, de los cuales, un 54,66% eran muestras de niños con una edad gestacional superior a las 39 semanas. Para el caso de la fracción alfa se obtuvieron valores muy parecidos (un 53,23% de las muestras pertenecía a niños de edad gestacional >39 semanas), aunque en este caso no existía asociación estadística. Asimismo, del total de niños con una edad gestacional en tre 32 y 37 semanas, el 76,92% y el 100% tenían niveles detectables de TEXB en la fracción alfa y beta respectivamente. Entre los que nacieron con > 37-39 semanas, un 75,68% y 84,69%, tenían niveles cuantificables de ambas fracciones. En el caso de los niños nacidos con más de 39 semanas, un 68,59% y un 82,69% tenían presencia de carga estrogénica respectivamente en alfa y en beta.

TEXB	≥ LD	Semanas gestación			χ ²	p
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas		
Alfa	Sí	10	84	107	1,801	0,406
	No	3	27	49		
Beta	Sí	13	94	129	4,750	0,093
	No	0	17	27		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. LD: Limite Detección

Al aplicar el test de Kruskal-Wallis, no apareció asociación estadística entre los niveles cuantificados de TEXB de alfa y beta y las semanas de gestación. Aún así, nos encontramos para el caso de alfa con unos niveles medios de carga estrogénica (Eeq pM/g placenta) más elevados, en los tejidos placentarios de las madres que dieron a luz niños con una edad gestacional entre 32-37 semanas y entre >37-39 semanas para beta.

TEXB	χ^2	Semanas gestación			p
		Medias (\pm DE)			
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas	
Alfa:					
Eeq pM/g plac	4,077	5,16(11,21)	4,09(11,93)	3,98(10,03)	0,130
Eeq pM/g lípido	2,311	120,17(177,88)	176,14(369,72)	171,95(434,20)	0,315
Beta:					
EeqpM/g plac	0,115	14,44(27,77)	23,26(92,03)	19,34(39,04)	0,944
Eeq pM/g lípido	0,071	685,01(1276,80)	993,42(2097,11)	1234,93(2973,56)	0,965

TEXB= Carga estrogénica total efectiva. 32-37 semanas n=13; >37-39 semanas n=111 y >39 semanas n=156. DE: Desviación estándar.

Relación entre las semanas de gestación y otras variables de la encuesta

Según el test Mann-Whitney, las semanas de gestación no están asociadas de manera estadísticamente significativa con el tipo de parto, pero como se puede apreciar eran ligeramente menores entre las madres que tuvieron el parto con cesárea.

Variable	χ^2	Tipo de parto			p
		Medias (\pm DE)			
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental	
Semanas gestación	0,057	39,41(1,37)	39,18(2,27)	39,41(1,34)	0,972

Parto espontáneo n=208; cesárea n=34 e instrumental n=45. DE: Desviación estándar.

4.8 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA, EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO DE AMBAS POBLACIONES, MADRID Y GRANADA. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Para llevar a cabo el análisis multivariante se ha considerado la carga estrogénica total efectiva (TEXB) como variable continua dependiente y se han seleccionado algunas variables categóricas independientes, que en el análisis bivariante presentaron fuerte significación estadística como: IMC, edad de la madre, estudios, peso del niño, tipo de parto, talla del niño y paridad, siendo estas las variables predictoras.

Se han llevado a cabo los análisis comparándolos con la carga estrogénica total efectiva de la fracción alfa y beta por separado, utilizando diferentes unidades de medida (Eeq pM/ml y Eeq pM/g placenta).

4.8.1 Modelo 1 de regresión logística, TEXB alfa (Eeq pM/ml)

Como muestra el modelo de regresión logística, los valores medios de TEXB alfa, en unidades equivalentes estradiol pico Molar por mililitro (categorizados por el valor de la mediana), se relacionaron de manera estadísticamente significativa con las siguientes variables: la edad de la madre, el tipo de parto y la población de estudio, presentando las mujeres de Madrid un mayor riesgo de tener concentraciones más elevadas de carga estrogénica que las de Granada. También se observó una tendencia a la significación estadística para la variable peso del niño, categorizado en ≥ 2500 g y < 2500 g.

Variables	OR	IC 95%	p
Constante	0,124		0,058
IMC	0,958	0,908-1,011	0,117
Edad	1,044	1,000-1,089	0,049
Cohorte	3,064	1,864-5,035	< 0,001
Peso niño	2,854	0,940-8,670	0,064
Tipo parto	0,623	0,392-0,988	0,044

IC: Intervalo de Confianza

Cohorte: Madrid frente a Granada.

Peso niño, en dos categorías ≥ 2500 g y menor 2500g. Comparamos los niños ≥ 2500 g frente a los de < 2500 g de peso.

Tipo de parto, comparamos parto inducido frente a espontáneo.

4.8.2 Modelo 2 de regresión lineal, TEXB alfa, (Eeq pM /g placenta)

En los resultados del análisis de regresión lineal se observa una relación estadísticamente significativa entre la TEXB alfa, en unidades pico Molar de equivalente a estradiol por gramo de placenta, y las variables peso del niño y la población. Siendo los niños con mayor peso los que presentan un mayor riesgo de concentración elevada de TEXB alfa que los que tienen un peso < 2500 g. También podemos observar relación de tendencia a la significación estadística de las variables edad de la madre y el tipo de parto.

Variables	coeficiente β	EE	p
Constante		1,088	0,005
IMC	-0,051	0,027	0,320
Edad	0,092	0,022	0,072
Cohorte	0,126	0,246	0,014
Peso niño	0,150	0,524	0,003
Tipo parto	-0,093	0,237	0,067

EE: Error Estándar

Cohorte: Madrid frente a Granada

Peso niño: los de ≥ 2500 g frente a los de < 2500 g de peso.

Tipo de parto: parto inducido frente a espontáneo

4.8.3 Modelo 3 de regresión logística (varones), TEXB alfa (Eeq pM/ml)

Cuando realizamos el análisis de regresión logística estratificándolo por sexo, como muestra la siguiente tabla, observamos que para los varones se presenta una significación estadística entre la TEXB alfa y las variables: edad madre, población y tipo de parto. Por otra parte, se observa una tendencia positiva al relacionarla con la variable peso del niño.

Variables	OR	IC 95%	p
Constante	0,130		0,085
IMC	0,953	0,899-1,010	0,103
Edad	1,048	1,003-1,096	0,037
Cohorte	2,811	1,524-5,184	0,001
Peso niño	3,285	0,995-10,843	0,051
Tipo parto	0,565	0,343-0,928	0,024

IC: Intervalo de Confianza

Cohorte: Madrid frente a Granada

Peso niño: los de ≥ 2500 g frente a los de < 2500 g de peso.

Tipo de parto: parto inducido frente a espontáneo.

4.8.4 Modelo 3 de regresión lineal (varones), TEXB alfa (Eeq pM/ g placenta)

Al llevar a cabo el análisis de regresión lineal estratificado por sexo, observamos que en los varones se encontró una relación significativa entre la TEXB alfa (Eeq/ g placenta) y las variables peso niño y población y una asociación con tendencia a la significación estadística en las variables edad de la madre y el tipo de parto, siendo para esta última negativa.

Variables	Coefficiente β	EE	p
Constante		1,198	0,008
IMC	-0,046	0,030	0,400
Edad	0,092	0,024	0,089
Cohorte	0,112	0,313	0,039
Peso niño	0,161	0,558	0,003
Tipo parto	-0,106	0,263	0,050

EE: Error Estándar

Cohorte: Madrid frente a Granada

Peso niño: los de ≥ 2500 g frente a los de < 2500 g de peso.

Tipo de parto: parto inducido frente a espontáneo.

4.8.5 Modelo de Regresión lineal por terciles, TEXB alfa (Eeq pM/ g plac.)

Si realizamos el análisis de regresión lineal por terciles, los resultados muestran que en el primer tercil aparecen relaciones estadísticamente significativas entre la TEXB alfa (Eeq pM/ g placenta) y las variables población e IMC. Asimismo, se observó asociación positiva con la variable edad de la madre.

Para el segundo tercil la relación significativa se estableció entre la TEXB alfa y las variables población y tipo de parto. Por último, en el tercer tercil sólo observamos una asociación estadísticamente significativa, con la variable población.

Tercil		Coefficiente β	EE	p
1	Constante		0,468	<0,001
	IMC	0,176	0,011	0,037
	Edad	-0,149	0,010	0,076
	Cohorte	0,282	0,139	0,001
	Peso niño	0,136	0,178	0,101
	Tipo parto	-0,133	0,109	0,109
2	Constante		0,547	0,171
	IMC	-0,087	0,013	0,318
	Edad	0,099	0,010	0,263
	Cohorte	0,435	0,105	<0,001
	Peso niño	-0,103	0,316	0,223
	Tipo parto	-0,167	0,103	0,046
3	Constante		1,134	0,060
	IMC	-0,045	0,026	0,628
	Edad	0,023	0,018	0,796
	Cohorte	-0,215	0,226	0,022
	Peso niño	0,029	0,752	0,750
	Tipo parto	0,023	0,221	0,807

EE: Error Estándar

Cohorte: Madrid frente a Granada

Peso niño: los de ≥ 2500 g frente a los de < 2500 g de peso.

Tipo de parto: parto inducido frente a espontáneo

4.8.6 Regresión lineal TEXB beta, (Eeq pM/g placenta)

Los resultados del análisis de regresión lineal muestran una relación estadísticamente significativa entre la TEXB beta (Eeq pM / g placenta) y la variable estudios, estando esta categorizada en estudios medios/superiores y sin estudios/primaria, siendo las madres con más estudios las que presentan mayor riesgo de tener concentraciones de TEXB más elevadas. Se halló una asociación negativa y con significación estadística con la variable talla del niño. Asimismo, se observó asociación positiva con la variable población.

Variables	Coefficiente β	EE	p
Constante		3,268	0,030
Edad	0,008	0,031	0,892
Cohorte	-0,125	0,309	0,050
Longitud niño	-0,136	0,057	0,029
Estudios	0,126	0,299	0,041

EE: Error Estándar

Estudios categorizados: Estudios medios/superiores frente a sin estudios/primaria

4.8.7 Regresión logística, TEXB beta (Eeq pM/ml)

Cuando realizamos el análisis de regresión logística de la TEXB beta (Eeq pM/ml), observamos que hay una relación estadísticamente significativa con las variables paridad y población y una tendencia a la significación con la variable estudios, categorizada.

Variables	OR	IC 95%	p
Constante	6,239		0,046
Paridad	0,623	0,394-0,984	0,042
Edad	0,990	0,947-1,034	0,649
Cohorte	0,448	0,248-0,808	0,008
Estudios	0,666	0,425-1,044	0,076

IC: Intervalo de Confianza

Estudios categorizados: Estudios medios/superiores frente a sin estudios/primaria

4.8.8 Regresión lineal, TEXB beta, (Eeq pM/g placenta)

Se realizó un análisis de regresión lineal para estudiar la contribución de algunas variables a los valores de TEXB beta. De todas las variables analizadas, sólo la variable estudios (categorizada en estudios medios/superiores y sin estudios/primaria) presentaba una relación positiva con la TEXB beta (Eeq pM/g placenta), con una significación $p=0,065$.

Variables	Coeficiente β	EE	p
Constante		3,625	0,175
Longitud niño	-0,096	0,064	0,153
Edad	0,033	0,035	0,630
Cohorte	-0,100	0,376	0,147
Estudios	0,126	0,335	0,065

EE: Error Estándar

Estudios categorizados: Estudios medios/superiores frente a sin estudios/primaria

4.8.9 Regresión lineal, TEXB beta, (Eeq pM/g placenta)

También se realizó un análisis de regresión lineal para estudiar la contribución de otra serie de variables a los valores de TEXB beta (Eeq pM/g placenta). En este caso, las variables población y estudios, presentaban una asociación estadísticamente significativa, pero para la variable población con relación negativa. También se observó una relación con tendencia a la asociación estadística negativa con la variable paridad.

Variables	Coeficiente β	EE	p
Constante		0,945	0,016
Paridad	-0,103	0,253	0,050
Edad	-0,064	0,025	0,227
Cohorte	-0,120	0,272	0,020
Estudios	0,126	0,249	0,015

EE: Error Estándar

Estudios categorizados: Estudios medios/superiores frente a sin estudios/primaria

4.8.10 Regresión logística de TEXB beta (Eeq pM/ ml)

Cuando realizamos el análisis de regresión logística de la TEXB beta (Eeq pM/ml), observamos que hay relación estadísticamente significativa con las variables paridad y población y una tendencia a la significación con la variable estudios, categorizados como describimos anteriormente.

Variables	OR	IC 95%	p
Constante	7,166		0,024
Paridad	0,643	0,419-0,987	0,043
Edad	0,992	0,951-1,035	0,702
Cohorte	0,360	0,224-0,578	<0,001
Estudios	0,665	0,434-1,019	0,061

IC: Intervalo de Confianza

Estudios categorizados: Estudios medios/superiores frente a sin estudios/primaria

4.8.11 Modelo de Regresión lineal por terciles, TEXB beta (Eeq pM/ g plac.)

Si realizamos el análisis de regresión lineal por terciles, observamos que hay una fuerte relación con la variable población según muestran los resultados. Así, en el primer tercil aparece una relación estadísticamente significativa entre la TEXB beta (Eeq pM/ g placenta) y la variable población.

Para el segundo tercil la relación significativa se estableció entre la TEXB beta y la variable edad, apareciendo también una asociación negativa con tendencia a la significación, con la variable población. Por último, en el tercer tercil observamos una asociación negativa estadísticamente significativa, con la variable población.

Tercil		Coeficiente β	EE	p
1	Constante		0,870	0,001
	Cohorte	0,297	0,234	0,001
	Estudios	0,127	0,216	0,131
	Paridad	-0,051	0,227	0,559
	Edad	-0,052	0,022	0,558
2	Constante		0,392	0,668
	Cohorte	-0,176	0,113	0,068
	Estudios	0,006	0,114	0,949
	Paridad	-0,026	0,104	0,778
	Edad	0,203	0,011	0,027
3	Constante		0,695	0,000
	Cohorte	-0,164	0,231	0,068
	Estudios	0,027	0,183	0,772
	Paridad	0,050	0,189	0,602
	Edad	0,006	0,018	0,952

EE: Error Estándar

Cohorte: Cohorte: Madrid frente a Granada

Estudios categorizados: Estudios medios/superiores frente a sin estudios/primaria

5. DISCUSIÓN

La exposición infantil a compuestos hormonalmente activos tiene en la etapa intrauterina una de sus fases más críticas. Está bien documentada la movilización de la grasa corporal materna que tiene lugar durante el embarazo (Olea *et al.*, 1999; Waliszewski *et al.*, 2001), lo que supone una importante liberación a la sangre desde los depósitos lipofílicos de los compuestos organoclorados que la madre ha acumulado en su tejido adiposo, fundamentalmente. Tanto la liposolubilidad de los contaminantes como la persistencia de los mismos, junto a la exposición silenciosa a lo largo de años a través de fuentes tan diversas como la alimentaria, ambiental y laboral, contribuyen al aumento paulatino, en función de la edad del individuo, de muchos de estos residuos (Sala *et al.*, 2001; Waliszewski *et al.*, 2001; Falcón *et al.*, 2004). A través de la placenta el feto se impregna de la exposición histórica de la madre (Saxena *et al.*, 1981a; Martínez *et al.*, 1993; Hura *et al.*, 1999; Weisskopf *et al.*, 2005), que pasa ahora a acumularse en su propio tejido adiposo, cuando

éste empieza a ser cuantitativamente importante al final del embarazo y durante la lactancia

La exposición medioambiental a contaminantes químicos representa un problema para el embrión/feto desde el mismo momento en que estos alcanzan la placenta y la sangre fetal (Falcón *et al.*, 2004). Los estudios en animales y datos epidemiológicos descriptivos sugieren que muchas enfermedades relacionadas con las hormonas de la vida adulta, podrían tener su origen en el periodo intrauterino, y que los periodos pre y perinatal pueden constituir una etapa de una importancia capital para el riesgo de sufrir futuras patologías. Además, también ha sido documentado que el incremento en la frecuencia de trastornos en el desarrollo del aparato genitourinario en el hombre, que va desde el cáncer testicular, la criptorquidia e hipospadia, daños en la función testicular, así como la menor cantidad seminal, podrían estar relacionados con una mayor exposición en útero a disruptores endocrinos (Skakkebaek, 2001).

En este estudio se ha intentado caracterizar la exposición materno-infantil, atendiendo tanto a las variables que condicionan la exposición de la madre como del padre y haciendo un énfasis especial en la exposición efectiva durante la gestación. Por esta razón, la obtención de medidas objetivas de cuantificación de actividades hormonales en placenta es un pilar fundamental del diseño de este trabajo. Sin embargo, no se ha desdeñado el papel de la exposición durante la vida de la madre y el padre antes de la concepción del individuo motivo de estudio, abordando el rol de exposición con una doble aproximación: la encuesta epidemiológica con un amplio cuestionario y la medida de exposición a un grupo de compuestos químicos de carácter estrogénico.

Es cierto que la utilización de la encuesta epidemiológica y su cuestionario como fuente de obtención de datos deja al investigador a merced de la calidad de la misma, le obliga en muchas ocasiones a enfrentarse a problemas de legibilidad o ausencia de anotaciones y puede limitar, en definitiva, las posibilidades de obtención de información (Delgado *et al.*, 2002).

La preocupación de las autoridades, por establecer el nivel de exposición de la población a contaminantes medioambientales, llevó a diseñar un estudio transversal reclutando mujeres embarazadas y sus parejas, en su octavo mes de

gestación, residentes en dos distritos sanitarios de Madrid capital y área metropolitana. Las características sociodemográficas de las dos áreas sanitarias seleccionadas presentaban gran similitud para algunos de los parámetros evaluados como: porcentaje de la población con edad inferior a 15 años, porcentaje de mujeres en edad fértil, nivel de estudios de la población mayor de 30 años y porcentaje de residentes.

En el caso del estudio de Granada, se diseñó un estudio que incluía poblaciones de diferentes características sociodemográficas, que van desde la ciudad de Granada hasta pequeños núcleos rurales alejados de la capital, por lo que se llevó a cabo una clasificación basada en características sociodemográficas, ambientales y de usos del suelo bien diferenciadas. El área de estudio corresponde al ámbito geográfico del área de atención primaria del Distrito Metropolitano de Granada y parte del área sanitaria del Distrito Granada (zona Sur de la capital), cuyo hospital de referencia es el Hospital Clínico Universitario San Cecilio.

Todas las pacientes incluidas en el estudio de Madrid dieron a luz en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón y en el Hospital de Getafe, correspondientes a las dos áreas sanitarias objeto del estudio, área sanitaria 1 y área sanitaria 10 respectivamente. En el estudio de Granada, las pacientes reclutadas dieron a luz en el Hospital Clínico Universitario de Granada, circunstancia que puede limitar las conclusiones generales del trabajo en lo que respecta a su aplicación a la población general, ya que no todas las mujeres de Granada y pueblos cercanos vienen a dar a luz a dicho hospital.

Asimismo, se pretendía obtener diferentes matrices biológicas para la medida de la exposición, con objeto de elegir la más adecuada para su implementación posterior en la población general. De todos los posibles sustratos biológicos a utilizar para la valoración de la exposición, en este estudio se recogió el tejido placentario, además de una muestra de sangre de cordón umbilical en el momento del parto y una muestra de leche materna a las tres semanas posparto.

Desde los años 90, algunos países han implementado sistemas de vigilancia mediante la utilización de biomarcadores, para la valoración de la

exposición a diferentes contaminantes en la población general. Buenos ejemplos de los encontramos en NHANES (National Health and Nutrition Examination Surveys), llevado a cabo por el Centro Nacional de Estadística de la Salud en los EE.UU. o el GERES (German Environmental Survey) en Alemania. En este estudio de la población de Madrid, se pretendía también la utilización de biomarcadores para la valoración de la exposición de la población.

En España la vigilancia medioambiental ha estado perpetuamente ligada a la medición de determinados contaminantes seleccionados, a partir del suelo, aire, agua y alimentos. Sin embargo, en las últimas décadas han surgido varias iniciativas con el fin de incluir “datos humanos” en el marco de la vigilancia medioambiental. Este estudio de Madrid tenía el objetivo de obtener valores de referencia, para un amplio número de contaminantes medioambientales seleccionados, en el subgrupo de población elegido.

Inicialmente el estudio de Madrid se planteó para reclutar 100 triplete completos. El reclutamiento comenzó en Octubre del 2003 y concluyó en Mayo de 2004. Un total de 515 mujeres embarazadas, que cumplían los criterios de inclusión, fueron informadas de las características y objetivos del estudio de Madrid e invitadas a participar. De las cuales, solamente unas 268 mujeres (52%) decidieron comunicárselo a sus parejas. Finalmente, 149 parejas fueron incluidas, lo que resultó en una tasa de participación del trío (padre, madre y bebé) del 29%. Dos mujeres dieron a luz antes de la fecha prevista y otras dos parejas, además de un padre, no acudieron a la cita concertada, declinando las llamadas posteriores realizadas para continuar su permanencia en el estudio. La población de estudio quedó definitivamente constituida por 145 mujeres embarazadas, 144 padres y 135 recién nacidos.

Entre octubre del año 2000 y julio del 2002 se constituyó en el Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, una cohorte poblacional bajo el nombre de Infancia y Medio Ambiente- Granada (INMA-Granada) con el objetivo de investigar la influencia de la exposición a compuestos químicos, que se comportan como hormonas y la aparición de malformaciones urogenitales (criptorquidia e hipospadias) al nacimiento. Durante ese periodo de reclutamiento, se produjeron 4455 alumbramientos de varones en el hospital, de

los que se recogieron datos de un total de 668 individuos (15% de los varones nacidos), de entre estos se escogieron aleatoriamente un total de 308 de los que se disponía del cuestionario, examen físico del niño y muestra biológica de placenta.

La estadística descriptiva de cada una de las variables consideradas en los cuestionarios del estudio de Madrid y de Granada, nos ha permitido obtener una aproximación de las características de la población de estudio, con objeto de compararla con similares variables evaluadas para otros grupos poblacionales.

La población incluida en el estudio de Madrid resultó ser un grupo de mujeres relativamente jóvenes, con una edad media de 31 años, con un valor mínimo de 20 y un máximo de 41 años. Prácticamente la totalidad de la población de estudio (92,4%) residía en un área urbana (≥ 10.000 hab.s.) y llevaba viviendo en esos municipios una media de 17 años. El 74,10% de las mujeres del estudio de Madrid declaró estar casada y un 25,20% tenían pareja estable.

El nivel educativo de las madres participantes del estudio de Madrid podría considerarse como medio-alto, ya que un 34,60% de las mismas declaró tener estudios universitarios, un 36,7% tenían estudios de grado medio y un 28,7% de las madres habían completado estudios de primaria. Más del 50% de las madres reclutadas se incluyeron dentro de un grupo, donde podemos destacar el desempeño de tareas de secretarías y auxiliares administrativas (27,2%) y también es de destacar, las dedicadas a la enseñanza (10,8%). El 31% de las mujeres del estudio eran conscientes de la exposición a compuestos químicos tales como pesticidas.

El incremento medio del peso durante el embarazo de las madres de Madrid fue de $10,35 \pm 5,46$ Kg, con un valor mínimo de -6 Kg y un valor máximo de 27 Kg. La media del IMC de las madres antes del embarazo fue de $23,78$ Kg/m², con lo cual, si tomamos como referencia los rangos establecidos según la clasificación de la OMS (18,50-24,99 Kg/m²), las madres se engloban dentro de un peso normal. En cuanto al hábito tabáquico durante el periodo del embarazo, un 33,8% de las mujeres continuaron fumando durante ese periodo. La mayoría de las mujeres declararon un consumo bajo de alcohol durante el embarazo. El

82,2% de las madres declaró que no tomó vino tinto (1 vaso, 125 ml) en ese periodo, y de las pocas madres que tomaban algún vaso de vino lo hacían con una frecuencia de 1 o más por semana (5,3 %). El consumo de cerveza fue algo más frecuente, un 15,8% de las participantes declaró que tomaba una cerveza o más a la semana. Por lo que respecta a la ingesta de agua, un 83,4% de las madres bebían varios vasos de agua del grifo a la día y sólo un 15,8% consumieron agua embotellada, varias veces al día durante el embarazo.

Respecto a las características de su vida reproductiva destacamos que, el 57,60% de las madres del estudio de Madrid eran primíparas y un 42,4% multíparas, entre estas últimas el 72,9% de las mujeres habían estado embarazadas con anterioridad, al menos una vez. El 10,1% de las madres declaró haber tomado anticonceptivos orales antes de quedarse embarazada. El 29,5% de las madres relató algún problema durante el embarazo, siendo la infección de orina (21,6%), la diabetes gestacional (19,6%) y la pérdida de líquido y/o sangre (17,7%), las incidencias más frecuentemente registradas.

La población de madres incluidas en el estudio de Granada resultó ser también un grupo homogéneo de mujeres jóvenes, de aproximadamente 32 años de edad media, con un mínimo de 16 y un máximo de 46 años. Al contrario que el estudio de Madrid, el 41,66% de las participantes vivían en áreas rurales, de < 10.000 habitantes. La mayor parte declaró estar casada en el momento de la entrevista o conviviendo con su pareja (99,6%). La mayoría de las madres reclutadas se dedicaban a las tareas domésticas (38,3%) o a tareas de tipo administrativo (22,7%). Un 11,7% manifestaron haber estado expuestas ocupacionalmente a compuestos químicos (pesticidas, desinfectantes, productos fitosanitarios y productos usados en peluquería). Las madres de Granada poseían un nivel educativo más bien bajo, ya que un 53,4% no tenía estudios o sólo contaba con estudios primarios.

El incremento medio de peso de las madres de Granada durante el embarazo, fue de 12,78 Kg, con un valor mínimo de -10 Kg y un valor máximo de 34 Kg. La media del IMC de las madres (23,49 Kg/m²) antes del embarazo, las englobaba dentro del grupo de valor normal de peso (18,50-24,99 Kg/m²), según la clasificación de la OMS. Merece destacar que el 27,6% de las mujeres declaró

fumar durante el embarazo y tan solo dos mujeres afirmaron haber bebido alcohol en exceso durante el embarazo.

En cuanto a los antecedentes de la vida reproductiva para las madres de Granada, podemos subrayar que un 53,9% de las participantes habían estado embarazadas con anterioridad, y un 73,50% de las mismas tenían hijos. Un 47,1% declaró haber tomado anticonceptivos antes de quedarse embarazada. El 62,0% de las madres relató algún problema durante el embarazo, siendo las incidencias más frecuentes las náuseas (51,9%), los vómitos (48,4%) y la hemorragia vaginal (14,0%).

Atendiendo a las características de los padres de los recién nacidos incluidos en el estudio de Madrid, de forma resumida destacaríamos que su edad media era de aproximadamente 32 años y que la mayoría de ellos tenían un nivel educativo alto, al igual que sus parejas. El 36,0% de los padres había completado estudios de primaria y el 41,8% de los padres tenía estudios de grado medio. Por el contrario, los padres presentaron un porcentaje inferior en estudios superiores, llegando al 22,3% en comparación al de las madres de este mismo estudio (34,6%). La mayoría de los encuestados eran padres que estaban trabajando en el momento de la entrevista (91,40%), aunque había un pequeño porcentaje de parados (6,5%). Las ocupaciones mayoritarias (46,9%) que desempeñaban los padres de esta población correspondieron a: camareros, personal de la construcción y servicios relacionados, y otras actividades que puedan entrañar riesgo de exposición como fotógrafo, enfermero, trabajadores de viveros, matarifes, etc.

En el caso de los padres de los recién nacidos incluidos en el estudio de Granada, podemos destacar que: la edad media era de aproximadamente 35 años y la mayoría de ellos tenían un bajo nivel educativo. Un 52,44% contaba con estudios primarios y un 7,17% no tenía estudios. Las ocupaciones más habituales eran la construcción (21,5%), el trabajo de tipo administrativo (16,9%) y la hostelería (12,38%).

Por último, en cuanto a las características antropométricas de los recién nacidos de las madres de Madrid, se puso de manifiesto que, el valor medio de su peso al nacer era de 3.280 g. Tan sólo 4 niños del estudio nacieron con bajo

peso (3,5%), según la clasificación de la OMS (< 2.500 g). La media del índice ponderal (IP) en el momento del nacimiento fue de 2,64 g/cm³, el valor medio de la longitud del niño 49,83 cm y del perímetro cefálico 34,61 cm. La mayoría de los niños (89,3%) nacieron con una edad gestacional por encima de 37 semanas. La edad gestacional media fue de 39,16 semanas. La mayoría de los niños del estudio nacieron mediante parto espontáneo (61,1%). El porcentaje de cesáreas en el estudio de Madrid fue de 15,9%, porcentaje que supera ligeramente las recomendaciones de la OMS.

Respecto a las características antropométricas de los recién nacidos de las madres del estudio de Granada, se puso de manifiesto que, el valor medio de su peso al nacer fue de 3.306 g. Tan sólo un 4,1% presentaba bajo peso al nacer. El índice ponderal medio al nacimiento era de 2,57 g/cm³, el valor medio de la longitud del niño 50,77cm y del perímetro cefálico 34,80 cm. La mayoría de los niños del estudio de Granada (95,4%) nacieron con una edad gestacional por encima de las 37 semanas. La edad gestacional media fue de 39,38 semanas. Además, el 72,5% nació de forma espontánea y la práctica de cesáreas alcanzó el 11,8%, porcentaje que se ajusta a las recomendaciones establecidas por la OMS.

Los contaminantes ambientales que reúnen características tales como lipofilia y persistencia, tienden a acumularse en los tejidos ricos en grasa de los organismos (Travis *et al.*, 1988). Tras el depósito, entran en un estado de equilibrio, redistribuyéndose en función de su partición en los compartimentos grasos (Rogan *et al.*, 1986b). Durante el embarazo, las tasas de lipólisis y lipogénesis alcanzan un momento crítico (McNamara, 1994), motivo suficiente para que los compuestos almacenados en tejido adiposo sean liberados a la sangre, siendo transportados posteriormente a través de la placenta y finalmente alcancen el feto (Waliszewski *et al.*, 2000). Por esta razón, el índice de masa corporal (IMC) antes del embarazo, puede condicionar los niveles circulantes de esos compuestos, por lo que debería considerarse *a priori* como un factor modificador de la exposición a sustancias lipofílicas. De ahí la necesidad de recoger entre las variables de la encuesta epidemiológica tanto el peso como la altura de los participantes, y poder considerar así el IMC en el estudio.

Existen estudios que han demostrado una mayor exposición a contaminantes en niños con lactancia natural (Longnecker & Rogan, 2001) y una disminución de las concentraciones internas de organoclorados en madres que dan de lactar (López-Carrillo *et al.*, 2001)

Todo esto sugiere que el número de hijos previos que haya tenido la madre puede condicionar la exposición del nuevo hijo, debido a la limpieza de compuestos persistentes en cada embarazo y al periodo de lactancia previa (Karmaus *et al.*, 2001a). No obstante, no siempre se ha establecido la relación entre el número de embarazos y una menor carga de compuestos organoclorados.

En este trabajo se ha utilizado la estimación de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) como medida indirecta de la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal estrogénica, ya sea agonista o antagonista. Se trata de la estimación cuantitativa del efecto combinado del extracto tisular (las llamadas fracciones cromatográficas α y β), que posee la capacidad de inducir proliferación en células estrógeno-dependientes de cáncer de mama, mediante el ensayo E-Screen.

De todas las placentas analizadas en el estudio de Madrid (110), aproximadamente el 91% fueron positivas en el bioensayo de estrogénicidad para la fracción α , con un valor medio de TEXB de 1,97 Eeq pM/g placenta, que se corresponde con 12,34 Eeq pM/g lípido. Al expresar los valores en términos de contenido lipídico para poder compararlos con otros estudios que investigan la TEXB en función del contenido graso del tejido, los valores medios encontrados eran similares a los recogidos en estudios de mujeres residentes en la misma área (Rivas *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2004)

Aproximadamente el 71% de las placentas del estudio de Granada fueron positivas en el bioensayo de estrogénicidad para la fracción α , con un valor medio de TEXB de 3,84 Eeq pM/g placenta que corresponde a 177,07 Eeq pM/g lípido.

La estrogénicidad del extracto α , que contiene xenoestrógenos halogenados y corresponde a los primeros 11 minutos del eluido de HPLC (Fernández *et al.*, 2004), es considerado un marcador de la TEXB debido al

efecto combinado de los estrógenos medioambientales (Ibarluzea *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004). Esta aproximación metodológica responde a la necesidad de considerar la exposición simultánea a diferentes compuestos xenobióticos a los que están sometidas las madres. Se han propuesto diferentes metodologías para establecer las interacciones de los xenoestrógenos que derivan de posibles efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos (Soto *et al.*, 1997; Shekhar *et al.*, 1997; Payne *et al.*, 2000; Rajapakse *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002). La carga estrogénica de la fracción alfa estimada de acuerdo al presente protocolo, representa el efecto combinado de compuestos químicos presentes en diferentes concentraciones, algunas veces bajo los niveles límite de efecto proliferativo (Fernández *et al.*, 2004). Hay que tener presente que pueden confluír mecanismos aditivos, sinérgicos o antagónicos, que debemos tener en cuenta a la hora de valorar el efecto final observado en el bioensayo. Esta aproximación ofrece una oportunidad de investigar la exposición a xenoestrógenos y puede ser más apropiada que la determinación de compuestos individuales en muestras de placenta.

En el estudio de Madrid, según el test de correlación de Spearman, los niveles de carga estrogénica total efectiva (TEXB) de la fracción alfa y beta no estaban significativamente relacionados con la edad de las madres. Al realizar la tabla de contingencia, tampoco existía una asociación estadísticamente significativa entre presencia de TEXB (valor por encima del LC) o no presencia (valor por debajo del LC) de estrogénicidad, de la fracción alfa o beta y la edad de la madre. Aunque sí se observó, en el grupo de mujeres con un valor medible de TEXB tanto en la fracción alfa como en beta, por encima del LC, el 61,68% tenían una edad ≤ 31 años. Cuando estudiamos si existen diferencias significativas mediante el test de Mann-Whitney, entre los valores de estrogénicidad encontrados en las fracciones alfa y beta de madres con edad >31 años, con respecto a las que tienen una edad ≤ 31 años, no aparecen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las fracciones estudiadas. Se observa que, los valores medios de TEXB de la fracción alfa son mayores en aquellos tejidos placentarios de madres con mayor edad y si n

embargo, los valores más elevados en la fracción beta corresponden a mujeres con menor edad.

Al realizar el test de correlación de Spearman para determinar la relación del IMC con los niveles de TEXB de la fracción alfa y beta, se observó que existía una asociación negativa, estadísticamente significativa, entre los niveles de carga estrogénica total efectiva (TEXB) de la fracción alfa y el IMC de la madre. Según la tabla de contingencia, no se encontró asociación estadística significativa entre la presencia o ausencia de estrogénicidad en la fracción alfa y beta y el IMC, utilizando como punto de corte el valor considerado por la OMS como sobrepeso. El 90,36% de las mujeres de este estudio que poseían un IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$, tenían estrogénicidad en la fracción alfa de su tejido placentario y el 91,56% tenían valores medibles de estrogénicidad en la fracción beta. Al realizar el test de Mann-Whitney, se encontró que existía una asociación estadísticamente significativa entre los valores de estrogénicidad (Eqp M/g placenta) encontrados en la fracción alfa de madres con IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$, con respecto a las que tenían un IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$, siendo los valores medios de TEXB en dicha fracción mayores en madres con IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$.

Cuando se utilizó el test de correlación de Spearman, no apareció una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de TEXB de alfa y beta y el incremento de peso. Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa al realizar la tabla de contingencia, cuando la de peso se dividió en dos categorías ($\leq 10 \text{ Kg}$ y $>10 \text{ Kg}$), y la carga estrogénica en alfa o beta, en función de si ganaron kilos por encima o debajo de ese rango.

La tabla de contingencia para relacionar la presencia/ausencia de estrogénicidad en la fracción alfa y en la beta, con el tipo de municipio donde reside, muestran que no existe asociación estadísticamente significativa. Aunque según el test de Mann-Whitney, al relacionar los niveles de estrogénicidad obtenidos en la fracción alfa y en la beta, con la residencia, no se encontró ninguna asociación significativa, sí se pudo apreciar valores considerablemente superiores de carga estrogénica para las madres que habitaban en la zona urbana.

Según la tabla de contingencia, al relacionar la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y beta con el nivel de estudios, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa, aunque sí se encontró un número mayor de mujeres con positividad de TEXB en la fracción alfa y beta, entre las que tenían estudios medios.

Al relacionar la presencia (\geq LC) o ausencia ($<$ LC) de estrogenicidad, en la fracción alfa y beta, con la actividad laboral mediante una tabla de contingencia no mostró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y la carga estrogénica total efectiva. Tampoco cuando se utilizó el test de Kruskal-Wallis, aunque se pudo observar que los valores medios de la TEXB de la fracción alfa y beta eran mayores entre las mujeres que trabajaban fuera del hogar.

Al enfrentar la variable dicotómica presencia/ausencia de TEXB, a la variable dicotómica percepción de la exposición (sí/no) a productos químicos, (tabla de contingencia), no se encontró asociación estadísticamente significativa. Del total de mujeres que afirmaban estar expuestas a productos químicos, el 88,57% presentaban un valor medible de TEXB tanto en alfa como en beta. Según el test de Mann-Whitney, tampoco apareció ninguna asociación, pero podemos apreciar que los valores medios de carga estrogénica en la fracción beta, son mayores para el grupo de madres que sí asumían percepción de exposición.

Al relacionar la variable paridad con la presencia o ausencia de estrogenicidad (tabla de contingencia), no se encontró asociación estadísticamente significativa, presentando una situación equiparable en niveles de estrogenicidad por encima del LC para ambas fracciones, siendo el porcentaje de madres primíparas ligeramente superior en la fracción beta (54,20% en la fracción alfa y 55,14% en la fracción beta). Si usamos el test de Mann-Whitney para relacionar los niveles de estrogenicidad de las fracciones alfa y beta en el grupo de las madres primíparas y comparar estos valores con el de multíparas, no se encuentra asociación estadística. El nivel medio de estrogenicidad (E_{eq} pM/g placenta) para las madres primíparas, era ligeramente superior tanto en la fracción alfa como en beta.

Al relacionar la variable dicotómica, hábito tabáquico (fuma o no fuma), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Sí se observó que del total de mujeres fumadoras, el 91,04% tenían un valor de TEXB por encima del LC en su tejido placentario, en la fracción alfa y el 88,06% en la fracción beta. Según el test de Mann-Whitney, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y TEXB, para ambas fracciones. Aún así, los niveles medios de TEXB de la fracción alfa y beta, eran mayores en mujeres fumadoras que en no fumadoras.

Al relacionar la variable dicotómica, problemas en el embarazo (sí o no), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta (tabla de contingencia), no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. De todas las mujeres que presentaban un valor de estrogenicidad por encima de LC, tanto en la fracción alfa como en beta, tan sólo el 34,58% presentó problemas durante el embarazo. Según el test de Mann-Whitney, se halló una asociación estadística entre problemas en el embarazo y los niveles de estrogenicidad para la fracción beta (Eeq pM /g lípido), siendo en general los valores medios de carga estrogénica superiores en las madres que no presentaron problemas en el embarazo.

Al relacionar la variable dicotómica, presencia de empastes (sí o no), con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta (tabla de contingencia), no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Si se observó que dentro del grupo de mujeres con empastes, el 89,52% tenían un valor de TEXB por encima del LC en su tejido placentario, en la fracción alfa y en beta. Si utilizamos el test de Mann-Whitney, tampoco se obtuvo ninguna asociación estadística, aunque sí podemos apreciar, que los valores medios de estrogenicidad son superiores en el grupo de mujeres con presencia de empastes.

Según muestra el test de correlación de Spearman, no se encontró asociación estadística entre el peso del niño y carga estrogénica. Según la tabla de contingencia tampoco existía una asociación estadísticamente significativa, sin embargo la mayoría de los niños con un peso ≥ 2500 g, presentaban

estrogenicidad positiva en la fracción alfa (90,20%) y beta (89,21%) de su tejido placentario.

Al enfrentar la variable presencia/ausencia de TEXB, a la variable IP categorizada en los dos grupos ($< 2,5 \text{ g/cm}^3$ y $\geq 2,5 \text{ g/cm}^3$), no se encontró asociación estadística significativa. Al realizar el test de Mann-Whitney tampoco se observó asociación, aunque se pudo apreciar que los valores de carga estrogénica son superiores para los niños con $IP \geq 2,5 \text{ g/cm}^3$, en ambas fracciones.

Según el test de correlación de Spearman, no se encontró relación estadísticamente significativa al relacionar las variables semanas de gestación y la carga estrogénica total efectiva. Tampoco al realizar la tabla de contingencia, aunque se observó que un total de 95 muestras, presentaron un valor medible de estrogenicidad en la fracción alfa y beta. Así, de los niños que presentaban valores positivos de estrogenicidad en la fracción alfa, el 96,84% tenían más de 37 semanas. Para el caso de la fracción beta el porcentaje era ligeramente inferior 95,79%. Al realizar el test de Mann-Whitney, no existía una asociación significativa entre la TEXB y la semana de gestación. Para el caso de alfa, los niveles más elevados de carga estrogénica se encontraron en los tejidos placentarios, de madres que dieron a luz niños con una edad gestacional > 37 semanas. Sin embargo, para el caso de beta los mayores niveles aparecen en los niños con edad gestacionales por debajo de 37 semanas.

Según la tabla de contingencia, al relacionar la carga estrogénica con la variable sexo del niño (varón o hembra), no se encontró asociación estadísticamente significativa. Aunque podemos observar que donde se presentaban valores positivos de estrogenicidad en la fracción alfa, se correspondía con sexo varón (56,84%) y para el caso de la fracción beta el porcentaje era ligeramente superior (57,89%).

En el estudio de Granada, al realizar el test de Spearman se vio que los niveles de carga estrogénica total efectiva de la fracción alfa, están significativamente relacionados con la edad de las madres. Según la tabla de contingencia, existe una asociación estadísticamente significativa entre los valores positivos del biomarcador-TEXB (valor por encima del LC) y los no

positivos (valor por debajo del LC) y la edad de la madre, para la fracción beta, resultando que de todas las madres con un valor medible de TEXB en la fracción beta, un 52,69% tenían una edad >32 años. Cuando estudiamos mediante el test de Mann-Whitney, si existen diferencias significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en las fracciones alfa y beta de madres con edad \leq 32 años, con respecto a las que tienen una edad > 32 años, aparecen diferencias estadísticamente significativas para ambas fracciones, siendo los valores medios de TEXB de la fracción alfa y beta mayores en aquellos tejidos placentarios de madres con mayor edad.

Según el test de correlación de Spearman, no existía una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de carga estrogénica total efectiva de las fracciones alfa y beta y el IMC de la madre antes del embarazo. Lo mismo sucedió con la ganancia de peso, incluso llevándolo a cabo o tras pruebas estadísticas.

Según la tabla de contingencia, cuando relacionamos la presencia/ausencia de estrogenicidad en la fracción alfa y beta con el lugar de residencia, se observa que no existe asociación estadísticamente significativa, aunque para la fracción beta, la asociación tiende a la significación. Si hacemos la prueba de Mann-Whitney aunque no apareció asociación estadística, si se observó que los niveles medios de TEXB en ambas fracciones, eran más elevados en los tejidos placentarios de las que mujeres que residían en una zona urbana.

Según la tabla de contingencia, al relacionar la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y beta con el nivel de estudios, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa. Aunque si se vio, que era mayor el número de mujeres con TEXB en la fracción alfa entre las que no tenían estudios o estudios primarios. Al utilizar el test de Kruskal-Wallis, se encontró una tendencia hacia la asociación estadística entre TEXB de la fracción beta (Eq pM /g lípido) y el nivel de estudios, apareciendo niveles medios más elevados en el tejido placentario de mujeres con estudios medios.

Al relacionar la presencia (\geq LD) o ausencia ($<$ LD) de estrogenicidad en la fracción alfa y beta con la actividad laboral (tabla de contingencia), se encontró

una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y la carga estrogénica total efectiva de la fracción beta. No apareció asociación estadística entre el tipo de trabajo desarrollado por la mujer y los niveles de TEXB de su tejido placentario, cuando se aplicó el test de Kruskal-Wallis. Aún así, la TEXB de la fracción alfa (Eq pM/g placenta) era prácticamente igual entre mujeres que trabajaban en el hogar y en la agricultura y menor para el grupo que realizaban otros tipos de trabajo.

Al enfrentar la variable dicotómica presencia/ausencia de TEXB, a la variable dicotómica percepción de la exposición (sí/no) a productos químicos (tabla de contingencia), no se observó ninguna relación estadística entre ambas variables. Aún así, se pudo apreciar que del total de mujeres que afirmaban estar expuestas a productos químicos, un 71,43% presentaban un valor medible de TEXB en alfa y un 88,57% en beta. Según el test de Mann-Whitney, no se halló ninguna asociación estadísticamente significativa entre TEXB de la fracción alfa o beta y la percepción de la exposición a productos químicos, pero podemos destacar que el valor medio de la fracción alfa era mayor, entre las mujeres que afirmaron estar expuestas.

Al relacionar la variable paridad con la presencia o ausencia de estrogénicidad, la fracción alfa poseía casi una asociación estadísticamente significativa con la paridad de las madres, presentándose en la fracción alfa una mayor frecuencia de estrogénicidad en madres que eran multíparas (un 57,34% del total de mujeres con un valor de TEXB por encima del LD). Para el caso de la fracción beta, sí encontramos una asociación estadísticamente significativa, apareciendo un mayor número de madres que tenían una estrogénicidad positiva en la fracción beta, en el grupo de las multíparas (56,37%). Si usamos el test de Mann-Whitney, vemos que para la fracción alfa la asociación era significativa, y tendía a la significación estadística en beta (ng/g lípido), siendo los niveles medios de estrogénicidad para las madres multíparas, mayores que para las primíparas en ambas fracciones.

Al aplicar el test de correlación de Spearman, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa y el número de hijos, siendo esta mayor cuanto más hijos hubiera tenido la madre.

Al relacionar el hábito tabáquico con la presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Sin embargo, si se observó que del total de mujeres fumadoras, el 71,76% y el 85,88% tenían un valor de TEXB por encima del LD, en la fracción alfa y beta respectivamente. Cuando utilizamos el test de Mann-Whitney, no aparecía tampoco asociación estadística, pero se observó que los niveles medios de TEXB de la fracción alfa, eran mayores entre las mujeres fumadoras al compararlas con las no fumadoras.

Al relacionar problemas en el embarazo (si o no), con la variable presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta (tabla de contingencia), no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. De todas las mujeres que presentaban un valor de estrogenicidad por encima de LD en la fracción alfa, un 63,23% presentó problemas durante el embarazo, siendo el porcentaje para la fracción beta algo inferior (61,02%). Con el test de Mann-Whitney tampoco se observó significación estadística, pero se vio que el valor medio de carga estrogénica de la fracción alfa, era superior en las madres que no presentaron problemas en el embarazo y sin embargo, era menor en la fracción beta, para este mismo grupo de mujeres.

Cuando utilizamos el test de correlación de Spearman, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la carga estrogénica de la fracción alfa y beta y la variable peso del niño. Pero al realizar la tabla de contingencia, si apareció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y el peso del niño. El 72,66% de los niños con un peso ≥ 2.500 gramos, presentaban estrogenicidad positiva en la fracción alfa. Con el test de Mann-Whitney, también había asociación estadística, presentando valores medios de TEXB muy superiores, los niños con un peso ≥ 2.500 g.

Al realizar el test de correlación de Spearman, no apareció asociación estadística significativa entre la carga estrogénica, de la fracción alfa y beta y el índice ponderal del niño. Sin embargo, al realizar la tabla de contingencia, apareció una asociación estadísticamente significativa. El 62,13% de las madres con un nivel detectable de TEXB en la fracción beta de su tejido placentario,

tuvieron niños con un $IP \geq 2,5 \text{ g/cm}^3$. Aunque para el caso de la fracción alfa no existía tal asociación, aún así, el número de madres con valores más altos de TEXB en alfa, tuvo niños con un índice ponderal $a \geq 2,5 \text{ g/cm}^3$. Al aplicar el test de Mann-Whitney, se dio una situación similar a la anteriormente descrita.

Al aplicar el test de correlación de Spearman, para relacionar las semanas de gestación con la TEXB de la fracción alfa y beta, no se observó relación significativa en ninguno de los casos. Al utilizar la tabla de contingencia, sí se halló una tendencia hacia una asociación significativa entre la presencia de estrogenicidad de la fracción beta y las semanas de gestación. Con la tabla de contingencia, se halló una tendencia hacia una asociación significativa entre la presencia de estrogenicidad de la fracción beta y las semanas de gestación. De todas las muestras que presentaron un valor medible de estrogenicidad en la fracción beta, el 54,66% eran muestras de niños con una edad gestacional superior a las 39 semanas. Al aplicar el test de Kruskal-Wallis, no apareció asociación estadística aún así, nos encontramos en la fracción alfa con unos niveles medios de carga estrogénica ($E_{eq} \text{ pM/g placenta}$) más elevados, en los tejidos placentarios de las madres que dieron a luz niños con una edad gestacional entre 32-37 semanas y entre >37-39 semanas para beta.

Al realizar los análisis de regresión logística para ambas poblaciones, se observó que los valores medios de TEXB alfa ($E_{eq} \text{ pM/ml}$), categorizados por el valor de la mediana, se relacionaron de manera estadísticamente significativa con las siguientes variables: la edad de la madre, el tipo de parto y la población de estudio, presentando las mujeres de Madrid un mayor riesgo de tener concentraciones más elevadas de carga estrogénica que las de Granada. También se observó una tendencia a la significación estadística para la variable peso del niño, categorizado en $\geq 2500 \text{ g}$ y $< 2500 \text{ g}$.

En los resultados del análisis de regresión lineal se observa una relación estadísticamente significativa entre la TEXB alfa ($E_{eq} \text{ pM/g plac.}$) y las variables peso del niño y la población. Siendo los niños con mayor peso los que presentan un mayor riesgo de concentración elevada de TEXB alfa, que los que tienen un peso $< 2500 \text{ g}$. También podemos observar una tendencia a la significación estadística para las variables edad de la madre y tipo de parto.

Cuando realizamos el análisis de regresión logística, estratificándolo por sexo, en los varones se presenta una significación estadística entre la TEXB alfa (Eq p M/ml) y las variables: edad madre, población y tipo de parto. Por otra parte, se observa una tendencia positiva al relacionarla con la variable peso del niño.

Al llevar a cabo el análisis de regresión lineal, estratificado por sexo, observamos que entre los varones se encontró una relación significativa entre la TEXB alfa (Eq p M /g pl acenta), y las variables peso niño y cohorte de nacimiento, y una asociación con tendencia a la significación estadística con las variables edad de la madre y el tipo de parto, siendo para esta última negativa.

En el análisis de regresión lineal por terciles, los resultados muestran que en el primer tercil aparecen relaciones estadísticamente significativas entre la TEXB alfa (Eq p M/g pl acenta) y las variables población e IMC y una asociación positiva con la variable edad de la madre. Para el segundo tercil la relación significativa se estableció entre las variables población y tipo de parto. Por último, en el tercer tercil sólo observamos una asociación estadísticamente significativa, con la variable población.

Los estrógenos endógenos naturales junto con los fitoestrógenos y xenoestrógenos no halogenados eluyen en las fracciones cromatográficas colectadas desde el minuto 13 hasta el minuto 32. La estrogenicidad del conjunto de fracciones es referida en este trabajo como TEXB de la fracción beta.

Los resultados del análisis de regresión lineal para la fracción beta, mostraron una relación estadísticamente significativa entre la TEXB beta (Eq p M/g pl acenta) y la variable estudios, estando esta categorizada en estudios medios/superiores y sin estudios/primaria, siendo las madres con más estudios las que presentan mayor riesgo de tener concentraciones de TEXB más elevadas. Se halló una asociación negativa y con significación estadística con la variable talla del niño. Asimismo, se observó asociación positiva con la variable población.

En el análisis de regresión logística de la TEXB beta (Eq p M/ml) se observó, que había una relación estadísticamente significativa con las variables

paridad y población y una tendencia a la significación con la variable estudios, categorizada.

Al llevar a cabo el análisis de regresión lineal para estudiar la contribución de algunas variables a los valores de TEXB beta, se observó que de todas las variables analizadas, tan sólo la variable estudios (categorizada en estudios medios/superiores y sin estudios/primaria) presentaba una relación positiva con la TEXB beta (Eeq pM/ g placenta), con una significación $p=0,065$. También se realizó este análisis de regresión lineal para estudiar la contribución de otra serie de variables y en este caso, las variables población y estudios, presentaban una asociación estadísticamente significativa, aunque para la variable población con relación negativa. También se observó una relación con tendencia a la asociación estadística negativa con la variable paridad.

En el análisis de regresión logística de la TEXB beta (Eeq pM/ml), observamos que hay relación estadísticamente significativa con las variables paridad y población y una tendencia a la significación con la variable estudios, categorizados.

Si realizamos el análisis de regresión lineal por terciles, observamos que hay una fuerte relación con la variable población. Así, en el primer tercil aparece una relación estadísticamente significativa entre la TEXB beta (Eeq pM/ g placenta) y la variable población. Para el segundo tercil la relación significativa se estableció entre la TEXB beta y la variable edad, apareciendo también una asociación negativa con tendencia a la significación, con la variable población y el tercer tercil, también observamos una asociación negativa estadísticamente significativa con dicha variable.

La placenta, juega un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo del feto ya que desarrolla multitud de funciones. Es un órgano nutritivo, responsable del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono, juega un papel fundamental en la eliminación de ciertos compuestos de desecho del feto y actúa como órgano endocrino, al producir varias hormonas esteroideas (lactógeno placentario, estrógenos y progesterona) y hormonas polipéptidas (gonadotropina coriónica etc.), importantes durante el embarazo (Ganapathy & Prasad, 2005). Por esta razón, no es de extrañar que aparezcan asociaciones entre los niveles de TEXB

beta, fracción que contiene los estrógenos naturales junto con los fitoestrógenos y otras sustancias químicas sintéticas no halogenadas y las características antropométricas del niño.

De este modo, se hallaron asociaciones estadísticas positivas en los niños de Granada entre los niveles de TEXB de la fracción beta y el índice ponderal. Presentando mayores niveles de TEXB los niños con mayor IP y tendencias a dicha asociación positiva entre los niveles de TEXB de la fracción beta y el perímetro cefálico y la edad gestacional, encontrando en ambas casos unos niveles mayores entre niños con mayor perímetro y más edad gestacional. Hallazgos que vienen a apoyar nuestra hipótesis que liga estrogénicidad a desarrollo y crecimiento fetal.

Finalmente es necesario recordar que los valores de la TEXB de fracción alfa, expresados en Eeq (pM)/mL, Eeq (pM)/g placenta, y Eeq (pM)/g lípido, se asociaron significativamente con los valores de TEXB en la fracción beta expresados en las mismas unidades, indicando una dependencia entre ambas fracciones que merece un estudio más profundo. De hecho, ambas fracciones son dependientes de la exposición a contaminantes químicos ambientales. Pero, mientras que la fracción cromatográfica alfa está exenta de estrógenos endógenos, la beta contiene las hormonas endógenas esteroideas habituales en el tejido de procedencia. El hecho de que haya una correlación estrecha entre ambas fracciones, no se interpreta como el resultado de la contaminación por estrógenos endógenos, si no por una idéntica probabilidad de exposición ambiental para xenoestrógenos no lipofílicos y polares en el mismo individuo.

Las investigaciones llevadas a cabo sobre la exposición medioambiental durante el desarrollo fetal e infancia sugieren que los biomarcadores biológicos pueden proporcionar instrumentos de gran utilidad para cuantificar la exposición medioambiental y ayudar a la evaluación de la variabilidad inter-individual (Whyatt & Perera, 1995). La necesidad específica de biomarcadores de la función de la placenta ha sido recientemente señalada (Myllynen *et al.*, 2005). Nuestra propuesta del empleo del E-Screen para medir la estrogénicidad de la placenta como un biomarcador de exposición, parece ser una estrategia razonable para valorar la exposición materna a xenoestrógenos y estimar la

exposición del feto, opción más práctica que la determinación individualizada del residuo de unos pocos compuestos.

6. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados presentados en este trabajo, junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a la exposición humana a compuestos tóxicos persistentes y sus posibles implicaciones en la salud, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. La exposición materno-infantil de la población de estudio a compuestos químicos contaminantes ambientales es importante tanto cuantitativa como cualitativamente. El número medio de pesticidas por placenta es de 7.61 ± 2.95 residuos de un total de 17 compuestos estudiados. Ordenados por frecuencia de mayor a menor, se distribuyen de la siguiente manera: p,p'DDE > lindano > endosulfán-diol > endosulfán-I > o,p'DDT > endosulfán-sulfato > endosulfán-éter > o,p'DDD > p,p'DDT > HCB > endosulfán-lactona > endrín > endosulfán-II > metoxicloro > aldrín > mirex > dieldrín.

2. Los pesticidas analizados pertenecen a muy diferentes grupos químicos, pero comparten su carácter bioacumulable y lipofílico. Los que se

encuentran en más del 50% de las placentas estudiadas, ordenados de mayor a menor en función de su abundancia y teniendo en cuenta su tendencia a acumularse, se distribuyen de la siguiente forma: endosulfán-diol (4.15 ± 5.02 ng/g placenta ó 156.73 ± 298.77 ng/g lípido), p, p'DDE (2.79 ± 3.77 ng/g placenta ó 92.29 ± 155.76 ng/g lípido), endosulfán-sulfato (0.83 ± 2.25 ng/g placenta ó 28.39 ± 70.01 ng/g lípido), endosulfán-I (0.59 ± 1.28 ng/g placenta ó 19.87 ± 50.07 ng/g lípido), o, p'DDT (0.54 ± 0.84 ng/g placenta ó 13.28 ± 34.08 ng/g lípido), lindano (0.39 ± 0.51 ng/g placenta ó 12.28 ± 31.87 ng/g lípido) y endosulfán-éter (0.17 ± 0.41 ng/g placenta ó 6.83 ± 23.34 ng/g lípido).

3. La estimación de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) que expresa de forma cuantitativa, en unidades de equivalentes de estradiol (Eeq), la estrogénicidad del extracto placentario, ha permitido determinar que en un 71.4% y en un 84.7% de las fracciones cromatográficas alfa y beta, respectivamente, existen contaminantes químicos capaces de dar un efecto hormonal equivalente a 3.84 ± 9.73 EeqM/g placenta (177.07 ± 398.60 EeqM/g lípido) y 22.82 ± 64.48 EeqM/g placenta (1190.97 ± 2603.31 EeqM/g lípido), respectivamente. Actividad estrogénica que puede interferir tanto sobre la propia función endocrina de la placenta como sobre la homeostasis hormonal del feto.

4. Factores asociados con la mayor presencia y/o abundancia de pesticidas organoclorados en la placenta han resultado ser en lo que se refiere a la madre, su mayor edad (p,p'DDT), mayor índice de masa corporal (p,p'DDE, Σ Endosulfanes y lindano), menor ganancia de peso durante el embarazo (p,p'DDE, endrín, Σ DDTs y lindano), menor nivel educativo (p,p'DDE y metoxicloro), mayor exposición laboral (número de pesticidas, Σ Endosulfanes, y lindano), primiparidad (Σ DDTs) y hábito tabáquico (p,p'DDE, Σ Endosulfanes y metoxicloro). En lo referente al padre, una mayor exposición, el trabajo manual (p,p'DDE y lindano) y menor nivel educativo (número de pesticidas, lindano y HCB).

5. Factores asociados con la mayor presencia y/o abundancia de pesticidas organoclorados en la placenta han resultado ser en lo que se refiere a las características del embarazo, parto y recién nacido, el peso normal a las semanas de gestación (o,p´DDT, p,p´DDT y dieldrín), el mayor peso del niño (lindano) o menor peso del niño (p,p´DDE y Σ endosulfanes) y el menor índice ponderal (Σ endosulfanes).

6. El efecto estrogénico del extracto tisular placentario (TEXB) también se ha asociado con ciertas características de los padres, características del parto y recién nacidos, de tal manera que mayor TEXB de alfa se observa en placentas de madres mayores y múltiparas. Pero, al contrario de lo que ocurre para el pesticida más frecuente y uno de los más abundantes (p,p´DDE), TEXB alfa se asocia con mayor peso del recién nacido y peso normal para la edad gestacional, coincidente con lo observado para pesticidas agonistas estrogénicos. Esto sugiere un papel de la estrogénicidad del conjunto de xenoestrógenos acumulados en el desarrollo embrionario-fetal.

Las consecuencias sobre el desarrollo del niño de la exposición a pesticidas organoclorados disruptores endocrinos estrogénicos y antiandrogénicos, no son bien conocidos, pero dado que la exposición placentaria ocurre en momentos críticos del desarrollo embrionario y fetal, se pueden prever efectos importantes sobre el recién nacido.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adami, H.O., Bergstrom, R., Mohner, M., Zatonski, W., Storm, H., Ekbom, A., Tretli, S., Teppo, L., Ziegler, H., Rahu, M. (1994). Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 59(1):33-38.

Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect* 103:103-112.

Adlercreutz, H., Mazur, W. (1997). Phyt-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.*, 29:95-120.

Aho, M., Koivisto, A.M., Tammela, T.L., Auvinen, A. (2000). Is the incidence of hypospadias increasing? Analysis of Finnish hospital discharge data 1970-1994. *Environ Health Perspect* 108(5):463-5.

Aho, M., Koivisto, A.M., Tammela, T.L., Auvinen, A. (2003). Geographical differences in the prevalence of hypospadias in Finland. *Environ Res* 92(2):118-23.

Akre, O., Lipworth, L., Cnattingius, S., Sparen, P., Ekbom, A. (1999). Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 10(4):364-369.

Allen, E., Doisy, E.A. (1923). An ovarian hormone: preliminary report on its localizations, extraction and partial purification, and action in test animals. *J Am Med Assoc*, 81:819-825.

Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le, G.R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (1999). Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect*, 107(Suppl 1): 89-108.

Aragones, N., Pérez-Gómez, B., Astray, J., Gil, E., Pérez-Meixeira, A.M., de Paz, C., Iriso, A., Cisneros, M., de Santos, A., Arias, P., Sanz, J.C., Asensio, Á., Fernández, M.A., González, M.J., de León, A., García-Sagredo, J.M., Pollán, M., López-Abente, G., Frutos-García, J., Martínez, M. (2008). Biomonitoring of exposure to environmental pollutants in newborns and their parents in Madrid, Spain (BioMadrid): study design and field work results. *Gac Sanit*, 22 (5): 483-491.

Armstrong, B., Doll, R. (1975). Environmental factors and breast cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*, 15:617-631.

Aschim, E.L., Haugen, T.B., Tretli, S., Daltveit, A.K., Grotmol, T. (2004). Risk factors for hypospadias in Norwegian boys. Association with testicular dysgenesis syndrome? *Int J Androl*, 27(4):213-221.

Ashford, N., Miller, C.S. (1998). Low-Level Chemical Exposures: A Challenge for Science and Policy. *Environ Sci Tech*, 32:508-509 A.

Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl J Med*, 332(5):281-285.

Baillie-Hamilton, P.F. (2002). Chemical toxins: A hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J. Alt. & Comp. Med.*, 8: 185-192.

Beard, A.P., Bartlewski, P.M., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C. (1999). Reproductive and endocrine function in rams exposed to the organochlorine pesticides lindane and pentachlorophenol from conception. *J Reprod Fertil* 115(2):303-314.

Berger, M.J., Alper, M.M. (1986). Intratable primary infertility in women exposed to diethylstilbestrol in utero. *J Reprod Med* 31:231-235.

Berkowitz, G.S., Lapinski, R.H., Godbold, J.H., Dolgin, S.E., Holzman, I.R. (1995). Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Epidemiology* 6(2):127-131.

- Bhatia, R., Shiao, R., Petreas, M., Weintraub, J.M., Farhang, L. Eskenazi, B. (2005). Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ Health Perspect* 113(2):220-224.
- Blázquez, M., Bosma, P.T., Fraser, E.J., Van Look, K.J.W., Trudeau, V.L. (1988). Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C* 119:345-364.
- Blundell, T. (2003). Chemicals in products safeguarding the environment and human. Health twenty-fourth Report. London: Royal Commission on environmental pollution. Informe N° Cm 5827. pp. 1-307.
- Boisen, K.A., Kaleva, M., Main, K.M., Virtanen, H.E., Haavisto, A.M., Schmidt, I.M., Chellakooty, M., Damgaard, I.N., Mau, C., Reunanen, M., Skakkebaek, N.E., Topparim J. (2004). Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 363(9417):1264-1269.
- Botto, L.D., Moore, C.A., Khoury, M.J., Erickson, J.D. (1999). Neural-tube defects. *New Engl J Med* 341(20):1509-1519.
- Brotons, J.M. (1994). Análisis químico y biológico (E-Screen) de contaminantes con actividad estrogénica. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Campbell, D.M., Webb, J.A., Hargreave, T.B. (1987). Cryptorchidism in Scotland. *Br Med J (Clin.Res.Ed)*, 295(6608):1235-1236.
- Capen, C.C. (1992). Pathophysiology of chemical injury of the thyroid gland. *Toxicol Lett* 64/65:381-388
- Capilla, J.A. (1979). Estudio bioquímico del glucógeno y lípidos hepáticos, en el desarrollo embrionario y postnatal del *allus domesticus*. Acción del ACTH. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J*, 305(6854):609-613.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ Health Perspect* 103: 137-139.
- Carlson, B. (1999). Human embryology and developmental biology. C.V. Mosby; 3rd edition.
- Carmichael, S.L., Shaw, G.M., Nelson, V., Selvin, S., Torfs, C.P., Curry, C.J. (2003). Hypospadias in California: trends and descriptive epidemiology. *Epidemiology* 14(6): 701-706.

Carson, R. (1962). *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin. ISBN 0-618-24906-0.

CEC (Commission of the European Communities). (2004). Commission staff working document on implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters. Bruselas: 1999. Segundo Informe sobre la estrategia comunitaria sobre disruptores endocrinos (SEC 1372). pp.1-55

CEPA (Canadian Environmental Protection Act). (1993). Priority Substances List Assessment. Report: Pentachlorobenzene. Government of Canada .

CEPA (Canadian Environmental Protection Act (2002). Follow-up report on five PSL1 substances for which there was insufficient information to conclude whether the substances constitute a danger to the environment. Government of Canada.

Chen, J., Chang, S., Duncan, S.A., Okano, H.J., Fishell, G., Aderem, A. (1996). Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(13):6275-6279.

Chilvers, C., Pike, M.C., Forman, D., Fogelman, K., Wadsworth, M.E. (1984). Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81. *Lancet* 2(8398):330-332.

Colborn, T., Clement, C., eds. (1992). *Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Princeton: Princeton Scientific Publishing.

Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101(5): 378-384.

Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P. (1996). *Our Stolen Future*. New York: Penguin Books.

Colton, T., Greenberg, E.R., Noller, K., Resseguie, L., Van Bennekom, C., Heeren, T., Zhang, Y. (1993). Breast cancer in mothers prescribed diethylstilbestrol in pregnancy. Further follow-up. *JAMA* 269(16): 2096-2100.

Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (2001). Disponible en: <http://chm.pops.int/default.aspx>

Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke, P.S., Mee, S., Bigsby, R.M., Higgins, S.J., Sugimura, Y. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Rev* 8:338-362.

Darvill, T., Lonky, E., Reihman, J., Stewart, P., Pagano, J. (2000). Prenatal exposure to PCBs and infant performance on the fagan test of infant intelligence. *Neurotoxicology* 21(6):1029-1038.

Day, N.L., Richardson, G., Robles Day, N.L., Richardson, G., Robles, N., Sambamoorthi, U., Taylor, P., Scher, M., Stoffer, D., Jasperse, D., Cornelius, M. (1990). Effect of prenatal alcohol exposure on growth and morphology of offspring at 8 months of age. *Pediatrics*, 85(5):748-752.

Dees, C., Foster, F.S., Ahamed, S., Wimalasena, J. (1997). Dietary estrogens stimulate human breast cancer cells to enter the cell cycle. *Environ Health Perspect* 105:633-636.

Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8:385-398.

Depue, R.H. (1984). Maternal and gestational factors affecting the risk of cryptorchidism and inguinal hernia. *Int. J. Epidemiol.*, 13(3):311-318.

Dixon, A.R., Jackson, L., Robertson, J.F.R., Nicholson, R.I., Blamey, R.W. (1991). Combined goserelin and tamoxifen in premenopausal advanced breast cancer: duration of response and survival. *Eur. J. Cancer*, 27:806-807.

Dodds, E .C., Lawson, W. (1936). Synthetic Estrogenic Agents without the phenanthrene nucleus?. *Nature* 13:996-1004.

Dolk,H. (1998). Rise in prevalence of hypospadias. *Lancet*, 351(9105): 770.
Dolk,H., Vrijheid, M. (2003) The impact of environmental pollution on congenital anomalies.*Br Med Bull* 68:25-45.

Dolk. H., Vrijheid, M., Armstrong, B., Abramsky, L., Bianchi, F., Game, E., Nelen, V., Robert, E., Scott, J.E., Stone, D., Tenconi, R. (1998). Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *Lancet* 352(9126):423-427.,

EPA. Environmental Protection Agency. (2001). Endocrine Disruptor Screening Program, Disponible en: <http://oaspub.epa.gov/oscpmont/oscpendo>

Estrogens in the environment I (1979). En: McLachlan, J., ed. *Developments in Toxicology and Environmental Sciences. Conference proceedings.* New York:Elsevier.

Estrogens in the Environment II (1985). En: McLachlan, J., ed. *Influences on development. Proceedings of symposia.* New York: Elsevier.

Estrogens in the environment III (1995). Global health implications. *Environ Health Perspect.* 103 (suppl7):3-178.

European Workshop on Impact of endocrine disruptors on human health and wildlife (1996). Weybridge: European Commission.

European Workshop on Endocrine Disrupters(2001). Aronsborg, Sweden. European Commission,.

Fernández Alba, A.R., Aguera, A., Contretas, M., Penuela, G., Ferrer, I., Barcelo, D. (1998). Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters. *J Chromatography* 823: 35-47.

Fernández, M.F., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Cerrillo, I., Molina-Molina, J.M., Araque, P., Martínez-Vidal, J.L., Olea, N. (2004). Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal Bioanal Chem* 379(1): 163-170.

Fernández, M.F., Olmos, B., Granada, A., López-Espinosa, M.J., Molina-Molina, J.M., Fernandez, J.M., Cruz, M., Olea-Serrano, F., Olea, N. (2007). Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 115, Suppl 1:8-14.

Ferro-Luzzi, A., Branca F. (1995) Mediterranean diet, Italian-style: prototype of a healthy diet. *Am J Clin Nutr* 61:1338S-1345S

Fox, J.E., Starcevic, M., Jones, P.E., Burow, M.E., McLachlan, J.A. (2004). Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 112 (6):672-677.

Garcia, A.M., Fletcher, T., Benavides, F.G., Orts, E. (1999). Parental agricultural work and selected congenital malformations. *Am J Epidemiol* 149(1):64-74.

Garcia-Rodriguez, J., Garcia-Martin, M., Nogueras-Ocana, M., de Dios Luna-del-Castillo, Espigares, G.M. Olea, N., Iardelli-Claret, P. (1996). Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 104(10): 1090-1095.

Garry, V.F., Schreinemachers, D., Harkins, M.E., Griffith, J. (1996). Pesticide applicators, biocides, and birth defects in rural Minnesota. *Environ Health Perspect* 104(4): 394-399.

Gerhard, I., Daniel, V., Link, S., Monga, B., Runnebaum, B. (1998). Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. *Environ Health Perspect* 106(10): 675-681.

Giwercman, A., Carlsen, E., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1993). Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 2:65-71

Gladen, B.C., Rogan, W.J., Hardy, P., Thullen, J., Tingelstad, J., Tully, M. (1988). Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. *J Pediatr* 113(6):991-995.

Gladen, B.C., Ragan, N.B., Rogan, W.J. (2000). Pubertal growth and development and prenatal and lactational exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene. *J Pediatr* 136(4):490-496.

Goodbred, S.L., Gilliom, R.J., Gross, T.S., Denslow, N.P., Bryant, W.L., Schoeb, T.R. (1997). Reconnaissance of 17 β -estradiol, 11- ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United States streams: potential for contaminant induced endocrine disruption. Sacramento: U. S. Geological Survey Open-File, Report nr 96-627. pp. 1-47.

Grady, K.E., Lemkau, J.P., McVay, J.M., Reisine, S.T. (1992). The importance of physician encouragement in breast cancer screening of older women. *Prev Med* 21(6):766-780.

Greenberg, E.R, Barnes, A.B., Resseguie, L., Barrett, J.A., Burnside, S., Lanza, L.L., Neff, R.K., Stevens, M., Young, R.H., Colton, T. (1984). Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N Engl J Med*. 311(22):1393-1398.

Harada, M. (1976). Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Bull Institute Constitutional Med (Kumamoto University)*, 25:26-74.

Harry, G.J. (1994). Introduction to Developmental Neurotoxicology. In: Harry GJ ed. *Developmental Neurotoxicology* pp. 1-7. Boca Raton: CRC Press

Heindel, J.J. (2003). Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol Sci* 76: 247-249.

Hens L. (2001). Risk assessment of endocrine disruptors. In: Nicolopoulou-Stamati P, Hens L, Howard CV, editors. *Endocrine disruptors: environmental health and policies*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 171-207

Herbst, A.L., Bern, H.A. (1988). *Developmental effects of diethylstilbestrol (DES) in Pregnancy*. New York: Thieme-Stratton.

Herrera, E. (1993). *Elementos de Bioquímica*. Editorial Interamericana. Mexico: McGraw Hill Interamericana.

Hertz, R. (1985). The estrogen problem-retrospect and prospect. En: McLachlan JA, ed. *Estrogen in the environment I Influences on development*. Elsevier/Horth Holland, New York. 1-11.

Horwitz, K.B., Koseki, Y., McGuire, W.L. (1978). Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 103: 1742-1751.

Husmann, D.A., Levy, J.B. (1995). Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 46(2):267-276.

Huston, J.M., Hasthorpe, S., Heyns, C. (1997). Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 18(2):259-280.

Irgens, A., Krüger, K., Skorve, A.H., Irgens, L.M. (2000). Birth defects and paternal occupational exposure. Hypotheses tested in a record linkage based dataset. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79(6):465-470.

ISTAS (Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud de España). (2002). Curso de Introducción a los disruptores endocrinos. Madrid: Instituto Sindical de Trabajo Ambiente y Salud de España; pp. 1-33.

Katz, V.L. (2007). Spontaneous and recurrent abortion: etiology, diagnosis, treatment. En: Katz, V.L., Lentz, G.M., Lobo, R.A., Gershenson, D.M., eds. *Comprehensive Gynecology*. 5th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier.

Kendall, R.J., Brouwer, A., Giesy, J.P. (1998). A risk-based field and laboratory approach to assess endocrine disruption in wildlife. En: Kendall R., R. Dickerson, J. Giesy, W. Suk, editors. *Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife*. Pensacola: SETAC Press.

Kime, D.E., Nash, J.P., Scott, A.P. (1999). Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177:345-352.

King, R.J.B. (1997). Endometrial cancer: an introduction. In *Biology of Female Cancers*, Eds SP Langdon, WR Miller & A Berchuck. New York: CRC Press, pp 183-192.

Koifman, S., Koifman, R.J., Meyer, A. (2002). Alteraciones en el sistema reproductivo humano y exposición a pesticidas en Brasil. *Cad Saúde Pública* 18(2):435-445.

Korrick, S.A., Chen, C., Damokosh, A.I., Ni, J., Liu, X., Cho, S.I., Altshul, L., Ryan, L., Xu, X. (2001). Association of DDT with spontaneous abortion: a case-control study. *Ann Epidemiol* 11(7):491-496.

Krimsky, S. (2000). *Hormonal Chaos. The Scientific and Social Origins of the Environmental Endocrine Hypothesis*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Kristensen, P., Irgens, L.M., Andersen, A., Bye, A.S., Sundheim, L. (1997). Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology* 8(5): 537-544.

- Krogh, P. (1987). *Mycotoxins in food*. New York: Academic Press Limited.
- La Vecchia, C. (1992). Sex hormones and cardiovascular risk. *Hum Reprod.* 7(2):162-167.
- Leclercq, G.; Heuson, J.C. (1979). Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochem Biophys Acta* 560: 427-455.
- Leclercq, G. (1992). Estrogens, antiestrogens and other estrogen compounds. In: *Antitumor steroids*. Blickenstaff ed. New York: Academic Press INC, pp. 11-64.
- Lee, P.A., Chernausek, S.D., Hokken-Koelega, A.C., Czernichow, P. (2003). International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics*, 111(6 Pt 1): 1253-1261.
- Leoni, V., Fabiani, L., Marinelli, G., Morini, A., Aleandri, V., Pozzi, V., Cappa, F., Barbati, D., Puccetti, G., Tarsitani, G.F. (1986). Spontaneous abortion in relation to the presence of hexachlorobenzene in the Italian environment. *I.A.R.C. Sci Publ* 77:143-146.
- Lippman, M.E., Huff, K.K., Jakesz, R. (1986). Estrogens regulate production of specific growth factors in hormone-dependent human breast cancer. *Ann NY Acad Sci* 464: 11-16.
- Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Zhou, H., Brock, J.W. (2001). Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *Lancet*, 358(9276):110-114.
- Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Zhou, H., Gray, K.A., Needham, L.L., Wilcox, A.J. (2002). Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. *Am J Epidemiol* 155(4):313-322.
- López-Espinosa, M.J. (2006). "Exposición materno-infantil vía placentaria a compuestos químicos medio ambientales con actividad hormonal". Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- López-Espinosa, M.J., Granada, A., Carreño, J., Salvatierra, M., Olea-Serrano, F., Olea, N. (2007). Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta* 28(7):631-638.
- Mäkelä, S., Davis, V.L., Tally, W.C., Korkman, J., Salo, L., Vihko, R., Santti, R., Korach, K.S. (1994). Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells. *Environ Health Perspect* 102: 572-578.

- Mäkelä S, Santti R, Salo L, McLachlan JA (1995). Phytoestrogens are partial estrogen agonist in the adult male mouse. *Environ Health Perspect* 103:123-127.
- Martinetti, M., Maghnie, M., Salvaneschi, L., Di, N.N., Daielli, C., Palladini, G., Cuccia, M. (1992). Immunogenetic and hormonal study of cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 74(1):39-42.
- Martínez-Frias, M.L., Prieto, D., Prieto, L., Bermejo, E., Rodríguez-Pinilla, E., Cuevas, L. (2004). Secular decreasing trend of the frequency of hypospadias among newborn male infants in Spain. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 70(2):75-81.
- Martínez-González, M.A., Holgado, B., Gibney, M., Kearney, J., Martínez, J.A. (2000). Definitions of healthy eating in Spain as compared to other European Member States. *Eur J Epidemiol* 16:557-564.
- McLachlan, J. A. (1993) Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspect* 101 (5):386-387.
- Medina, M.B. Sherman, J.T. (1986). High performance liquid chromatographic separation of anabolic oestrogens and ultraviolet detection of 17 beta-oestradiol, zeranol, diethylstilboestrol or zearalenone in avian muscle tissue extracts. *Food Addit Contam*, 3(3):263-272.
- Miller, W.R. (1997). Aromatase inhibitors and breast cancer. *23(3):171-187.*
- Miller, W.R, Sharpe, R.M. (1998). Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related cancer*, 5(69):96.
- Moline, J.M., Golden, A.L., Bar-Chama, N., Smith, E., Rauch, M.E., Chapin, R.E., Perreault, S.D., Schrader, S.M., Suk, W.A., Landrigan, P.J. (2000). Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environ Health Perspect*, 108(9):803-813.
- Moller, H., Weidner, I.S. (1999). Epidemiology of cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology*, 10(4): 352-354.
- Myllynen, P., Pasanen, M., Pelkonen, O. (2005). Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*, 26(5): 361-371.
- Nelson, C.P., Park, J.M., Wan, J., Bloom, D.A., Dunn, R.L., Wei, J.T. (2005). The increasing incidence of congenital penile anomalies in the United States. *J Urol*, 174(4 Pt 2): 1573-1576.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Pitsos, M.A. (2001). The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. *Human Reproduction Update*, 7(3): 323-330.

Nikov, G.N., Hopkins, N.E., Boue, S., Alworth, W.L.(2000). Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect* 108:867-872.

Norris, J.D., Fan, D., Stallcup, M.R., McDonnell, D.P. (1998). Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology. *J Biol Chem* 273:6679-6688.

Oberdorster, E., Chee, A.O. (2000). Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms (Annual Review). *Environ Toxicol Chem* 20 (1): 23-36.

OECD-Organization for Economic Cooperation and Development. (1997). Appraisal of test methods for sex-hormone-disrupting chemicals. Paris: OECD Environmental Health and Safety Publications, Environment Directorate.

Ohi, G. (1999). Endocrine disrupting chemicals and carcinogenicity. *Gan To Kagaku Ryoho*, 26(3): 263-268.

Okonda`Ahoka, O., Lavaur, E., Le Sech, J., Phu Lich, N., Le Moan, G. (1984). Etude de l'impregnation par les pesticides organo-halogeneus au Zaire. *Ann Fals Exp Chim.*, 77: 531-540.

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

Olea, N. , Fernández, M.F., Aranque, P., Olea-Serrano, F. (2002). Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit.* 16:250-256.

Olea, N., Fernández M.F., Rivas, A. (2000). Evaluación de la disrupción endocrina. En: De la Peña E, Gómez E, editores. *Evaluación toxicológica de los plaguicidas y la sanidad ambiental*. Murcia: Monografía SESA/AET, pp. 89-97.

Olea, N., Molina, M.J., Garcia-Martin, M. (1996). Modern agricultural practices: the human price. In Soto AM, C.Sonnenschein, & Colborn T (Eds.), *Endocrine disruption and reproductive effects in wildlife and humans* pp. 455-474. Amsterdam: The Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers.

Olea, N., Olea-Serrano, F. (1996). Oestrogens and the environment. *Eur J Cancer Prev.*, 5(6): 491-496.

Olea, N., Olea-Serrano, F., Lardelli-Claret, P., Rivas, A., Barba-Navarro, A. (1999). Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol.Ind.Health*, 15(1-2): 151-158.

Olea, N., Pazos, P., Expósito, J. (1987) inadvertent exposure to xenoestrogens. *Eur J Cancer Prev.* 7: Suppl:17-23.

Olea, N., Pazos, P., Fernández, M.F., Rivas, A., Olea-Serrano, M.F., Pedraza V. (1999) Phyto and mycoestrogens (Xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. *Med Biol Environ Int J* 27:55-60.

Olea Serrano, N., Zuluaga Gómez, A. (2001). Exposición infantil a disruptores endocrinos. *An Esp Pediatr* 54 (1):58-62.

Olmos, B. (2005). Exposición medioambiental a xenoestrógenos y riesgo de criptorquidia e hipospadias. Tesis doctoral. Universidad de Granada

Ortega, R.M. (2006). Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutr* 9:1136-1140.

Parent, A.S., Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., Bourguignon, J.P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 24: 668-693.

Plan de acción europeo de medio ambiente y salud 2004-2010 (2004). Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo y al Comité Económico y Social Europeo {SEC(2004) 729} / COM/2004/0416 Vol.I final

Paulozzi, L.J., Erickson, J.D., Jackson, R.J. (1997). Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100 (5):831-834.

Paulozzi, L.J. (1999). International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect*, 107(4): 297-302.

Pazos, P., Olea-Serrano, M.F., Zuluaga, A., Olea, N. (1998). Endocrine Disrupting Chemicals: Xenoestrogens. *Med. Biol. Environ Int. J.* 26:41-47.

Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., Barja, G., Battino, M., Blanco, A., Bonanome, A., Colomer, R., Corella-Piquer, D., Covas, I., Chamorro-Quiros, J., Escrich, E., Gaforio J.J., Garcia Luna, P.P., Hidalgo, L., Kafatos, A., Kris-Etherton, P.M., Lairon, D., Lamuela-Raventos, R., Lopez-Miranda, J., Lopez-Segura, F., Martinez-Gonzalez, M.A., Mata, P., Mataix J., Ordovas, J., Osada, J., Pacheco-Reyes, R., Perucho, M., Pineda-Priego, M., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, M.C., Ruiz-Gutierrez, V., Sanchez-Rovira, P., Solfrizzi, V., Soriguer-Escofet, F., de la Torre-Fornell, R., Trichopoulos, A., Villalba-Montoro, J.M., Villar-Ortiz, J.R., Visioli, F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 35:421-424.

Pew Environmental Health Commission. (1999). *Healthy from the Start: Why America Needs a Better System to Track and Understand Birth Defects and the Environment.* Johns Hopkins School of Public Health.

Pierik, F.H., Burdorf, A., Deddens, J.A., Juttmann, R.E., Weber, R.F. (2004). Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. *Environ Health Perspect* 112(15):1570-1576.

Porta, M., Kogevinas, M., Zumeta, E., Sunyer, J., Ribas-Fitó, N. (2002). Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población española: el rompecabezas sin piezas y la protección de la salud pública. *Gac Sanit* 16 (3):257-266.

Porter, M.P., Faizan, M.K., Grady, R.W., Mueller, B.A. (2005). Hypospadias in Washington State: maternal risk factors and prevalence trends. *Pediatrics*, 115(4):e495-e499.

Prins, G.S., Birch, L., Tang, WY., Ho, S.M. (2007). Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*. 23(3):374-382.

Programa de acción comunitario en el ámbito de la salud pública 2003-2008 (2002). Decisión nº 1786/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de septiembre de 2002 Diario Oficial nº L 271 de 9.10.2002, pp. 1-12.

Programa de acción comunitario en el ámbito de la Salud Pública durante 2008 - 2013 (2007) Decisión Nº 1350/2007/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2007. Diario Oficial nº L 301/3 de 20.11.2007, pp. 1-11.

Raffensperger, C., Tickner, J. (1999). *Protecting Public Health and the Environment: Implementing the Precautionary Principle*, Island Press.

Rajpert-De Meyts, E., Toppari, J., Skakkebaek, N.E. (2000). Testicular tumors with endocrine manifestations. In De Groot, L.J. and Jameson, J.L., eds, *Endocrinology*, 4th ed. Philadelphia: Saunders.

REACH (2006). Reglamento (CE) no 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH),

Restrepo, M., Muñoz, N., Day, N., Parra, J.E., Hernández, C., Blettner, M., Giraldo, A. (1990). Birth defects among children born to a population occupationally exposed to pesticides in Colombia. *Scand J Work Environ Health*, 16(4): 239-246.

Rhainds, M., Levallois, P., Dewailly, E., Ayotte, P. (1999). Lead, mercury, and organochlorine compound levels in cord blood in Quebec, Canada. *Arch Environ Health*, 54(1): 40-47.

Ribas-Fito, N., Sala, M., Cardo, E., Mazon, C., De Muga, M.E., Verdu, A., Marco, E., Grimalt, J.O., Sunyer, J. (2002). Association of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds with anthropometric measures at birth. *Pediatr Res*, 52(2): 163-167.

- Ribas-Fito, N., Cardo, E., Sala, M., Eulalia de, M.M., Mazon, C., Verdu, A., Kogevinas, M., Grimalt, J.O., Sunyer, J. (2003). Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *J Paediatr Child Health*, 34(3): 233-240.
- Riley, M.M., Halliday, J.L., Lumley, J.M. (1998). Congenital malformations in Victoria, Australia, 1983-95: an overview.
- Rivas, A., Fernández, M.F., Cerrillo, I., Ibárruza, J., Oliva-Serrano M.F., Pedraza, V. (2001). Human exposure to endocrine disruptors: standardization of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS*:103:189-201.
- Rosenblatt, K.A., Thomas, D.B., Noonan, E.A. (1992). High-dose and low-dose combined oral contraceptives: protection against epithelial ovarian cancer and the length of the protective effect. *European Journal of Cancer* 28A: 1872-1876.
- Ross, R., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M., Henderson, B. (1986). Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *Journal of the National Cancer Institute* 76:45-48.
- Routledge, E., Sumpter, J. (1996). Estrogenicity activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem*, 15: 241-248.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P. (1998). Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 153:12-19.
- Rueda-Domingo, M., López, N.E., Noguera-Ocana, M., Lardelli-Claret, P., Jimenez-Moleon, J., Zuluaga-Gómez, A. (2001). Risk factors for cryptorchidism. *Gac Sanit* 15(5): 398-405.
- SANCO (1998). Endocrine disrupting chemicals: A challenge for the EU? European Parliament, Public Health and Consumer Protection Series, SANCO 100EN, Estrasburgo, pp 1-39.
- Saxena, M.C., Seth, T.D., Mahajan, P.L. (1980a). Organochlorine pesticides in human placenta and accompanying fluid. *Int J Environ Anal Chem*, 7(3): 245-251.
- SCALE. Environment and health strategy [citado 20 May 2007]. Disponible en: <http://www.euractiv.com/en/environment/environment-health-strategy-scale/article-117480>
- Schade, G., Heinzow, B. (1998). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *Sci Total Environ*, 215(1-2): 31-39.

- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W. (2001). In vitro and in vivo estrogenicity of UV Screens. *Environ Health Perspect* 109:239-244.
- Schmitt, C.J., Dethloff, G. M. (2000). Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. Columbia: U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Information and Technology Report USGS/BRD-2000-0005.. pp.1-81.
- Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P.J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grüters, A., Seidlova-Wuttke, D. Jarry, H., Wuttke, W., Köhrle, J. (2004). Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205: 95-102.
- Schutt, D .A. (1976). The effect of plant oestrogens on animal reproduction. *Endeavor* 35: 110-113.
- Serra-Majem, L., Trichopoulou, A., Ngo de la Cruz, J., Cervera, P., García Alvarez, A., La Vecchia, C., Lemtouni, A., Trichopoulos, D. International Task Force on the Mediterranean Diet. (2004). Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated? *Public Health Nutr* 7:927-929.
- Sever,L.E. (1995). Looking for causes of neural tube defects: where does the environment fit in? *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 6: 165-171.
- Sexto Programa de Acción Comunitario en Materia de Medio Ambiente (2002) Decisión nº 1600/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2002.Diario Oficial nº L 242 de 10/09/2002 pp. 1– 15.
- Sharpe,R.M. (1995). Reproductive biology. Another DDT connection. *Nature* 375(6532): 538-539.
- Sharpe,R.M., Skakkebaek,N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341(8857):1392-1395.
- Shu,X.O. (1995). Maternal smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: Results from a prospective study. *Epidemiology* 6:115-120.
- Shugart, L.R. (1996). Molecular markers to toxic agents. En: Newman CM & Jagoe CH, Editors, *Ecotoxicology. A Hierarchical Treatment*. New York: Lewis Publishers.
- Siddiqui,M.K., Saxena,M.C., Bhargava,A.K., Seth,T.D., Murti,C.R., Kutty,D. (1981). Agrochemicals in the maternal blood, milk, and cord blood: a source of toxicants for prenatés and neonatés. *Environ Res*, 24(1):24-32.

- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A. (2002). Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*, 36(8): 1751-1756.
- Skakkebaek, N.E., Keiding, N. (1994). Changes in semen and the testis. *Br Med J*, 309(6965):1316-1317.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De, M.E., Main, K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, 16(5):972-978.
- Solé, M., Raldua, D., Piferrer, F., Barcelo, D., Porte C. (2003). Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Compar Biochem Physiol* 136: 145–56.
- Sonnenschein, C., Soto, A.M., Fernández, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, M.F., & Ruiz-López, M.D. (1995). Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem*, 41(12 Pt 2): 1888-1895.
- Soto, A.M., Lin, T-M., Justicia, H., Silvia, R.M., Sonnenschein, C. (1992) An «in culture» bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: Colborn, T., Clement, C., eds. *Chemically induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection*. Princeton: Princeton Scientific Publishing, pp. 295-309.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernández, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, 103 (Suppl 7):113-122.
- Soto, A.M., Fernández, M.F., Luizzi, M.F., Oles Karasko, A.S., Sonnenschein, C. (1997). Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect*, 105(Suppl 3):647-654.
- Soule, H.D., Vázquez, D., Albert, S., Brennan, M.J. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51:1400-1413.
- Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D. Jr, Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F., Brooks, S.C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50(18):6075-86.
- Stewart, H.J. (1989). Scottish adjuvant breast cancer trials: results in pre-menopausal patients. *Recent Results Cancer Res* 115:126-131.

- Steingraber, S. (2001). *Having Faith: An Ecologist's Journey to Motherhood*. Cambridge: Perseus Publishing.
- Suzuki, K., Martin, P.M. (1994). Neurotoxicants and the Developing Brain. In: Harry, G.J. ed., *Developmental Neurotoxicology* pp. 9-32. Boca Raton: CRC Press.
- Swerdloff, R.S., Overstreet, J.W., Sokol, R.Z., Rajfer, J. (1985). UCLA conference. Infertility in the male. *Ann Intern Med*, 103(6):906-919.
- Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N.E., Toppari, J. (2002). Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:105-121.
- Thornton, J. (2000). *Pandora's Poison: Chlorine, health, and a new environmental strategy*. Cambridge: MIT Press.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J. Jr, Jégou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R.M., Sumpter, J.S. Skakkebaek, N.E. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104:741-803.
- UNEP/POPS/POP/RC.1/5 (2005). Comité de Revisión sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Primera reunión. Ginebra, 7 a 11 de noviembre de 2005.
- UNEP/POPS/COP.4/38. (2009). Conferencia de las Partes en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Cuarta reunión. Ginebra, 4 a 8 de mayo de 2009.
- Valenzuela, B. (1996). Determinación del efecto estrogénico de plaguicidas organoclorados. Tesis Doctoral.
- Verdeal, K.; Ryan, D.S. (1979). Naturally occurring estrogens in plant foods stuffs. *J. Fd. Protection* 42: 577-583.
- Verna, S.P., Goldin, B.R., Lin, P.S. (1998). The inhibition of estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspec*; 106:807-812.
- Vessey, M.P., Villard-Mackintosh, L., Painter, R. (1993) Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *Br Med J* 305:182-184.
- Vidaeff, A.C., Sever, L.E. (2005). In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod Toxicol* 20(1):5-20.

- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz de Almodóvar, J.M., Pedraza, V. (1995). The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect.*, 103(9):844-850.
- Virdis, R., Street, M.E., Zampolli, M., Radetti, G., Pezzini, B., Benelli, M., Ghizzoni, L., Volta, C. (1998). Precocious puberty in girls adopted from developing countries. *Arch Dis Child* 78:152-154.
- Virtanen, H.E., Kaleva, M., Haavisto, A.M., Schmidt, I.M., Chellakooty, M., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J. (2001). The birth rate of hypospadias in the Turku area in Finland. *APMIS*, 109(2):96-100.
- Vrijheid, M., Armstrong, B., Dolk, H., van Tongeren, M., Botting, B. (2003). Risk of hypospadias in relation to maternal occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals. *Occup Environ Med* 60(8):543-550.
- Wang, J., Wang, B. (2002). Study on risk factors of cryptorchidism. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 23(3):190-193.
- Weisskopf, M.G., Anderson, H.A., Hanrahan, L.P., Kanarek, M.S., Falk, C.M., Steenport, D.M., Draheim, L.A. (2005). Maternal exposure to Great Lakes sport-caught fish and dichlorodiphenyl dichloroethylene, but not polychlorinated biphenyls, is associated with reduced birth weight. *Environ Res*, 97(2):149-162.
- Weidner, I.S., Moller, H., Jensen, T.K., Skakkebaek, N.E. (1998). Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ. Health Perspect.*, 106(12):793-796.
- WHO. World Health Organization (WHO). (2004). Children's Environment and Health Action Plan for Europe. Fourth Ministerial Conference on Environment and Health. Budapest, Hungary, 23-25 June 2004
- Wilkinson, T.J., Colls, B.M., Schluter, P.J. (1992). Increased incidence of germ cell testicular cancer in New Zealand Maoris. *Br J Cancer*, 65(5):769-771.
- Willis, W.O., Depeyster, A., Molgaard, C.A., Walker, C., Mackendrick, T. (1993). Pregnancy Outcome Among Women Exposed to Pesticides Through Work Or Residence in An Agricultural Area. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 35(9):943-949.
- .

ANEXOS

ANEXO I

Cuestionario General de la madre (Estudio Madrid)

P.18. ¿Ha notado un aumento del vello en la cara, en el pecho o en otras partes del cuerpo en el actual embarazo?

- Sí 1
- No 2

P.19. ¿Le han realizado ecografías obstétricas durante el embarazo?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 21

P.20. (Si la respuesta es Sí), intente recordar cuántas ecografías le han realizado y en qué fechas

Nº ecografías	Mes de embarazo	Nº ecografías	Mes de embarazo
1ª		4ª	
2ª		5ª	
3ª		Más de 5 (6)	-----

P.21. ¿Ha tomado alguna medicación de forma esporádica o habitual desde un mes antes del embarazo y durante el mismo? (entrevistador/a: INCLUIR los tratamientos adquiridos en herboristerías y/o automedicación así como pomadas con corticoides ...)

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 23

P.22. Si la respuesta anterior es SÍ, especificar

Nombre del medicamento	Enfermedad	Dosis	Número tomas día	Trimestre del embarazo	Duración tratamiento (días)
Por ejemplo: Efferalgan	Dolor muscular	500 mg	3	1	05

P.23. ¿Ha recibido alguna vacuna durante el último año?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar a P. 25

P.24. Si la respuesta anterior es SÍ, especificar el tipo y en qué trimestre del embarazo fue

Tipo de vacuna	Trimestre del embarazo	Tipo de vacuna	Trimestre del embarazo
• Fiebre amarilla 1		• Rubéola 7	
• Fiebre tifoidea 2		• Difteria 8	
• Gripe 3		• Tétanos 9	
• Hepatitis A 4		• Otra (especificar) 10	
• Hepatitis B 5			
• Meningocócica 6			

Entrevistador:	
Antes del embarazo	0
1º trimestre	1
2º trimestre	2
3º trimestre	3

=====

HISTORIA OBSTÉTRICA

=====

P.25. ¿Ha tenido algún embarazo previo (por favor, tenga en cuenta todos los embarazos no importa cual haya sido su término)?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar a P.27

P.26. Si la respuesta anterior es SÍ, especificar

Embarazo (nº de orden)	Sexo: 1. Femenino 2. Masculino	Terminación: 1. Aborto 2. Nacido vivo 3. Nacido muerto	Mes y año de terminación	Semana de gestación	Peso (gramos)	Duración de la lactancia
1º			___/___			meses
2º			___/___			meses
3º			___/___			meses
4º			___/___			meses
5º			___/___			meses

P.27. ¿Algún médico le ha diagnosticado alguna de las siguientes complicaciones en embarazos anteriores? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA C)

- Hipertensión en el embarazo 1
 - Preeclampsia 2
 - Diabetes gestacional/del embarazo 3
 - Aumento del vello en cara, pecho u otras partes del cuerpo 4
 - Incompetencia cervical (cerclage) 5
 - Otros (especificar) 6
-
- No he tenido problema 0

P.28. ¿Ha visitado alguna vez algún médico por problemas de fertilidad (no poder tener hijos)?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P.32

P.29. ¿Ha sido tratada con medicamentos por problemas de fertilidad?

- Sí 1
- No 2

P.30. ¿Ha sido tratada para conseguir el embarazo actual?

- No 1
- Sí, con inductores de ovulación 2
- Sí, con inductores de ovulación y técnica de inseminación 3
- Sí, con inductores de ovulación y fecundación in vitro 4

P.31. ¿Ha requerido donación de semen u óvulos para este embarazo?

- No 1
- Sí, de semen 2
- Sí, de óvulos 3
- Sí, de semen y óvulos 4

●●●●●●●●●●
CONSUMO DE TABACO
 ●●●●●●●●●●

Las próximas preguntas que le voy a realizar están referidas al consumo de tabaco

P.32. ¿Fuma o ha fumado a lo largo de su vida?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P.44

P.33. ¿Diría que ha fumado más de 100 cigarrillos ó 5 cajetillas de tabaco en su vida?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P.44

P.34. ¿A qué edad empezó a fumar con una frecuencia de más de 1 cigarrillo a la semana?

_____ años

P.35. ¿Ha fumado durante el embarazo?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 39

P.36. Dígame, por favor, si durante el embarazo ha fumado

- Cigarrillos 1
- Puros 2 ⇒ Pasar P. 38
- Pipa 3 ⇒ Pasar P. 38

P.37. ¿Qué tipo de tabaco?

- Rubio 1
- Negro 2
- Rubio y negro 3

P.38. Aproximadamente, ¿qué cantidad de tabaco ha fumado desde que sabe que está embarazada? (Entrevistador/a: la respuesta puede ser en cantidad/día ó cantidad/semana)

- Cigarrillos [] día ó [] semana
- Puros [] día ó [] semana
- Pipa [] día ó [] semana

P.39. Antes de quedarse embarazada, ¿cuál de las siguientes formas describía mejor su consumo de tabaco?

- Fumaba diariamente 1 ⇒ Pasar P.41
- Fumaba aunque no diariamente 2 ⇒ Pasar P.41
- No fumaba 3

P.40. Si ha dejado de fumar, ¿hace cuánto tiempo que lo dejó?

[] años [] meses

P.41. Dígame, por favor, si fumaba ... (en el momento en que lo dejó)

- Cigarrillos 1
- Puros 2 ⇒ Pasar P. 43
- Pipa 3 ⇒ Pasar P. 43

P.42. ¿Qué tipo de tabaco?

- Rubio 1
- Negro 2
- Rubio y negro 3

P.43. Dígame, por favor, la cantidad aproximada de tabaco que fumaba de (Entrevistador/a: la respuesta puede ser en cantidad/día ó cantidad/semana)

- Cigarrillos [] día ó [] semana
- Puros [] día ó [] semana
- Pipa [] día ó [] semana

HISTORIA DE EXPOSICIÓN PASIVA

P.44. Desde que sabe que está embarazada, ¿ha fumado alguna persona regularmente dentro de su casa? (Entrevistador/a: no incluye cuando se fuma en ventanas, balcones o patios)

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 46

P.45. Aproximadamente, ¿cuánto diría usted que esa/s persona/s ha fumado desde que sabe usted que está embarazada dentro del domicilio particular?

. Nada ... 1 . Poco ... 2 . Bastante ... 3 . Mucho ... 4

P.46. ¿Ha compartido su espacio de trabajo con personas que fumaban diariamente desde que se quedó embarazada?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 48

P.47. ¿Hasta qué punto le molesta el humo de las personas con las que comparte su espacio de trabajo? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA D)

No me molesta en absoluto										Molestia insoportable
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P.50. Especifique el trabajo actual que desempeña y los trabajos que ha desarrollado previamente (del actual al más antiguo). (Entrevistador/a: Recoger sólo los trabajos remunerados a tiempo completo o parcial de más de 6 meses de duración. Consignar como nuevo trabajo todo cambio de empresa o de ocupación o sección dentro de la misma empresa)

Desde (mes/año)	Hasta (mes/año)	Actividad empresa	Puesto de trabajo	Tareas
1				
2				
3				
4				
5				

HISTORIA DE EXPOSICIONES AMBIENTALES EN HOGAR

Las siguientes preguntas van referidas a las exposiciones ambientales en su hogar

P.51. ¿Cuántos años lleva residiendo en su municipio actual? (Entrevistador/a: nombrar el municipio)

_____ años

P.52. ¿En qué tipo de localidad vive?

- Casco urbano 1
- Urbanización 2
- Campo 3
- Otros 4

P.53. ¿En qué tipo de casa reside?

- Unifamiliar 1
- Piso/apartamento 2
- Otros (especificar) 3
-

HISTORIA LABORAL

Ahora vamos a referirnos a su vida profesional

P.48. ¿Cuál es su situación laboral?

- Trabajadora 1 ⇒ P. 50
- Parada 2
- Tareas del hogar 3
- Estudiante 4
- Baja laboral (especificar) 5
-
- Otras, especificar 6
-

P.49. Si no tiene trabajo actualmente, ¿ha trabajado alguna vez? (Entrevistador/a: Incluye colaboración en empresa familiar, tareas domésticas remuneradas y el trabajo como aprendiz aunque no sea remunerado. Excluye el trabajo en la limpieza y cuidado de su propio hogar)

- Sí 1 ⇒ Pasar P. 50
- No 2 ⇒ Pasar P. 51

P.54. Aproximadamente, ¿cuántos metros cuadrados útiles tiene la vivienda?

_____ m²

P.55. ¿Qué tipo de calefacción tiene en su casa? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA E)

- No hay calefacción 1
- Calefacción eléctrica 2
- Calefacción de gas 3
- Calefacción de gasoil 4
- Calefacción de carbón 5
- Calefacción de madera (chimenea) 6
- Otros (especificar) 7
-

P.56. ¿Utiliza insecticidas en su casa o en el exterior (jardines, terrazas, patios)?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 59

P.57. ¿Cuántas veces al mes o al año utiliza estos productos?

P.58. ¿Utiliza estos productos en el interior o en el exterior de la casa?

- veces/mes ó veces/año
- Interior 1
 - Exterior 2
 - Ambas 3

P.59. ¿Cuántas personas residen en su domicilio actual?

_____ adultos _____ menores de 18 años

P.60. ¿Cuántos años lleva residiendo en su actual domicilio?

_____ años

P.61. (Entrevistador/a: Si lleva menos de 10 años rellenar el cuadro hacia atrás empezando por el último domicilio hasta cubrir un máximo de diez años. Indicar dirección completa/municipio/provincia/código postal/país)

Dirección completa	Municipio	Provincia	C. P.	País	Desde / hasta (fecha)
1					
2					
3					
4					
5					

P.62. ¿Con qué frecuencia pasan coches al lado de su casa?

P.63. ¿Con qué frecuencia pasan vehículos pesados (camiones, autobuses) al lado de casa?

	P.62	P.63
• Continuamente	1	1
• Con bastante frecuencia	2	2
• Poco	3	3
• Prácticamente nunca	4	4

P.64. ¿Qué distancia hay desde su vivienda a una calle en la que el tráfico es muy frecuente (pasan vehículos constantemente)?

_____ metros

P.65. Si es menor de 50 metros, ¿su piso o casa tiene al menos una ventana que de a una calle con tráfico muy frecuente?

- Sí 1
- No 2

P.66. ¿Qué nivel de ruido tiene habitualmente en su casa? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA F)

- Nada 1
- Poco 2
- Bastante 3
- Mucho 4

P.67. ¿Hasta qué punto le molesta el ruido (del tráfico, industria) de su vivienda si deja la ventana abierta? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA D)

No me molesta en absoluto					Molestia insoportable				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

P.68. De las siguientes fuentes de ruido, señale las que son habituales en su casa

- Ninguna 1
- Tráfico de la calle 2
- Vecinos 3
- Bares, pubs, discotecas 4
- Otras (especificar) 5

P.69. ¿Hasta qué punto le molesta la contaminación atmosférica del exterior de su vivienda procedentes del tráfico, la industria, etc. .. si deja la ventana abierta? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA D)

No me molesta en absoluto					Molestia insoportable				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

=====

" HISTORIA MÉDICA Y EXPOSICIONES MÉDICAS PREVIAS "

=====

El último bloque de preguntas que le voy a realizar hacen referencia a su historia médica

P.70. ¿Está usted diagnosticada de alguna enfermedad crónica?

- Sí 1
- No 2

P.71. ¿Algún médico le ha diagnosticado alguna de las siguientes alteraciones alérgicas? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA G)

- No 0
- Asma alérgico 1
- Dermatitis atópica 2
- Eccema 3
- Rinitis alérgica 4
- Otras (especificar) 5

P.72. ¿Tomaba algún medicamento de forma habitual antes de quedarse embarazada?

- Sí 1
 - No 2
- ⇨ Pasar P. 74

P.73. Especificar cuál:

-
-

**VÁLIDO ÚNICAMENTE A EFECTOS DE VALIDACIÓN
[DATOS DE IDENTIFICACIÓN]**

I.1. **Fecha de nacimiento (día/mes/año):**

_ _	_ _	1 9 _ _
(dd)	(mm)	(aa)

I.2. **Edad:** |_|_| años

I.3. **Lugar de Nacimiento (municipio/provincia/país):**

Municipio:

Municipio: . Urbano 1 . Rural 2

Provincia: |_|_|

País: |_|_|

I.4. **Estado civil (Entrevistado/a: Mostrar TARJETA I)**

- Soltera 1
- Convive con una pareja estable 2
- Casada 3
- Separada o divorciada 4
- Viuda 5
- Otros, especificar 6

•

I.5. **¿Cuál de las siguientes define mejor la situación en la que vive usted? (Entrevistador: Mostrar TARJETA J)**

- Vive sola 1
- Vive con el padre del bebé que espera 2
- Vive con otra pareja 3
- Vive con sus padres 4
- Otros, especificar 5

•

I.6. **Nivel de estudios terminados (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA K)**

- No sabe ni leer ni escribir 1
- Primaria incompleta 2
- Estudios de primer grado (hasta 5º EGB) 3
- Estudios de 2º grado (primer ciclo ESO, hasta 8º EGB, graduado escolar, bachillerato elemental) 4
- Formación Profesional 5
- Bachiller Superior (Segundo ciclo ESO, BUP, COU) ... 6
- Universitarios grado medio 7
- Universitarios grado superior 8
- Otros, especificar 9

•

I.7. **Grupo étnico (Entrevistador/a: No realizar esta pregunta, contestar por observación)**

- Amerindia 1
- Asiática 2
- Árabe (incluido Norte de África y Oriente Medio) 3
- Caucásica (blanco) 4
- Gitana 5
- Negro 6
- Otros 7

I.8. **Fecha de la entrevista:**

_ _	_ _	2 0 0 _ _
(dd)	(mm)	(aa)

I.9. **Duración de la entrevista**

|_|_| minutos

I.10. **Nombre del entrevistador/a:**

.....

I.11. **Nombre y apellidos de la entrevistada:**

.....

I.12. **Dirección completa (calle/número/piso/letra/Municipio y CP)**

.....

.....

I.13. **Teléfono de contacto**

Casa:

Móvil:

Trabajo:

Otros:

ÁREA SANITARIA _ _	CUESTIONARIO NÚMERO _ _ _ _
-------------------------------	--

ANEXO II

Cuestionario general del padre (Estudio Madrid)

ÁREA SANITARIA

CUESTIONARIO NÚMERO

1 2 3
 M P H

Buenos días/tardes, me pongo en contacto con usted porque su nombre me ha sido facilitado por la matrona de su mujer (entrevistador/a: indicar nombre) entre las personas dispuestas a participar en el estudio que la Comunidad de Madrid está realizando para el análisis de biomarcadores de contaminación en nuestra Comunidad.

Toda la información que usted nos facilite está sujeta a las especificaciones de la Ley Orgánica 5/192, de 29 de octubre de Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos (LORTAD) y sus modificaciones posteriores. Los datos que le solicitamos se tratarán informáticamente para realizar análisis estadísticos de una forma totalmente ANÓNIMA, sin grabar sus datos personales.

GRACIAS ANTICIPADAS POR SU COLABORACIÓN

CUESTIONARIO AL PADRE

P.4. Aproximadamente, ¿cuál es su altura?

 cms.

P.28. ¿Ha visitado alguna vez algún médico por problemas de fertilidad (no poder tener hijos)?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P.32

P.29. ¿Ha sido tratado con medicamentos por problemas de fertilidad?

- Sí 1
- No 2

Nota: No se utiliza la numeración de la P.1, P.2, P.3, P.5 a P.27 y P.30, P.31 con la finalidad de mantener en el fichero las mismas etiquetas de variables que en el cuestionario de la madre

• Las próximas preguntas que le voy a realizar están referidas al consumo de tabaco

P.32. ¿Fuma o ha fumado a lo largo de su vida?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P.44

P.33. ¿Diría que ha fumado más de 100 cigarrillos ó 5 cajetillas de tabaco en su vida?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P.44

P.34. ¿A qué edad empezó a fumar con una frecuencia de más de 1 cigarrillo a la semana?

 años

P.35. ¿Ha fumado durante el embarazo de su esposa?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 40

P.36. Dígame, por favor, si durante el embarazo de su esposa ha fumado

- Cigarrillos 1 ⇒ Pasar P.37
- Puros 2 ⇒ Pasar P. 38
- Pipa 3 ⇒ Pasar P. 38

CONSUMO DE TABACO

P.37. ¿Qué tipo de tabaco?

- Rubio 1
- Negro 2
- Rubio y negro 3

P.38. Aproximadamente, ¿qué cantidad de tabaco ha fumado desde que sabe que está embarazada su mujer? (Entrevistador/a: la respuesta puede ser en cantidad/día ó cantidad/semana)

- Cigarrillos día ó semana
- Puros día ó semana
- Pipa día ó semana

P.39. Antes de quedarse embarazada su mujer, ¿cuál de las siguientes formas describía mejor su consumo de tabaco?

- Fumaba diariamente 1 ⇒ Pasar P.41
- Fumaba aunque no diariamente 2 ⇒ Pasar P.41
- No fumaba 3

P.40. Si ha dejado de fumar, ¿hace cuánto tiempo que lo dejó?

años meses

P.41. Dígame, por favor, si fumaba ... (en el momento en que lo dejó)

- Cigarrillos 1
- Puros 2 ⇒ Pasar P. 43
- Pipa 3 ⇒ Pasar P. 43

P.42. ¿Qué tipo de tabaco?

- Rubio 1
- Negro 2
- Rubio y negro 3

P.43. Dígame, por favor, la cantidad aproximada de tabaco que fumaba ... (Entrevistador/a: la respuesta puede ser en cantidad/día ó cantidad/semana)

- Cigarrillos día ó semana
- Puros día ó semana
- Pipa día ó semana

HISTORIA DE EXPOSICIÓN PASIVA

P.44. Desde que sabe que su mujer está embarazada, ¿ha fumado alguna persona regularmente dentro de su casa? (Entrevistador/a: no incluye cuando se fuma en ventanas, balcones o patios)

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 46

P.45. Aproximadamente, ¿cuánto diría usted que esa/s persona/s ha fumado desde que sabe usted que su mujer está embarazada dentro del domicilio particular?

- Nada 1
- Poco 2
- Bastante 3
- Mucho 4

P.46. ¿Ha compartido su espacio de trabajo con personas que fumaban diariamente desde que su mujer se quedó embarazada?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 48

P.47. ¿Hasta qué punto le molesta el humo de las personas con las que comparte su espacio de trabajo? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA D)

No me molesta en absoluto											Molestia insoportable
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

HISTORIA LABORAL

Ahora vamos a referirnos a su vida profesional

P.48. ¿Cuál es su situación laboral?

- Trabajador 1 ⇒ P. 50
- Parado 2
- Tareas del hogar 3
- Estudiante 4
- Baja laboral (especificar) 5
- 6
- Otras, especificar 6

P.49. Si no tiene trabajo actualmente, ¿ha trabajado alguna vez? (Entrevistador/a: Incluye colaboración en empresa familiar, tareas domésticas remuneradas y el trabajo como aprendiz aunque no sea remunerado. Excluye el trabajo en la limpieza y cuidado de su propio hogar)

- Sí 1 ⇒ Pasar P. 50
- No 2 ⇒ Pasar P. 51

P.50. Especifique el trabajo actual que desempeña y los trabajos que ha desarrollado previamente (del actual al más antiguo).
(Entrevistador/a: Recoger sólo los trabajos remunerados a tiempo completo o parcial de más de 6 meses de duración. Consignar como nuevo trabajo todo cambio de empresa o de ocupación o sección dentro de la misma empresa)

Desde (mes/año)	Hasta (mes/año)	Actividad empresa	Puesto de trabajo	Tareas
1				
2				
3				
4				
5				

=====

HISTORIA DE EXPOSICIONES AMBIENTALES EN HOGAR

=====

Las siguientes preguntas van referidas a las exposiciones ambientales en su hogar

P.51. ¿Cuántos años lleva residiendo en su municipio actual?
(Entrevistador/a: nombrar el municipio)

 | | | | | años

P.52. ¿En qué tipo de localidad vive?

- Casco urbano 1
- Urbanización 2
- Campo 3
- Otros 4

P.53. ¿En qué tipo de casa reside?

- Unifamiliar 1
- Piso/apartamento 2
- Otros (especificar) 3

•

P.54. Aproximadamente, ¿cuántos metros cuadrados útiles tiene la vivienda?

 | | | | | m²

P.55. ¿Qué tipo de calefacción tiene en su casa?
(Entrevistador/a: Mostrar TARJETA E)

- No hay calefacción 1
- Calefacción eléctrica 2
- Calefacción de gas 3
- Calefacción de gasoil 4
- Calefacción de carbón 5
- Calefacción de madera (chimenea) 6
- Otros (especificar) 7

•

P.56. ¿Utiliza insecticidas en su casa o en el exterior (jardines, terrazas, patios)?

- Sí 1
- No 2 ⇒ Pasar P. 59

P.57. ¿Cuántas veces al mes o al año utiliza estos productos?

 | | | veces/mes ó | | | veces/año

P.58. ¿Utiliza estos productos en el interior o en el exterior de la casa?

- Interior 1
- Exterior 2
- Ambas 3

P.59. ¿Cuántas personas residen en su domicilio actual?

 | | | adultos | | | menores de 18 años

P.60. ¿Cuántos años lleva residiendo en su actual domicilio?

 | | | años

P.61. (Entrevistador/a: Si lleva menos de 10 años rellenar el cuadro hacia atrás empezando por el último domicilio hasta cubrir un máximo de diez años. Indicar dirección completa/municipio/provincia/código postal/país)

Dirección completa	Municipio	Provincia	C. P.	País	Desde / hasta (fecha)
1					
2					
3					
4					
5					

- P.62. ¿Con qué frecuencia pasan coches al lado de su casa?
 P.63. ¿Con qué frecuencia pasan vehículos pesados (camiones, autobuses) al lado de casa?

	P.62	P.63
• Continuamente	1	1
• Con bastante frecuencia	2	2
• Poco	3	3
• Prácticamente nunca	4	4

- P.64. ¿Qué distancia hay desde su vivienda a una calle en la que el tráfico es muy frecuente (pasan vehículos constantemente)?

_____ metros

- P.65. Si es menor de 50 metros, ¿su piso o casa tiene al menos una ventana que de a una calle con tráfico muy frecuente?

- Sí 1
- No 2

- P.66. ¿Qué nivel de ruido tiene habitualmente en su casa? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA F)

- Nada 1
- Poco 2
- Bastante 3
- Mucho 4

- P.67. ¿Hasta qué punto le molesta el ruido (del tráfico, industria) de su vivienda si deja la ventana abierta? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA D)

No me molesta en absoluto					Molestia insoportable				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- P.68. De las siguientes fuentes de ruido, señale las que son habituales en su casa

- Ninguna 1
- Tráfico de la calle 2
- Vecinos 3
- Bares, pubs, discotecas 4
- Otras (especificar) 5
-

- P.69. ¿Hasta qué punto le molesta la contaminación atmosférica del exterior de su vivienda procedentes del tráfico, la industria, etc. .. si deja la ventana abierta? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA D)

No me molesta en absoluto					Molestia insoportable				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

=====

HISTORIA MÉDICA Y EXPOSICIONES MÉDICAS PREVIAS

=====

El último bloque de preguntas que le voy a realizar hacen referencia a su historia médica

- P.70. ¿Está usted diagnosticado de alguna enfermedad crónica?

- Sí 1
- No 2

- P.71. ¿Algún médico le ha diagnosticado alguna de las siguientes alteraciones alérgicas? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA G)

- No 0
- Asma alérgico 1
- Dermatitis atópica 2
- Eczema 3
- Rinitis alérgica 4
- Otras (especificar) 5

- P.72. ¿Toma algún medicamento de forma habitual?

- Sí 1
- No 2 ⇨ Pasar P. 74

- P.73. Especificar cuál:

-
-
-

- P.74. ¿Algún médico le ha diagnosticado alguna vez, alguna de las siguientes enfermedades? (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA H)

- Ninguna 01
- Tuberculosis 02
- Infección por VIH 03
- Diabetes 04
- Hipertensión 05
- Enfermedades cardíacas 06
- Alteraciones de la coagulación sanguínea 07
- Enfermedades renales, suprarrenales y del tracto urinario 08
- Alteraciones de la glándula tiroides 09
- Ansiedad 10
- Depresión 11
- Enfermedad intestinal inflamatoria crónica 12
- Cáncer (especificar)

-
- Otras (especificar)
-

P.75. ¿Ha recibido alguna vez una transfusión?

- Sí 1
- No 2 \Rightarrow Pasar P. 77

P.76. Indicar motivo y fecha

Motivo:

Fecha:

--

 (dd)

--

 (mm)

--	--

 (aa)

P.77. ¿Ha visitado al dentista en el último año?

- Sí 1
- No 2

P.78. ¿Tiene usted empastes en la boca?

- Sí 1
- No 2 \Rightarrow Pasar P. 82

P.79. Indique el número de empastes que tiene

--

 empastes

P.80. ¿Le ha sido realizado algún empaste durante el último año?

- Sí 1
- No 2 \Rightarrow Pasar P. 82

P.81. Indique la fecha:

--

 (dd)

--

 (mm)

--	--

 (aa)

P.82. ¿Le han realizado radiografías en los últimos cinco años? (Entrevistador/a: Indicar que se tengan en cuenta todo tipo de radiografías, indicando las del dentista, ...)

- Sí 1
- No 2 \Rightarrow Pasar P. 84

P.83. ¿Cuántas radiografías le han realizado, cuándo, en qué parte del cuerpo y por qué motivo en los últimos cinco años?

Nº radiografías	Año	Parte del cuerpo	Motivo
1			
2			
3			
4			

P.84. ¿Le han realizado alguna Tomografía computerizada (TAC ó TC) en los últimos cinco años?

- Sí 1 \Rightarrow Pasar P. 85
- No 2 \Rightarrow Pasar P. 86

P.85. ¿Cuántas TC le han realizado, cuándo, en qué parte del cuerpo y por qué motivo en los últimos cinco años?

Nº de TC	Año	Parte del cuerpo	Motivo
1			
2			
3			
4			

P.86. ¿Sabe si hay en su familia alguna enfermedad hereditaria?

- Sí 1
- No 2 \Rightarrow Pasar P. 88

P.87. Indicar cuál es la enfermedad y el familiar afectado

Tipo de problema	Familiar afectado

.....
HISTORIA REPRODUCTIVA

A continuación voy a realizarle una serie de preguntas relacionadas con su paternidad

P.88. ¿Ha tenido algún hijo anteriormente?

- Sí 1
- No 2 \Rightarrow Pasar Datos Identificación

P.89. ¿Cuántos?, ¿en qué fecha?, ¿cuál fue su sexo?

Nº hijos	Fecha nacimiento	Sexo:	
		1. Femenino	2. Masculino
1 / /	1	2
2 / /	1	2
3 / /	1	2
4 / /	1	2
5 / /	1	2

**VÁLIDO ÚNICAMENTE A EFECTOS DE VALIDACIÓN
[DATOS DE IDENTIFICACIÓN]**

I.1. Fecha de nacimiento (día/mes/año):

		1	9		
(dd)	(mm)	(aa)			

I.2. Edad: años

I.3. Lugar de Nacimiento (municipio/provincia/país):

Municipio:
Municipio: . Urbano 1 . Rural 2

Provincia:

País:

I.4. Estado civil (Entrevistado/a: Mostrar TARJETA I)

- Soltero 1
- Convive con una pareja estable 2
- Casado 3
- Separado o divorciado 4
- Viudo 5
- Otros, especificar 6

•

I.5. ¿Cuál de las siguientes define mejor la situación en la que vive usted? (Entrevistador: Mostrar TARJETA J)

- Vive solo 1
- Vive con la madre del bebé que espera 2
- Vive con otra pareja 3
- Vive con sus padres 4
- Otros, especificar 5

•

I.6. Nivel de estudios terminados (Entrevistador/a: Mostrar TARJETA K)

- No sabe ni leer ni escribir 1
- Primaria incompleta 2
- Estudios de primer grado (hasta 5º EGB) 3
- Estudios de 2º grado (primer ciclo ESO, hasta 8º EGB, graduado escolar, bachillerato elemental) 4
- Formación Profesional 5
- Bachiller Superior (Segundo ciclo ESO, BUP, COU) ... 6
- Universitarios grado medio 7
- Universitarios grado superior 8
- Otros, especificar 9

•

I.7. Grupo étnico (Entrevistador/a: No realizar esta pregunta, contestar por observación)

- Amerindio 1
- Asiático 2
- Árabe (incluido Norte de África y Oriente Medio) 3
- Caucásico (blanco) 4
- Gitano 5
- Negro 6
- Otros 7

I.8. Fecha de la entrevista:

		2	0	0	
(dd)	(mm)	(aa)			

I.9. Duración de la entrevista

minutos

I.10. Nombre del entrevistador/a:

.....

I.11. Nombre y apellidos del entrevistado:

.....

I.12. Dirección completa (calle/número/piso/letra/Municipio y CP)

.....

.....

I.13. Teléfono de contacto

Casa:

Móvil

Trabajo:

Otros:

ÁREA SANITARIA <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	CUESTIONARIO NÚMERO <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>
---	--

ANEXO IIIa

**Cuestionario de Frecuencia Alimentaria de la madre
(Estudio Madrid)**

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA Nº 1

Estudio de biomarcadores de la Comunidad de Madrid

| | | | |
CÓDIGO

Estimada Sra., esta parte de la encuesta es para conocer la dieta que ha seguido en los últimos meses desde que está embarazada. Con ello tratamos de averiguar el papel que puede jugar la dieta en relación al desarrollo de su embarazo y de su futuro hijo. Sus respuestas serán muy útiles, y por ello, le agradecemos sinceramente que preste su máxima atención y colaboración. Cuando un alimento no se adapte plenamente a su consumo habitual, trate de aproximar su respuesta a las cantidades indicadas, con la ayuda de los ejemplos e indicaciones que se le den.

Para cada alimento, señalar cuantas veces como media ha tomado la cantidad que se indica durante los tres últimos meses. Debe tener en cuenta las veces que toma el alimento solo y cuando lo añade a otro alimento o plato. Por ejemplo, en el caso del huevo, considere cuando lo toma solo (Ej. frito o cocido) y cuando lo toma añadido o mezclado con otros platos. Si en estos tres meses ha venido comiendo una tortilla de 2 huevos cada 2 días, deberá marcar "1 por día". No debe considerar el huevo que va con los productos de bollería o dulces.

I. LÁCTEOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
1. Leche entera (1 vaso o taza, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
2. Leche semi-desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
3. Leche desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
4. Leche condensada (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
5. Nata o crema de leche (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
6. Yogur entero (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
7. Yogur desnatado (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
8. Requesón, queso blanco o fresco (una porción o ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
9. Queso curado, semicurado, o cremoso (un trozo, 50 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
10. Natillas, flan, puding (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
11. Helados (1 cucurucho, vasito o bola)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
12. Huevos de gallina (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
13. Pollo CON piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
14. Pollo SIN piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
15. Carne de ternera, cerdo, cordero como plato principal (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
16. Carne de caza: conejo, codorniz, pato (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
17. Hígado de ternera, cerdo, pollo (1 plato, ración o pieza mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
18. Visceras: callos, sesos, mollejas (1 ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19. Embutidos: jamón, salchichón, salami, mortadela, (1 ración de unos 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
20. Salchichas y similares (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
21. Patés, foie-gras (media ración, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
22. Hamburguesa (una mediana, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
23. Tocino, beicon, panceta (2 tiras o lonchas, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
24. Pescado frito variado (1 plato mediano o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
25. Pescado hervido o plancha BLANCO: merluza, lenguado, dorada (1 plato o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
26. Pescado hervido o plancha AZUL: atún, emperador, bonito, (plato o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
27. Otros pescados azules: caballa, sardinas, boquerón/anchoas, salmón	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
28. Una lata pequeña de conserva de atún o bonito en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
29. Una lata pequeña de conserva de sardinas o caballa en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
30. Pescados en salazón y/o ahumados: anchoas, bacalao, salmón (media ración, 50g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
31. Almejas, mejillones, ostras (1 ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
32. Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo (1 ración o plato, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
33. Marisco: gambas, cangrejo, langostino, langosta (1 ración 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

III. VERDURAS, LEGUMBRES.

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
34. Espinacas o acelgas cocinadas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
35. Col, coliflor, brócolis cocinadas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
36. Lechuga, endibias, escarola (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
37. Tomate (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
38. Cebolla (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
39. Zanahoria, calabaza (una o plato pequeño)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
40. Judías verdes cocinadas (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
41. Berenjenas, calabacines, pepinos (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
42. Pimientos (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
43. Alcachofas (una ración o plato mediano, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
44. Espárragos (una ración o plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
45. Maíz hervido (plato o lata pequeña, 82 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
46. Legumbres: lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

IV. FRUTAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
47. Naranjas, mandarinas (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
48. Zumo de naranja natural (un vaso pequeño, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
49. Plátano (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
50. Manzana, pera (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
51. Melocotón, nectarina, albaricoque (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
52. Sandía, melón (1 tajada o cala, mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
53. Uvas (un racimo mediano o plato de postre)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
54. Prunas, ciruelas frescas/secas (una, 37 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55. Kiwi (una unidad)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
56. Aceitunas (un platito o tapa de unas 15 unidades pequeñas)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
57. Frutos secos: almendras, cacahuetes, piñones, avellanas (1 platito o bolsita, 30g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

V. PAN, CEREALES Y SIMILARES

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
58. Pan blanco (Una pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde, 60 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
59. Pan integral (Pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
60. Cereales desayuno (30 g en seco)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
61. Patatas fritas (1 ración o plato, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
62. Patatas cocidas, asadas (1 patata mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
63. Bolsa de patatas fritas (1 bolsa pequeña, 25-30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
64. Arroz cocinado (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
65. Pastas: espaguetis, fideos, macarrones y similares (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
66. Pizza (1 porción o ración, 200 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VI. ACEITES, GRASAS Y DULCES

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
67. Aceite de oliva añadido en la mesa a ensalada, pan y a platos (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
68. Otros aceites vegetales (idem): girasol, maíz, soja (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
69. Margarina añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
70. Mantequilla añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
71. Galletas tipo María (1 galleta)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
72. Galletas con chocolate (1 galleta doble)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
73. Bollería: croissant, donut, magdalena, bizcocho, tarta o similar (uno o porción)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
74. Chocolate, bombones y similares (1 barra o 2 bombones)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
75. Chocolate en polvo, cola-caó y similares (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VII. BEBIDAS Y MISCELANEAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
76. Vino tinto (1 vaso, 125 cc)	<input type="radio"/>								
77. Vino blanco o rosado (1 vaso, 125 cc)	<input type="radio"/>								
78. Jerez, vinos secos, vermú (copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
79. Cerveza (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	<input type="radio"/>								
80. Lioores (20-25°): de frutas (manzana), de crema (Catalana, Bayleys) (1 copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
81. Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka, aguardientes 40° (1 copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
82. Refrescos normales de cola, naranja, limón (ej. coca-cola, fanta) (Uno, 250 cc)	<input type="radio"/>								
83. Refrescos sin azúcar cola, naranja, limón (ej. Coca-cola o pepsi light) (Uno, 250 cc)	<input type="radio"/>								
84. Agua del grifo (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
85. Agua embotellada sin gas (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
86. Agua embotellada con gas (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
87. Zumo de frutas envasado (1 vaso o envase de 200cc)	<input type="radio"/>								
88. Café (1 taza)	<input type="radio"/>								
89. Café descafeinado (1 taza)	<input type="radio"/>								
90. Croquetas de pollo, jamón (una)	<input type="radio"/>								
91. Croquetas, palitos o delicias de pescado fritos (una)	<input type="radio"/>								
92. Mayonesa (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
93. Salsa de tomate (media taza)	<input type="radio"/>								
94. Ketchup ó catchup (1 cucharada sopera)	<input type="radio"/>								
95. Sal añadida a los platos en la mesa (1 pizca del salero o pellizco con dos dedos)	<input type="radio"/>								
96. Ajo (1 diente)	<input type="radio"/>								
97. Mermeladas, miel (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
98. Azúcar (ej. en el café, postres, etc.) (1 cucharadita)	<input type="radio"/>								
99. Sal yodada	<input type="radio"/>								
100. Leche con vitaminas A+D	<input type="radio"/>								
101. Leche rica en calcio	<input type="radio"/>								
¿Consume algún otro alimento al menos una vez a la semana?									
-----	<input type="radio"/>								
-----	<input type="radio"/>								

No olvidar marcar todas las casillas

Consumo de suplementos vitamínicos o minerales

1. Durante los 3 meses previos a su embarazo hasta ahora, ¿ha tomado suplementos de vitaminas o minerales?

	Nombre comercial (marca)	Dosis semanal (comprimido/semana)	Fecha inicio (mes/año)	¿Sigue tomándolo?	Si no, fecha de finalización
a. Fibra/sup ricos en fibra (salvado)	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
b. Multivitaminas	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
c. Acido fólico	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
d. Complejo A + E	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
e. Vitamina A	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
f. Vitamina E	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
g. Vitamina C	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
h. Hierro	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
i. Calcio	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
j. Complejo B	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
k. Zinc	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
l. Otros Suplementos	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___

1. ¿Seguía usted algún tipo de dieta en el año previo a quedar embarazada?

(Si responde NO pasar a pregunta 3)

. No . Sí . No sabe/No contesta

2. ¿Podría indicar el motivo de seguir esta dieta?

Puede marcar más de una respuesta

- para controlar su peso
- porque tiene colesterol
- porque tiene azúcar o diabetes
- porque tiene problemas de estómago
- porque tiene problemas de vesícula o hígado
- porque tiene problemas de tensión alta o de corazón
- porque tiene problemas de riñón
- porque tiene alergia a algunos alimentos
- porque tiene ácido úrico o gota
- porque es vegetariana
- por otro motivo, ¿cual? _____

3. Desde que está embarazada ¿cómo ha cambiado su ingesta para los siguientes grupos de alimentos, con respecto a la del año antes del embarazo?

	Eliminado	↓	Igual	↑	Ns/Nc
a. Lácteos y derivados	<input type="radio"/>				
b. Huevos	<input type="radio"/>				
c. Carne	<input type="radio"/>				
d. Pescado	<input type="radio"/>				
e. Verduras	<input type="radio"/>				
f. Legumbres	<input type="radio"/>				
g. Frutas	<input type="radio"/>				
h. Pan	<input type="radio"/>				
i. Aceite de oliva	<input type="radio"/>				
j. Mantequilla/margarina	<input type="radio"/>				
k. Azúcar/dulces	<input type="radio"/>				
l. Bebidas alcohólicas	<input type="radio"/>				

4. ¿Con qué frecuencia come comidas fritas?

- A diario
- 5-6 veces por semana
- 2-4 veces por semana
- 1 vez por semana
- Menos de 1 vez por semana
- Ns/Nc

5. ¿Cuándo come carne, cómo de hecha le gusta comerla?

- No como carne (pasar a pregunta 9)
- Cruda
- Poco hecha
- Hecha
- Muy hecha. . Ns/Nc

6. ¿Qué hace Vd. con la grasa visible, cuando come carne?

- La quita toda
- Quita la mayoría
- Quita un poco
- No quita nada . Ns/Nc

7. ¿Cómo suele comer la carne?

	Veces al				Ns/Nc
	Nunca	Mes	Semana	Día	
a. A la plancha	<input type="radio"/>				
b. A la parrilla (grill)	<input type="radio"/>				
c. Asada (horno)	<input type="radio"/>				
d. Frita en aceite	<input type="radio"/>				
e. Guisada	<input type="radio"/>				

8. ¿Con qué frecuencia come lo tostado o quemado de la carne?

- Nunca o menos de una vez al mes
- Una vez al mes
- 2-3 veces al mes
- 1 vez a la semana
- 2 o más veces a la semana . Ns/Nc

9. ¿Con qué frecuencia come la parte tostada del pescado?

- Nunca o menos de una vez al mes
- Una vez al mes
- 2-3 veces al mes
- 1 vez a la semana
- 2 o más veces a la semana . Ns/Nc

10. ¿Con qué frecuencia come el tostado de la paella?

- Nunca o menos de una vez al mes
- Una vez al mes
- 2-3 veces al mes
- 1 vez a la semana
- 2 o más veces a la semana . Ns/Nc

11. ¿Qué clase de grasa o aceite usa para:

	Mantequilla	Margarina	Ac.Oliva	Ac.Ol virgen	Ac. Veg	Mezcla Ac.
ALIÑAR	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
COCINAR	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
FREIR	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>

ACTIVIDAD FISICA Y EJERCICIO (referida al último año)

1. En los últimos 12 meses, ¿podría indicarme Vd. cuántas horas al día suele dormir, incluida la siesta?

_____ horas

2. ¿Cuántos minutos de siesta suele dormir al día?

_____ min.

3. ¿Cuántas horas ve usted la televisión, a la semana? (ajustar al número entero más cercano)

_____ horas

4. En su actividad en el trabajo u ocupación principal está...

- Casi siempre sentado
- Sentado la mitad del tiempo
- Casi siempre de pie, quieto
- Casi siempre caminando, levantando y llevando pocas cosas
- Casi siempre caminando, levantando y llevando muchas cosas
- Trabajo manual pesado

5. ¿Cuánto tiempo camina o hace bicicleta al día?

- Casi nunca
- Menos de 20 minutos al día
- 20-40 minutos al día
- 40-60 minutos al día
- Entre 1 y 1 hora y media al día
- Más de 1 hora y media al día

6. ¿Cuánto tiempo dedica a actividades o tareas en casa?

- Menos de 1 hora al día
- 1-2 horas / día
- 3-4 horas / día
- 5-6 horas / día
- 7-8 horas / día
- Más de 8 horas / día

7. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a ver televisión, ordenador o leer?

- Menos de 1 hora al día
- 1 hora / día
- 2 horas / día
- 3 horas / día
- 4 horas / día
- 5-6 horas / día
- Más de 6 horas / día

8. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a hacer ejercicio o deporte?

- Menos de 1 hora a la semana
- 1 hora / semana
- 2 horas / semana
- 3 horas / semana
- 4-5 horas / semana
- Más de 5 horas / semana

9. Considerando toda su actividad física (trabajo u ocupación principal, hogar y tiempo libre), ¿cómo se considera Vd.?

- Sedentaria (sentado casi siempre, sin actividad física, sin deporte, bajo cuidados)
- Poco activa (profesiones o actividades sentadas, amas de casa con electrodomésticos, escaso deporte)
- Moderadamente activa (trabajos manuales, amas de casa sin electrodomésticos, deporte ligero, etc)
- Bastante activa (trabajos o actividades de pie-andando, deporte intenso, etc.)
- Muy activa (Trabajo muy vigoroso, deporte fuerte diario)
- No sabe / no contesta

ANEXO IIIb

**Cuestionario de Frecuencia Alimentaria del padre
(Estudio Madrid)**

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA N° 1

Estudio de biomarcadores de la Comunidad de Madrid

| | | | |
CÓDIGO

Estimado Sr., esta parte de la encuesta es para conocer la dieta que ha seguido en los últimos meses desde que su mujer está embarazada. Le agradecemos sinceramente que preste su máxima atención y colaboración. Cuando un alimento no se adapte plenamente a su consumo habitual, trate de aproximar su respuesta a las cantidades indicadas, con la ayuda de los ejemplos e indicaciones que se le den.

Para cada alimento, señalar cuantas veces como media ha tomado la cantidad que se indica durante los tres últimos meses. Debe tener en cuenta las veces que toma el alimento solo y cuando lo añade a otro alimento o plato. Por ejemplo, en el caso del huevo, considere cuando lo toma solo (Ej. frito o cocido) y cuando lo toma añadido o mezclado con otros platos. Si en estos tres meses ha venido comiendo una tortilla de 2 huevos cada 2 días, deberá marcar "1 por día". No debe considerar el huevo que va con los productos de bollería o dulces.

I. LÁCTEOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
1. Leche entera (1 vaso o taza, 200 cc)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2. Leche semi-desnatada (1 vaso, 200cc)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3. Leche desnatada (1 vaso, 200cc)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4. Leche condensada (1 cucharada)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5. Nata o crema de leche (1 cucharada)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6. Yogur entero (uno, 125 gramos)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
7. Yogur desnatado (uno, 125 gramos)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8. Requesón, queso blanco o fresco (una porción o ración, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
9. Queso curado, semicurado, o cremoso (un trozo, 50 gramos)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10. Natillas, flan, puding (uno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
11. Helados (1 cucurucho, vasito o bola)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
12. Huevos de gallina (uno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
13. Pollo CON piel (1 plato mediano o pieza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14. Pollo SIN piel (1 plato mediano o pieza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15. Carne de ternera, cerdo, cordero como plato principal (1 plato mediano o pieza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16. Carne de caza: conejo, codorniz, pato (1 plato)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
17. Hígado de ternera, cerdo, pollo (1 plato, ración o pieza mediana)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
18. Vísceras: callos, sesos, mollejas (1 ración, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
19. Embutidos: jamón, salchichón, salami, mortadela, (1 ración de unos 50 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
20. Salchichas y similares (una mediana)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
21. Patés, foie-gras (media ración, 50 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
22. Hamburguesa (una mediana, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
23. Tocino, beicon, panceta (2 tiras o lonchas, 50 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
24. Pescado frito variado (1 plato mediano o ración)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25. Pescado hervido o plancha BLANCO: merluza, lenguado, dorada (1 plato o ración)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
26. Pescado hervido o plancha AZUL: atún, emperador, bonito, (plato o ración)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
27. Otros pescados azules: caballa, sardinas, boquerón/anchoas, salmón	1	2	3	4	5	6	7	8	9
28. Una lata pequeña de conserva de atún o bonito en aceite	1	2	3	4	5	6	7	8	9
29. Una lata pequeña de conserva de sardinas o caballa en aceite	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30. Pescados en salazón y/o ahumados: anchoas, bacalao, salmón (media ración, 50g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
31. Almejas, mejillones, ostras (1 ración, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
32. Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo (1 ración o plato, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
33. Marisco: gambas, cangrejo, langostino, langosta (1 ración 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

III. VERDURAS, LEGUMBRES.	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
34. Espinacas o acelgas cocinadas (1 plato mediano)	<input type="checkbox"/>								
35. Col, coliflor, brócolis cocinadas (1 plato mediano)	<input type="checkbox"/>								
36. Lechuga, endibias, escarola (1 plato mediano)	<input type="checkbox"/>								
37. Tomate (uno mediano)	<input type="checkbox"/>								
38. Cebolla (una mediana)	<input type="checkbox"/>								
39. Zanahoria, calabaza (una o plato pequeño)	<input type="checkbox"/>								
40. Judías verdes cocinadas (1 plato)	<input type="checkbox"/>								
41. Berenjenas, calabacines, pepinos (uno)	<input type="checkbox"/>								
42. Pimientos (uno)	<input type="checkbox"/>								
43. Alcachofas (una ración o plato mediano, 100 g)	<input type="checkbox"/>								
44. Espárragos (una ración o plato)	<input type="checkbox"/>								
45. Maíz hervido (plato o lata pequeña, 82 g)	<input type="checkbox"/>								
46. Legumbres: lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas (1 plato mediano)	<input type="checkbox"/>								
IV. FRUTAS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
47. Naranjas, mandarinas (una)	<input type="checkbox"/>								
48. Zumo de naranja natural (un vaso pequeño, 125 cc)	<input type="checkbox"/>								
49. Plátano (uno)	<input type="checkbox"/>								
50. Manzana, pera (una mediana)	<input type="checkbox"/>								
51. Melocotón, nectarina, albaricoque (uno mediano)	<input type="checkbox"/>								
52. Sandía, melón (1 tajada o cala, mediana)	<input type="checkbox"/>								
53. Uvas (un racimo mediano o plato de postre)	<input type="checkbox"/>								
54. Prunas, ciruelas frescas/secas (una, 37 g)	<input type="checkbox"/>								
55. Kiwi (una unidad)	<input type="checkbox"/>								
56. Aceitunas (un platito o tapa de unas 15 unidades pequeñas)	<input type="checkbox"/>								
57. Frutos secos: almendras, cacahuetes, piñones, avellanas (1 platito o bolsita, 30g)	<input type="checkbox"/>								
V. PAN, CEREALES Y SIMILARES	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
58. Pan blanco (Una pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde, 60 g)	<input type="checkbox"/>								
59. Pan integral (Pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde)	<input type="checkbox"/>								
60. Cereales desayuno (30 g en seco)	<input type="checkbox"/>								
61. Patatas fritas (1 ración o plato, 100 g)	<input type="checkbox"/>								
62. Patatas cocidas, asadas (1 patata mediana)	<input type="checkbox"/>								
63. Bolsa de patatas fritas (1 bolsa pequeña, 25-30 g)	<input type="checkbox"/>								
64. Arroz cocinado (1 plato mediano)	<input type="checkbox"/>								
65. Pastas: espaguetis, fideos, macarrones y similares (1 plato)	<input type="checkbox"/>								
66. Pizza (1 porción o ración, 200 g)	<input type="checkbox"/>								
VI. ACEITES, GRASAS Y DULCES	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
67. Aceite de oliva añadido en la mesa a ensalada, pan y a platos (1 cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>								
68. Otros aceites vegetales (ídem): girasol, maíz, soja (1 cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>								
69. Margarina añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	<input type="checkbox"/>								
70. Mantequilla añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	<input type="checkbox"/>								
71. Galletas tipo María (1 galleta)	<input type="checkbox"/>								
72. Galletas con chocolate (1 galleta doble)	<input type="checkbox"/>								
73. Bollería: croissant, donut, magdalena, bizcocho, tarta o similar (uno o porción)	<input type="checkbox"/>								
74. Chocolate, bombones y similares (1 barra o 2 bombones)	<input type="checkbox"/>								
75. Chocolate en polvo, cola-cao y similares (1 cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>								

No olvidar marcar todas las casillas

VII. BEBIDAS Y MISCELANEAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
76. Vino tinto (1 vaso, 125 cc)	<input type="radio"/>								
77. Vino blanco o rosado (1 vaso, 125 cc)	<input type="radio"/>								
78. Jerez, vinos secos, vermú (copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
79. Cerveza (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	<input type="radio"/>								
80. Licores (20-25°): de frutas (manzana), de crema (Catalana, Bayleys) (1 copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
81. Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka, aguardientes 40° (1 copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
82. Refrescos normales de cola, naranja, limón (ej. coca-cola, fanta) (Uno, 250 cc)	<input type="radio"/>								
83. Refrescos sin azúcar cola, naranja, limón (ej. Coca-cola o pepsi light) (Uno, 250 cc)	<input type="radio"/>								
84. Agua del grifo (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
85. Agua embotellada sin gas (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
86. Agua embotellada con gas (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
87. Zumo de frutas envasado (1 vaso o envase de 200cc)	<input type="radio"/>								
88. Café (1 taza)	<input type="radio"/>								
89. Café descafeinado (1 taza)	<input type="radio"/>								
90. Croquetas de pollo, jamón (una)	<input type="radio"/>								
91. Croquetas, palitos o delicias de pescado fritos (una)	<input type="radio"/>								
92. Mayonesa (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
93. Salsa de tomate (media taza)	<input type="radio"/>								
94. Ketchup ó catchup (1 cucharada sopera)	<input type="radio"/>								
95. Sal añadida a los platos en la mesa (1 pizca del salero o pellizco con dos dedos)	<input type="radio"/>								
96. Ajo (1 diente)	<input type="radio"/>								
97. Mermeladas, miel (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
98. Azúcar (ej. en el café, postres, etc.) (1 cucharadita)	<input type="radio"/>								
99. Sal yodada	<input type="radio"/>								
100. Leche con vitaminas A+D	<input type="radio"/>								
101. Leche rica en calcio	<input type="radio"/>								
¿Consume algún otro alimento al menos una vez a la semana?	<input type="radio"/>								
-----	<input type="radio"/>								
-----	<input type="radio"/>								

No olvidar marcar todas las casillas

Consumo de suplementos vitamínicos o minerales

1. Durante el último año, ¿ha tomado suplementos de vitaminas o minerales?

	Marca y presentación	Dosis semanal (compromiso/semana)	Fecha inicio (mes/año)	¿Sigue tomándolo?	Si no, fecha de finalización
a. Fibra/sup ricos en fibra (salvado)	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
b. Multivitaminas	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
c. Acido fólico	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
d. Complejo A + E	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
e. Vitamina A	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
f. Vitamina E	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
g. Vitamina C	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
h. Hierro	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
i. Calcio	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
j. Complejo B	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
k. Zinc	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___
n. Otros Suplementos (p.e.: levadura)	-----	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	___/___/___

1. ¿Seguía usted algún tipo de dieta antes de que su mujer se quedara embarazada?

(Si responde NO pasar a pregunta 3)

. No . Sí . No sabe/No contesta

2. ¿Podría indicar el motivo de seguir esta dieta?

Puede marcar más de una respuesta

- para controlar su peso
- porque tiene colesterol
- porque tiene azúcar o diabetes
- porque tiene problemas de estómago
- porque tiene problemas de vesícula o hígado
- porque tiene problemas de tensión alta o de corazón
- porque tiene problemas de riñón
- porque tiene alergia a algunos alimentos
- porque tiene ácido úrico o gota
- porque es vegetariano
- por otro motivo, ¿cual? _____

3. Desde que su mujer está embarazada ¿cómo ha cambiado su ingesta para los siguientes grupos de alimentos, con respecto a la del año antes del embarazo?

	Eliminado	↓	Igual	↑	Ns/Nc
a. Lácteos y derivados	<input type="radio"/>				
b. Huevos	<input type="radio"/>				
c. Carne	<input type="radio"/>				
d. Pescado	<input type="radio"/>				
e. Verduras	<input type="radio"/>				
f. Legumbres	<input type="radio"/>				
g. Frutas	<input type="radio"/>				
h. Pan	<input type="radio"/>				
i. Aceite de oliva	<input type="radio"/>				
j. Mantequilla/margarina	<input type="radio"/>				
k. Azúcar/dulces	<input type="radio"/>				
l. Bebidas alcohólicas	<input type="radio"/>				

4. ¿Con qué frecuencia come comidas fritas?

- A diario
- 5-6 veces por semana
- 2-4 veces por semana
- 1 vez por semana
- Menos de 1 vez por semana
- Ns/Nc

5. ¿Cuándo come carne, cómo de hecha le gusta comerla?

- No como carne (pasar a pregunta 9)
- Cruda
- Poco hecha
- Hecha
- Muy hecha . Ns/Nc

6. ¿Qué hace Vd. con la grasa visible, cuando come carne?

- La quita toda
- Quita la mayoría
- Quita un poco
- No quita nada . Ns/Nc

7. ¿Cómo suele comer la carne?

	Veces al				Ns/Nc
	Nunca	Mes	Semana	Día	
a. A la plancha	<input type="radio"/>				
b. A la parrilla (grill)	<input type="radio"/>				
c. Asada (horno)	<input type="radio"/>				
d. Frita en aceite	<input type="radio"/>				
e. Guisada	<input type="radio"/>				

8. ¿Con qué frecuencia come lo tostado o quemado de la carne?

- Nunca o menos de una vez al mes
- Una vez al mes
- 2-3 veces al mes
- 1 vez a la semana
- 2 o más veces a la semana . Ns/Nc

9. ¿Con qué frecuencia come la parte tostada del pescado?

- Nunca o menos de una vez al mes
- Una vez al mes
- 2-3 veces al mes
- 1 vez a la semana
- 2 o más veces a la semana . Ns/Nc

10. ¿Con qué frecuencia come el tostado de la paella?

- Nunca o menos de una vez al mes
- Una vez al mes
- 2-3 veces al mes
- 1 vez a la semana
- 2 o más veces a la semana . Ns/Nc

11. ¿Qué clase de grasa o aceite usa para:

	Mantequilla	Margarina	Ac.Oliva	Ac.Ol virgen	Ac. Veg	Mezcla Ac.
ALIÑAR	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
COCINAR	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
FREIR	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>

ACTIVIDAD FISICA Y EJERCICIO (referida al último año)

1. En los últimos 12 meses, ¿podría indicarme Vd. cuántas horas al día suele dormir, incluida la siesta?

_____ horas

2. ¿Cuántos minutos de siesta suele dormir al día?

_____ min.

3. ¿Cuántas horas ve usted la televisión, a la semana? (ajustar al número entero más cercano)

_____ horas

4. En su actividad en el trabajo u ocupación principal está...

- Casi siempre sentado
- Sentado la mitad del tiempo
- Casi siempre de pie, quieto
- Casi siempre caminando, levantando y llevando pocas cosas
- Casi siempre caminando, levantando y llevando muchas cosas
- Trabajo manual pesado

5. ¿Cuánto tiempo camina o hace bicicleta al día?

- Casi nunca
- Menos de 20 minutos al día
- 20-40 minutos al día
- 40-60 minutos al día
- Entre 1 y 1 hora y media al día
- Más de 1 hora y media al día

6. ¿Cuánto tiempo dedica a actividades o tareas en casa?

- Menos de 1 hora al día
- 1-2 horas / día
- 3-4 horas / día
- 5-6 horas / día
- 7-8 horas / día
- Más de 8 horas / día

7. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a ver televisión, ordenador o leer?

- Menos de 1 hora al día
- 1 hora / día
- 2 horas / día
- 3 horas / día
- 4 horas / día
- 5-6 horas / día
- Más de 6 horas / día

8. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a hacer ejercicio o deporte?

- Menos de 1 hora a la semana
- 1 hora / semana
- 2 horas / semana
- 3 horas / semana
- 4-5 horas / semana
- Más de 5 horas / semana

9. Considerando toda su actividad física (trabajo u ocupación principal, hogar y tiempo libre), ¿cómo se considera Vd.?

- Sedentario (sentado casi siempre, sin actividad física, sin deporte, bajo cuidados)
- Poco activo (profesiones o actividades sentadas, amas de casa con electrodomésticos, escaso deporte)
- Moderadamente activo (trabajos manuales, amas de casa sin electrodomésticos, deporte ligero, etc)
- Bastante activo (trabajos o actividades de pie-andando, deporte intenso, etc.)
- Muy activo (Trabajo muy vigoroso, deporte fuerte diario)
- No sabe / no contesta

ANEXO IV

**Datos clínicos y antropométricos del recién nacido
(Estudio Madrid)**



DATOS CLÍNICOS Y ANTROPOMÉTRICOS DEL RECIÉN NACIDO

Estos datos se recogerán entre todos los participantes en el estudio que la Comunidad de Madrid está realizando para vigilar la exposición a contaminantes ambientales mediante biomarcadores en dos áreas sanitarias de la Comunidad de Madrid, el Área 1 (distrito de Vallecas) y el Área 10 (distritos de Parla y Getafe).

Toda la información que se recoge en esta encuesta está sujeta a las especificaciones de la Ley Orgánica 5/192, de 29 de octubre de Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos (LORTAD) y sus modificaciones posteriores. Los datos se tratarán informáticamente para realizar análisis estadísticos de una forma totalmente ANÓNIMA, sin grabar los datos personales.

Identificación Hospital:

Maternidad	
Hospital Gregorio Marañón	ق
Hospital de Getafe	ق

Identificación de la madre:

Datos generales

- Número de la Historia Clínica de la madre (rellenar si no hay pegatina de la madre):
- Datos de la madre (rellenar si no hay pegatina de la madre):
 - Nombre:
 - 1º Apellido: 2º Apellido:
- Fecha de nacimiento del recién nacido: / / (Día / mes / año)
- Hora del nacimiento:
- Sexo del recién nacido:
 - 1. Niño
 - 2. Niña
- ¿Se ha podido recoger sangre de cordón?:
 - 1. Si
 - 2. No
- Si la respuesta anterior es afirmativa, especificar la cantidad de sangre de cordón recogida: ml

Datos clínicos

- ¿El parto ha sido espontáneo o inducido?
 - 1. Espontáneo
 - 2. Inducido
- Tipo de parto:
 - 1. Vaginal
 - 2. Fórceps
 - 3. Cesárea
 - 4. Otros. Especificar:
- Edad gestacional: semanas (por Fecha Última Regla)
- Peso al nacimiento: gramos
- Longitud: centímetros
- Perímetro cefálico: centímetros
- Perímetro abdominal: centímetros
- APGAR 1 minuto:
- APGAR 5 minutos:

- Malformaciones congénitas:
 - 1. No
 - 2. Si. Especificar:
- Otros problemas de salud:
 - 1. No
 - 2. Si. Especificar:

RECOGIDA DE DATOS:

Fecha de la recogida de datos: / / (Día / mes / año)

Persona que recoge los datos del recién nacido:

Nombre:

1º Apellido: 2º Apellido:

Profesión:

Classified - Internal use

ANEXO V

Cuestionario General de la madre y padre (Estudio Granada).



CUESTIONARIO

ESTUDIO SOBRE SALUD REPRODUCTIVA

Y FACTORES MEDIOAMBIENTALES

Hospital: Clínico Universitario San Cecilio de Granada

Servicio: Obstetricia y Ginecología

Encuestador:

Identificación:

--	--	--	--

Código:

--	--	--	--

Felicitaciones por el nacimiento de su hijo.

Se le invita a participar en un estudio sobre Salud Reproductiva y factores medioambientales. La participación es totalmente voluntaria.

Por favor conteste a las preguntas del entrevistador.

El cuestionario contiene preguntas relacionadas con su embarazo reciente y el período anterior a éste. Otras preguntas están relacionadas con el parto y el nacimiento de su hijo.

- A) Preguntas Básicas
- B) Embarazo último y embarzos previos
- C) Aspectos generales de su Salud
- D) Educación y Condiciones de Trabajo
- E) Estilo de Vida

Debe contestar cuantas preguntas sea posible. Algunas de ellas pueden presentar dificultad, pero por favor intente contestarlas de forma precisa. Aunque la mayoría de las cuestiones deberán ser contestadas por usted algunas preguntas se refieren al padre del niño.

Cómo rellenar el cuestionario:

- Cada parte (A-E) puede ser contestada independientemente.
- Algunas preguntas pueden ser contestadas SI o NO, en otras se deberá elegir entre diversas opciones. Elija la/s opción/opciones que le parezcan más correctas, en su caso, y escriba el número/s apropiado/s en la casilla de la derecha o marque la casilla.
- Hay algunas preguntas abiertas en las que usted deberá escribir un texto, por ej. el nombre de un medicamento, o indicar el número exacto en la casilla, por ej. el número esperado de hijos. Preguntas relacionadas con la duración de acontecimientos, por ej. ingreso en el hospital, pueden ser contestadas indicando la/s semana/s de gestación en la/s cual/es ocurrió.
- Si usted no sabe la respuesta correcta puede escribir "?" en alguna casilla o línea.

- Por favor vea que hay dos numeraciones independientes en el cuestionario. La única numeración que es relevante para usted, es la primera de la izquierda, por ej. cuando pase de pregunta. El número pequeño de las casillas de la parte derecha de la página sirve exclusivamente para introducir los datos en un programa de ordenador.
- Si tiene alguna pregunta o comentario el encuestador atenderá sus requerimientos.
- Puede contactar con su médico o con nosotros en el número de teléfono

¡Gracias por su cooperación!

CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS

Nombre (por favor escriba en letras mayúsculas)	
Fecha de nacimiento de la madre	
No. Seguridad Social	
Identificación	
Código	
Dirección:	
	Población
	Provincia
	D.P.
No. Teléfono del domicilio.	
No. Teléfono del trabajo.	
No. Teléfono de posibles contactos	
Fecha en la que completó el cuestionario.	<div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 20px; display: inline-block;"></div>
Fecha del parto.	
Hospital elegido para el parto.	

HOJA DE NO RESPUESTA

Dirigido a pacientes que por diversos motivos no han deseado participar en el estudio.

¿Ha sido previamente informada del estudio?

Sí No

Motivo de no participación:

No quiere NS/NC

A) PREGUNTAS BASICAS

1. Fecha de nacimiento del padre (dd -mm -aa)	A3 <input type="text"/>
2. Altura de la madre en cm. Sea tan precisa como sea posible.	A6 <input type="text"/>
3. ¿Cuál era su peso antes del embarazo en kg ?Puede usar un decimal, p.ej. 60.5 Kg o 61.0 Kg.	A8 <input type="text"/>
4. ¿Cuál es su peso actual en Kg? (Al término del embarazo previo al parto)	A9 <input type="text"/>

B) EMBARAZO ÚLTIMO Y EMBARAZOS PREVIOS

1. ¿Ha usado algún anticonceptivo hormonal (píldora, diafragma o tratamiento hormonal) antes de que supiera que estaba embarazada (en las primeras semanas del embarazo) ? 1. Sí 2. No	B12 <input type="checkbox"/>
2. ¿Cuándo dejó de usar métodos anticonceptivos (mm-aa)?Métodos anticonceptivos incluidos, preservativo, DIU, anticonceptivos orales, diafragma, gel, crema, espumas, método de Ogino, y otros (p.ej. interrumpir el coito).	B15 <input type="text"/>
3. ¿ Cuánto tiempo pasó desde que dejó los anticonceptivos (de cualquier tipo) hasta que se quedó embarazada? (El tiempo durante el cual mantuvo relaciones sexuales (coito) sin usar anticonceptivos) Menos de 2 meses 2-4 meses 5-6 meses 7-9 meses 10-12 meses 1-2 años 7. Más de 2 años	B17 <input type="checkbox"/>
4. ¿ Ha estado sometido a tratamiento de infertilidad, alguno de los miembros de la pareja, en relación con este último embarazo? Sí 2. No (ir a la pregunta 8)	B19 <input type="checkbox"/>
Si es sí, ¿qué tratamiento recibió? Por favor marque la casilla apropiada. Puede elegir varias opciones y marcar varias casillas. Tratamiento hormonal (ir a la pregunta 8) Inseminación Fertilización in vitro/ ICSI Operación. quirúrgica Otros	B20-24 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

6. Si fue tratada por inseminación ó IVF/ICSI, por favor responda si el semen fué 1. de su marido 2. de un donante	B25 <input type="checkbox"/>
7. Si fue tratada por inseminación ó IVF/ICSI, por favor responda si el óvulo fue 1. suyo propio 2. de una donante	<input type="checkbox"/> B26
8. ¿Ha tomado medicación alguna mientras intentaba quedarse embarazada ? 1. Sí (por favor complete esta tabla) 2. No (ir a la pregunta 9)	<input type="checkbox"/> B27

Si es sí, complete la siguiente tabla de forma tan precisa como le sea posible. Si no puede recordar el nombre del medicamento deje el espacio vacío.

Nombre del medicamento	Enfermedad	Dosis Diaria	No. de días
Ej. Paracetamol	Dolor muscular	500 mg x 3	3
B28	B29	B30	B31
B32	B33	B34	B35
B36	B37	B38	B39
B40	B41	B42	B43

9. ¿Ha sufrido algunos de los problemas/enfermedades mencionados abajo? Si es sí, por favor indique durante qué semana/s de gestación

Problema	No	Sí	Semana de Gestación
Pérdida de líquido amniótico		B46	B47
Naúseas		B60	B61
Vómitos		B62	B63

10. ¿ Le han puesto un empaste dental blanco (no metálico) durante este embarazo ? 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 12)	B66 <input type="checkbox"/>
11. Si es sí, ¿durante qué semana/s de la gestación ? Señale la/s casilla/s apropiada/s. 1. Semana 0-13. 2. Semana 14-26 3. Semana 27-42	B67-69 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
12. ¿Ha tenido alguna hemorragia vaginal durante su embarazo ? Esta pregunta también incluye manchas 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 14)	B83 <input type="checkbox"/>

13. Si es sí, ¿durante qué trimestre de la gestación tuvo una hemorragia .. 1. durante el primer trimestre 2. durante el segundo trimestre 3. durante el tercer trimestre	B85-87 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
14. ¿Ha tomado alguna medicina durante este embarazo ? 1. Sí (por favor complete la siguiente tabla) 2. No (ir a la pregunta 15)	B91 <input type="checkbox"/>

Si es SI, por favor complete la siguiente tabla tan cuidadosamente como sea posible. Por favor recuerde además indicar el uso de pomadas tales como cremas de corticoides. Si no puede recordar el nombre del medicamento deje la tabla vacía.

Nombre	Enfermedad	Dosis diaria	No. De días	Semana de gestación
Ej. Paracetamol	Dolor muscular	500 mg x 3	2	14
B92	B93	B94	B95	B96
B97	B98	B99	B100	B101
B102	B103	B104	B105	B106
B107	B108	B109	B110	B111

15. Tuvo algún episodio febril durante las primeras 14 semanas de su embarazo? 1. Sí 2. No	B112 <input type="checkbox"/>
16. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre durante este embarazo? 1. Sí 2. No	B120 <input type="checkbox"/>
17. ¿Ha estado embarazada con anterioridad? 1. Sí (por favor complete la siguiente tabla) 2. No (ir a la sección C)	B121 <input type="checkbox"/>

La siguiente tabla resume algunos embarazos previos que usted podría haber tenido. Las primeras dos líneas dan ejemplos de cómo utilizar la tabla. Por favor intente ser lo más precisa posible. En la columna "Enfermedades" puede escribir algunos de las enfermedades mencionadas en el apartado C - b)1 ó alteraciones cromosómicas.

No	Año	Duración emb. (semanas)	Sexo	Peso (g)	Enferm.	Aborto	M. neonatal	Mal parto	Emb E.U.
Ej.	1980	5				X			
Ej.	1992	39	Niña	3010					
1/B122-130									
2/B131-139									
3/B140-148									
4/B149-157									
5/B158-166									
6/B167-175									
7/B176-184									
8/B185-193									
9/B194-202									
10/B203-211									

C. ASPECTOS GENERALES DE LA SALUD:

a) Ginecología y Obstetricia

1. ¿Qué edad tenía usted cuando tuvo su primera menstruación/regla? <i>Escriba su edad en años completos, si fuera posible también en medios años. P.ej. 13.0 ó 12.5</i>	<input type="text"/> C1
2. ¿ Ha usado alguna vez el DIU como método anticonceptivo ? 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 4</i>)	4.1.1.1 C <input type="text"/> 4
3. Si ha usado un DIU hormonal, por favor indique por cuanto tiempo. <i>Añadir los años en los que lo usó, incluso si ha habido interrupciones en su empleo</i> 1. Menos de un año 2. 1-2 años 3. 2-5 años 4. Más de 5 años	C6 <input type="text"/>
4. ¿Ha usado alguna vez anticonceptivos orales ó implantes ? 1. Sí 2. No	C7 <input type="text"/>
5. Si es SI, ¿ Durante cuánto tiempo? <i>Añadir los años que incluso ha habido interrupciones</i> 1. Menos de 1 año 2 1-2 años 3 3-5 años 4 6-10 años 5 11-15 años 6 Más de 15 años	C8 <input type="text"/>

b) Salud general

Esta parte del cuestionario se refiere a aspectos generales de la salud. Si tiene (ha tenido) algunas de las enfermedades abajo mencionadas.

1. ¿Ha tenido alguna de las siguientes enfermedades? La tabla debe ser completada por la madre y el padre, marcando SI o NO. Por favor complete la misma información para los/as hermanos/as del niño esperado.

	Madre		Padre		Hermano I		Hermano II	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
RIÑÓN/ VEJIGA								
Falta de un riñón C140-143								
GÓNADAS								
Hipospadias C176-178								
Epispadia C179-181								
Mala apertura de la uretra C182-184								
Criptorquidismo(uni- o bilateral) C201-203								

D. EDUCACION Y CONDICIONES DE TRABAJO

Esta sección consta de dos partes : las preguntas 1-15 debe contestarlas la madre, las preguntas 16-29 el padre

<p>1. ¿Cuál es su estado civil ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Casada 2. Conviviendo con su pareja 3. Soltera 	<p>D1</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>2. ¿Cuál es su trabajo actual/ qué soporte financiero recibe? Elija sólo una opción .</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor /Trabajador en una finca (ir a la pregunta 7) 2. Otro tipo de negocio propio(ir a la pregunta 5) 3. Trabajo con su esposo (ir a la pregunta 5) 4. Trabajo especializado (ir a la pregunta 5) 5. Trabajo no especializado (ir a la pregunta 5) 6. Empleado/Servicio público (ir a la pregunta 5) 7. Recibiendo educación/ Formación (ir a la pregunta 3) 8. Jubilación anticipada/ Pensionista (ir a la pregunta 3) 9. Ama de casa/Sin otro trabajo (ir a la pregunta 3) 10. Subsidio de desempleo (ir a la pregunta 3) 11. Maternidad ó Permiso de Maternidad (ir a la pregunta 3) 12. Otros (ir a la pregunta 3) 	<p>D2</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>3. ¿Ha tenido durante los últimos 3 años trabajo durante 3 meses ó más ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 10) 	<p>D3</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>

<p>4. ¿Qué ocupación tuvo mas recientemente (durante 3 meses o más)?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor/Trabajo en una finca <i>(ir a la pregunta 7)</i> 1. Otro tipo de negocio propio <i>(ir a la pregunta 8)</i> 2. Trabajo con su cónyuge <i>(ir a la pregunta 8)</i> 3. Trabajo especializado <i>(ir a la pregunta 5)</i> 4. Trabajo no especializado <i>(ir a la pregunta 5)</i> 5. Empleado/ Servicio público <i>(ir a la pregunta 9)</i> 6. Otro <i>(ir a la pregunta 9)</i> 	<p>D4</p> <input data-bbox="1362 512 1444 595" type="checkbox"/>
<p>5. ¿Tiene algún empleado en su trabajo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No <i>(ir a la pregunta 9)</i> 	<p>D5</p> <input data-bbox="1362 667 1444 750" type="checkbox"/>
<p>6. ¿Cuántos empleados tiene o ha tenido en total en su trabajo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1-10 <i>(ir a la pregunta 9)</i> 2. 11-50 <i>(ir a la pregunta 9)</i> 3. Más de 50 <i>(ir a la pregunta 9)</i> 	<p>D6</p> <input data-bbox="1362 842 1444 902" type="checkbox"/>
<p>7. ¿Cómo de grande es/era su finca (incluida la parte arrendada, no incluida la dada en arriendo).</p> <p style="text-align: center;">No. De hectáreas: _____</p>	<p>D7</p> <input data-bbox="1362 1003 1444 1064" type="checkbox"/>
<p>8. ¿Cuántos empleados tiene su plantilla (sin incluirse usted y su cónyuge) ?</p> <p style="text-align: center;">No. De empleados: _____</p>	<p>D8</p> <input data-bbox="1362 1193 1444 1254" type="checkbox"/>
<p>9. ¿Cuál es su ocupación exacta? Por favor de una descripción precisa (p.ej. principal encargado de la oficina de hacienda)_</p>	<p>D9</p> <input data-bbox="1362 1305 1444 1366" type="checkbox"/>
<p>10. ¿Ha completado alguna formación educacional? Por favor considere solo la formación que sea cualificada.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No <i>(ir a la pregunta 14)</i> 	<p>D10</p> <input data-bbox="1362 1451 1444 1534" type="checkbox"/>
<p>11. Si es SI, ¿qué cualificación tiene?. Si tiene varias (p.ej formación en un trabajo especializado y graduación universitaria), por favor indique la de mayor grado:</p> <p>_____</p>	<p>D11</p> <input data-bbox="1362 1675 1444 1736" type="checkbox"/>
<p>12. ¿Cuánto duró su formación ?</p> <p style="text-align: center;">Años: _____</p> <p style="text-align: center;">Meses: _____</p>	<p>D12-13</p> <input data-bbox="1362 1809 1444 1892" type="checkbox"/>

<p>13. ¿A qué grupo pertenece su formación ? <i>Por favor elija sólo una respuesta, la formación más cualificada.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sin estudios 2. Estudios primarios 3. Estudios medios 4. Estudios superiores 3. Formación profesional 5. Diplomatura 	<p>D14</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>14. ¿Ha estado expuesto - bajo su consentimiento - a productos químicos en su trabajo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 16</i>) 	<p>D15</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>15. Si es SI, ¿a qué productos químicos?. <i>Escriba el nombre, tipo o para qué ha usado el producto</i></p> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	<p>D16</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>16. (Las preguntas 16-29 deberán ser contestadas por el padre) ¿Cuál es su ocupación/ de qué vive? <i>Elija solo una opción.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor/Trabajador en una finca (<i>ir a la pregunta 21</i>) 2. Otro tipo de negocio propio (<i>ir a la pregunta 19</i>) 3. Trabajo con su esposa (<i>ir a la pregunta 19</i>) 4. Trabajo especializado (<i>ir a la pregunta 19</i>) 5. Trabajo no especializado (<i>ir a la pregunta 19</i>) 6. Empleado/Servicio Publico (<i>ir a la pregunta 19</i>) 7. Recibiendo educación/ Formación (<i>ir a la pregunta 17</i>) 8. Jubilación anticipada/Pensionista (<i>ir a la 17</i>) 9. Amo de casa / Sin otro empleo (<i>ir a la pregunta 17</i>) 10. Subsidio de desempleo (<i>ir a la pregunta 17</i>) 11. Permiso de Paternidad (<i>ir a la pregunta 17</i>) 12. Otros (<i>ir a la pregunta 17</i>) 	<p>D17</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>17. ¿Ha tenido durante los ultimos 3 años un trabajo durante 3 meses o más ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 24</i>) 	<p>D18</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>18. ¿ Qué ocupación tuvo mas recientemente (durante 3 meses o más) ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor/Trabajo en una finca (<i>ir a la pregunta 21</i>) 2. Otro tipo de negocio propio (<i>ir a la pregunta 22</i>) 3. Trabajo con su cónyuje (<i>ir a la pregunta 22</i>) 4. Trabajo especializado (<i>ir a la pregunta 19</i>) 5. Trabajo no especializado(<i>ir a la pregunta 19</i>) 6. Empleado /Servicio Público (<i>ir a la pregunta 23</i>) 7. Otro (<i>ir a la pregunta 23</i>) 	<p>D19</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>

<p>19. ¿Tiene algún empleado en su trabajo ?</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D20
<p>20. ¿Cuántos empleados tiene o ha tenido en total en su trabajo ?</p> <p>1. 1-10 (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p> <p>2. 11-50 (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p> <p>3. Más de 50 (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D21
<p>21. ¿Cómo de grande es /era la finca (incluida la parte arrendada , no incluida la dada en arriendo) ?</p> <p>No. de hectáreas _____</p>	<input type="checkbox"/> D22
<p>22. ¿Cuántos empleados tiene su plantilla (sin incluirse usted ni su cónyuge) ?</p> <p>No. de empleados: _____</p>	<input type="checkbox"/> D23
<p>23. ¿Cuál es su ocupación exacta?. Por favor dé una descripción precisa (p.ej. principal encargado de la oficina de Hacienda)</p>	<input type="checkbox"/> D24
<p>24. ¿Ha completado alguna formación educacional? Por favor considere solo la formación que sea cualificada</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No (<i>ir a la pregunta 28</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D25
<p>25. Si es SI, ¿qué cualificación tiene? Si tiene varias (p.ej. formación en un trabajo especializado y graduación universitaria), por favor indique la de mayor grado.</p> <p>_____</p>	<input type="checkbox"/> D26
<p>26. ¿Cuánto duró su formación ?</p> <p>Años: _____</p> <p>Meses: _____</p>	<input type="checkbox"/> D27-28 <input type="checkbox"/>
<p>27. ¿A qué grupo pertenece su formación? Por favor elija solo una respuesta, la formación mas cualificada.</p> <p>1. Sin estudios</p> <p>2. Estudios primarios</p> <p>3. Estudios medios</p> <p>4. Estudios superiores</p> <p>5. Formación profesional</p> <p>6. Diplomatura.</p>	<input type="checkbox"/> D29
<p>28. ¿Ha estado expuesto -bajo su consentimiento- a productos químicos en su trabajo ?</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No (<i>ir a la seccion E</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D30
<p>29 Si es SI, ¿qué productos químicos?. Escriba el nombre, tipo o para qué se usa el producto.</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<input type="checkbox"/> D31

E. ESTILO DE VIDA

<p>1. ¿ Ha usado algún cosmético durante su embarazo (la pregunta no incluye maquillaje) ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 5) 	<p style="text-align: right;">E1</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>
<p>2. Si es SI , ¿qué tipo de cosmético ha usado? <i>Puede elegir varias opciones de la lista de abajo y marcar la /s casilla/s apropiada/s</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Crema..... 2. Loción..... 3. Ungüento..... 4. Aceite..... 5. Polvos..... 6. Otros..... 	<p style="text-align: right;">E2-7</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 100px; margin: 0 auto;"></div>
<p>3. Si es SI , ¿para qué parte del cuerpo usó los cosméticos? <i>Puede elegir varias opciones de la lista de abajo y marcar la/s casilla/s apropiada/s</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Todo el cuerpo..... 2. Brazos y/o piernas..... 3. Parte superior del cuerpo..... 4. Parte inferior del cuerpo..... 5. Sólo barriga..... 6. Varias..... 	<p style="text-align: right;">E8-13</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 100px; margin: 0 auto;"></div>
<p>4. Si es SI, ¿con qué frecuencia usó los cosméticos. ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diariamente 2. Más de una vez a la semana 3. Más de una vez al mes 4. Menos de una vez al mes/rara vez. 	<p style="text-align: right;">E14</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>5a. ¿Se ha teñido el pelo, ondulado, hecho permanente o echado mechadas durante su embarazo? Esta pregunta no incluye champú colorante. <i>Puede elegir varias opciones de la lista de abajo y marcar la/s casilla/s.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No (ir a la pregunta 6)..... 2. Si, mechadas..... 3. Sí,tinte..... 4. Sí, hecho permanente-ondulada..... 	<p style="text-align: right;">E15-18</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 60px; margin: 0 auto;"></div>
<p>5b. Si es SI, ¿durante qué semana de la gestación? <i>(Marque la/s casilla/s apropiada/s).</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Semana 0-13..... 2. Semana 14-26..... 3. Semana 27-42..... 	<p style="text-align: right;">E19-21</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 60px; margin: 0 auto;"></div>
<p>5c. Si es SI, ¿cuántas veces se ha teñido el pelo, ondulado, hecho permanente ó echado mechadas? Introduzca el número total en la casilla. _____</p>	<p style="text-align: right;">E22</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>

<p>6. ¿Ha tomado alguna dieta complementaria durante el embarazo ?</p> <p>1. Sí (por favor complete la siguiente tabla) 2. No (ir a la pregunta 7)</p>	E23
---	-----

Por favor, añada dietas suplementarias, tales como medicina alternativa, té de hierbas. En la columna "frecuencia" puede responder una de las tres posibilidades: diariamente, más de una vez a la semana, menos de una vez a la semana.

	Nombre del producto	Frecuencia	Semana de Gestación
Ej.	Vitamina C	Diariamente	Desde la 12 a ahora
Vitaminas Esenciales	E24	E25	E26
Multivitaminas	E27	E28	E29
Ácido Fólico	E30	E31	E32
Hierro	E33	E34	E35
Calcio	E36	E37	E38
Aceite de pescado (A. Hígado de Bacalao)	E39	E40	E41
Otro E42	E43	E44	E45
Otro E46	E47	E48	E49

<p>7. ¿ Cuántos vasos de agua bebe diariamente ?</p> <p>1. Ninguno 2. 1-3 vasos / día 3. Más de 3 vasos / día</p>	E50
<p>8. ¿Es usted vegetariana ?</p> <p>1. Sí 2. No (ir a la pregunta 10)</p>	E51
<p>9. Si es SI, ¿qué tipo de vegetariana ?</p> <p>1. Como pescado ó aves de corral..... 2. Como huevos y leche..... 3. Solo como frutas y verduras (vegetariana estricta).</p>	E52-54
<p>10. ¿Ha comido alguna vez comida ecológica ?</p> <p>1. Sí 2. No (ir a la pregunta 13)</p>	E55

<p>11. Si es SI, ¿con qué frecuencia ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diariamente/ varias veces a la semana 2. 1-4 veces al mes 3. Muy rara vez/ nunca 	<p style="text-align: right;">E56</p> <input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>									
<p>12. Si es sí, ¿qué porcentaje de su dieta es ecológico? Por favor responda a cada una de los tipos de la lista de abajo. Puede usar una puntuación del 0 al 100. 0 = no haber comido nunca comida ecológica de ese tipo, 100 = comer solo comida ecológica.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Frutas y verduras 2. Pan 3. Carne..... 4. Productos del día..... 5. Otros..... 	<p style="text-align: right;">E57-61</p> <table border="1" style="width: 100%; height: 100%;"> <tr><td style="height: 20px;"></td></tr> </table>									
<p>13. ¿Usa recipientes de plástico en el microondas para calentar comida ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 15</i>) 	<p style="text-align: right;">E62</p> <input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>									
<p>14. Si es SI ¿con qué frecuencia ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Varias veces a la semana 2. Varias veces al mes 3. Menos de una vez al mes 4. Nunca 	<p style="text-align: right;">E63</p> <input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>									
<p>15. ¿Cuánto ha comido ó bebido de media de lo siguiente durante el embarazo. Por favor, responda de forma individual para cada tipo, y use "0" para aquello que no ha tomado.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Café (tazas al día)..... 2. Té (tazas al día)..... 3. Cacao (tazas al día)..... 4. Cola (litros por semana). 5. Cerveza (botellas por semana)..... 6. Vino (vasos por semana)..... 7. Alcohol fuerte/ licores (vasos por semana)..... 8. Barras de chocolate (gramos por semana) 200 grs p.ej. 1 = 60 gramos, 1 = 200 gramos 	<p style="text-align: right;">E68-75</p> <table border="1" style="width: 100%; height: 100%;"> <tr><td style="height: 20px;"></td></tr> </table>									
<p>16. ¿Cuántas veces durante este embarazo ha bebido en exceso? <i>Piense también al comienzo de su embarazo</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. 1-2 veces 3. 3 ó más veces 	<p style="text-align: right;">E76</p> <input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>									
<p>17.. ¿Ha tomado marihuana durante el embarazo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No 	<p style="text-align: right;">E77</p> <input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>									
<p>18.. ¿Ha estado tomando pastillas, anfetaminas o otras drogas estimulantes durante su embarazo?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2.No 	<p style="text-align: right;">E80</p> <input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>									

<p>19. ¿Ha fumado durante este embarazo?</p> <p>1. Sí 2. No</p>	<p>E99</p> <input type="checkbox"/>
<p>20. ¿Cuánto fuma por día?</p> <p>1. Cigarrillos..... 2. Cheroots..... 3. Puros..... 4. Pipas.....</p>	<p>E104-107</p> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
<p>21. ¿Dejó de fumar después de quedarse embarazada?</p> <p>1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 26</i>) 3. Parcialmente / No, pero lo reduje</p>	<p>E110</p> <input type="checkbox"/>
<p>22. Si es Sí, ¿en qué semana de gestación?</p> <p>_____</p>	<p>E111</p> <input type="checkbox"/>
<p>23. Si es SI, ¿usó parches de nicotina, chicles o sprays para dejarlo?</p> <p>1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 26</i>)</p>	<p>E112</p> <input type="checkbox"/>
<p>24. Si es SI, ¿qué producto usó?</p> <p>1. Chicles con nicotina 2. Parches con nicotina 3. Spray con nicotina</p>	<p>E113</p> <input type="checkbox"/>
<p>25. Si es SI, ¿en qué semana(s) de gestación lo usó? Escriba la semana dentro de la casilla</p> <p>1. Semana 0-13 2. Semana 14-26 3. Semana 27-42 4. Durante todo el embarazo</p>	<p>E114</p> <input type="checkbox"/>
<p>26. ¿Ha estado expuesta al humo del tabaco forma pasiva p. ej. fuma su pareja o la gente de su oficina?</p> <p>1. Sí 2. No</p>	<p>E115</p> <input type="checkbox"/>
<p>27. Si es SI, ¿cuántas horas al día de media?</p> <p>1. Menos de $\frac{1}{2}$ hora 2. $\frac{1}{2}$-2 horas 3. Más de 2 horas</p>	<p>E116</p> <input type="checkbox"/>

28. ¿ Con qué frecuencia tomó alguna de las siguientes comidas durante el embarazo

	Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces semana	4-6 veces semana	Una o más veces al día
Yogur E118-122					
Quesos frescos E123-127					
Quesos añejos E128-132					
Huevos E133-137					
Tofu, miso E138-142					
Carne de soja p.ej. hamburguesas y salchichas vegetarianas E143-147					
Guisantes, habichuelas, lentejas, garbanzos E148-152					
Ensalada (lechuga, tomates,etc) E153-157					
Vegetales verdes frescos E158-162					
Otros vegetales frescos (zanahorias,etc) E163-167					
Vegetales congelados E168-172					
Conservas vegetales (incluidos las conservas de tomates)E173-177					
Fruta fresca E178-182					
Zumo de fruta fresca E183-187					
Conserva de fruta o tetra brike de zumo de fruta.E188-192					
Fruta seca E193-197					
Aves (pollo, pavo).E198-202					
Carne (vaca, cordero, cerdo, jamón, bacon, ternera, hamburguesa) .E203-207					
Hígado, paté de hígado, riñón, corazón, callos					
Pescado blanco fresco o congelado (bacalao, platija, dedos de pescado)E213-217					
Otro pescado fresco o congelado (sardina, boquerón, salmonete, atún, arenque, ahumados, trucha, salmón)E218-222					
Marisco fresco o congelado (camarones, coquinas, almejas)E223-227					
Pescado en conservaE228-232					
Carne en conserva E233-237					
Judías guisadas E238-242					
Otras alubias en conserva E243-247					
Comida orgánica o de cosecha propia E248-252					
Chocolate E253-257					

29. Por favor indique si estuvo personalmente en contacto con alguno de los siguientes productos en el trabajo y si es así, durante cuántas horas a la semana:

Labor	Número de horas por semana
VDU Screen/computadoras E258-263	
Spray para el pelo E264-269	
Humos del plástico E270-275	
Productos de limpieza incluyendo desinfectantes E276-281	
Disolventes (orgánicos) (formaldehído, glutaraldehído, óxido etileno) E282-287	
Pinturas E288-293	
Tinta de imprenta E294-299	
Pintura delgada E300-305	
Tintes y pigmentos E306-311	
Cola E312-317	
Pesticidas E318-323	
Productos químicos fotográficos E324-329	
Metales pesados (plomo, mercurio cadmio)? E330-335	
Otros metales (hierro, zinc, aluminio)? E336-341	
Humos de soldar E342-347	
Humos de fábrica E348-353	
Humos de tubo de escape (diesel, gasolina)? E354-359	
Rayos-X (radiación iónica)? E360-365	
Radiación no iónica (UV, infrarrojos)? E366-371	
Anestésicos E372-377	
Citostáticos y antibióticos E378-383	
Vibraciones E384-389	
Grano, paja, papel y polvo textil. E390-395	
Polvo E396-401	
Otros productos químicos, por favor especifíquelos E402-407	

Ya ha finalizado este cuestionario. Muchas gracias por todo el tiempo y esfuerzo que ha puesto. Si tiene algún comentario/crítica por favor escribala aquí:

OBSERVACIONES:

ANEXO VI

Datos clínicos recién nacidos (estudio Granada).