

Universidad de Granada



**Exposición medioambiental a xenoestrógenos y
riesgo de criptorquidia e hipospadias**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en
Farmacia la Licenciada Begoña T. Olmos Ruiz**

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Hormonas y desarrollo genito-urinario.....	7
1.2. Disruptores endocrinos.....	10
1.3. Exposición infantil a disruptores endocrinos.....	11
1.4. Criptorquidia e hipospadias como patologías idóneas para el estudio de asociación entre exposición a disruptores endocrinos y patología hormonodependiente en humanos.....	12
1.4.1. Criptorquidia.....	13
1.4.2. Hipospadias.....	17
1.4.3. Epidemiología de criptorquia.	18
Factores de riesgo de criptorquidia	
1.4.4. Epidemiología del hipospadias.	26
Factores de riesgo del hipospadias	
1.5. Compuestos organoclorados persistentes como disruptores endocrinos.....	30
1.5.1. DDT y sus metabolitos.....	32
1.5.2. Endosulfan.....	34
1.5.3. Dieldrin y Aldrin.....	36
1.5.4. Mirex.....	37
1.5.5. Hexaclorobenceno (HCB).....	38

1.5.6. Hexaclorociclohexanos: Lindano.....	39
1.6. Biomarcadores de exposición y efecto y susceptibilidad en patología relacionada con el tracto genito-urinario.....	39
1.6.1. Marcadores de exposición.....	40
1.6.2. Marcadores de efecto.....	42
2. OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
3.1. MATERIALES:	
3.1.1. Instrumentación químico-analítica.....	48
3.1.2. Cultivos celulares	50
3.2. MÉTODOS	
3.2.1. Diseño del estudio	52
3.2.2. Ámbito del estudio	52
3.2.3. Poblaciones de estudio	53
3.2.3.1. Población de referencia	53
A) Casos	
B) Controles	
3.2.3.2. Población potencialmente elegible	54
A) Criterios de inclusión	
B) Criterios de exclusión	
3.2.3.3. Muestra	54
A) Factores determinantes	
B) Tamaño final	
3.2.4. Recogida de la información	56
3.2.4.1. Encuesta epidemiológica	56
3.2.4.2. Muestras biológicas	56
3.2.4.2.1. Obtención y almacenamiento de las muestras biológicas ..	56
3.2.4.2.2. Análisis químico de pesticidas en muestras de placenta ...	57
3.2.4.2.3. Metodología biológica	61
3.2.5. Variables recogidas	64
3.2.5.1. Variables de la encuesta epidemiológica	64
3.2.5.1.1. De la madre	64
3.2.5.1.2. Del padre	71
3.2.5.1.3. Del niño	72
3.2.5.2. Variables del análisis de las muestras de placenta	72
3.2.6. Análisis estadístico de los datos	73
3.2.6.1. Estudio descriptivo	73

3.2.6.2.	Análisis bivalente	73
3.2.7.	Aplicaciones informáticas	74
4.	RESULTADOS.....	75
4.1.	Población objeto de estudio. Participación	75
4.2.	Características de la población de estudio	76
4.2.1.	Características de la madre	76
4.2.1.1.	Variables antropométricas	76
4.2.1.2.	Características sociodemográficas	80
4.2.1.3.	Características reproductivas de la madre	83
4.2.1.4.	Antecedentes clínicos y de exposición durante el Embarazo	86
4.2.1.5.	Hábitos alimentarios durante el embarazo	91
4.2.1.6.	Características del parto	94
4.2.2.	Características del padre	95
4.2.3.	Características del niño	98
4.3.	Exposición a pesticidas organoclorados: Xenoestrógenos	102
4.3.1.	Determinación de residuo químico en tejido placentario	102
4.3.2.	Correlación entre los niveles de pesticidas detectados en tejido placentario	106
4.3.3.	Correlación entre los niveles de pesticidas detectados en tejido placentario y las características de la población de estudio	108
4.3.4.	Análisis biológico de la actividad hormonal y/o tóxica de los extractos de las muestras de tejido placentario	112
4.4.	Estudio de los factores asociados a malformaciones en el tracto genito-urinario (criptorquidia e hipospadias).....	115
4.4.1.	Análisis bivalente	115
4.4.1.1.	Características de los padres	115
4.4.1.2.	Características del neonato	129
4.4.1.3.	Pesticidas organoclorados en las muestras de tejido placentario y riesgo de malformación urogenital	133
4.4.1.4.	Análisis biológico de los extractos de las muestras de tejido placentario y riesgo de malformación urogenital ...	137
5.	DISCUSIÓN	140
6.	CONCLUSIONES	157
7.	BIBLIOGRAFÍA	160
8.	ANEXOS	174

1. Introducción

La descripción pormenorizada de alteraciones en la función reproductora de algunas especies de animales salvajes junto a la demostración de exposición humana y animal a contaminantes químicos generó, hace más de quince años lo que hoy día se conoce como hipótesis de disrupción endocrina. Es éste un problema de salud medioambiental que cuestiona los paradigmas en que se fundamenta el control y la regulación del uso de los compuestos químicos y que sugiere que algunos de los contaminantes ambientales, introducidos en el medio por la actividad humana, se comportan como hormonas, alteran la homeostasis hormonal y originan un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas: i) a través de mecanismos de acción diversos; ii) actuando en periodos críticos del desarrollo; iii) con una expresión de efecto que a veces es tardía o incluso transgeneracional; iv) presentando un umbral de concentración inferior al reconocido como límite para otros aspectos toxicológicos y v) actuando de forma combinada para originar un efecto sinérgico, antagónico o aditivo.

En 2001, Skakkebaek, Rajpert-De Meyts y Main publicaban un artículo en la revista *Human Reproduction* en el que sugieren que algunos problemas de salud entre los que se incluyen el incremento en la incidencia de cáncer de testículo ([Adami *et al.*, 1994](#); [Moller 1998](#)), la pobre calidad seminal y el descenso en el contaje espermático

en algunas regiones del mundo (Carlsen *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1995; Irvine *et al.*, 1996; Fisch *et al.*, 1996; Swan *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 2000), el incremento en la frecuencia de criptorquidia e hipospadias (Paulozzi *et al.*, 1997), junto con el aparente crecimiento en la demanda de reproducción asistida, son síntomas de una entidad con base patofisiológica común a la que denominaron Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS). La propuesta del profesor Skakkebaek y colaboradores es que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo, variaciones sutiles de los niveles hormonales pueden dar lugar a lesiones que conducen a disfunción orgánica y, en última instancia, a enfermedad clínica. La hipótesis patogénica incluye como principal causa factores ambientales o de estilo de vida, entre los que se encuentran sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal, con mayor probabilidad de asociación causal que aquellos otros factores que suponen la acumulación de errores genéticos. Esto no excluye que ciertas aberraciones cromosómicas junto con una mayor predisposición por la presencia de polimorfismos específicos potencien el papel de los factores ambientales.

Datos de investigación básica, clínica y epidemiológica sugieren que el origen de todas las patologías anteriormente citadas se deriva de una alteración importante en la diferenciación de las células germinales que afectaría a la funcionalidad de las células de Sertoli o de Leydig (Rajpert-De Meyts *et al.*, 2000). En el primero de los casos, una función celular de Sertoli alterada se manifestaría clínicamente ya sea como una pobre calidad seminal ya sea mediante la mayor probabilidad de transformación maligna hacia cáncer testicular. En la otra vía, la alteración de la función de las células de Leydig trae consigo insuficiencia androgénica que se manifestaría clínicamente como hipospadias y/o criptorquidia. Para añadir aún más complejidad a la hipótesis, se establecen relaciones de conexión entre estas dos grandes vías (Sertoli y Leydig) y se propone que la expresión de los síntomas clínicos variará con la severidad del síndrome, de tal manera que algunos individuos presentaran patología más severa que otros, pero siempre dentro del ámbito del cuadro descrito. Mientras que los casos más leves tan solo es apreciable un problema en calidad y cantidad de producción espermática y el riesgo de cáncer testicular es mínimo, en los más severos junto a las alteraciones de la espermatogénesis aparecerán alteraciones en el descenso testicular y una mayor probabilidad de cáncer de testículo.

Los datos epidemiológicos recogidos por Skakkebaek y sus colegas parecen indicar que la prevalencia del síndrome descrito es mayor de lo que se suponía, ya que esta entidad patofisiológica en su forma leve podría estar afectando a cerca de un

quinto de la población danesa, si se consideran los datos de calidad seminal en ese país ([Andersen et al., 2000](#)).

Quizás una de las repercusiones mayores de la nueva hipótesis planteada por el equipo danés radica en el hecho de que los estudios epidemiológicos en calidad espermática, no descenso testicular e hipospadias y cáncer de testículo deberían considerar aquellos aspectos que permitan establecer una asociación de causalidad entre estas patologías y factores medioambientales ([García 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 observados 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 y 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 ([Newbold y McLachlan, 1985](#); [Soto et al., 1996](#)). El hecho de que estemos asistiendo a un incremento importante de estas patologías en determinadas áreas geográficas y que estos cambios estén ocurriendo en el curso de unas pocas generaciones orienta sobre la búsqueda de causas ambientales ([Toppari et al., 1996](#)), actuando quizás sobre un fondo de predisposición genética que implicaría alguna forma de susceptibilidad individual ([Nef y Parada, 2000](#)).

Desde la perspectiva de la clínica humana, uno de los hechos más relevantes es que bajo la luz de la hipótesis del síndrome de disgenesia testicular (TDS) una gran parte de los problemas clínicos derivados tienen un origen pre- o perinatal. De hecho esta particularidad es evidente y universalmente aceptada para aquellas enfermedades diagnosticadas en el momento del nacimiento (hipospadias y criptorquidia), pero de menor claridad para el caso del cáncer testicular. Gran parte de la actividad científica de distintos grupos de investigación, se ha centrado en la propuesta de que el cáncer testicular tiene origen en las anomalías celulares que se producen durante el desarrollo fetal intrauterino. Dentro de la hipótesis general de la disrupción endocrina, la asociación entre exposición a compuestos químicos y riesgo de enfermedades hormono-dependientes tales como aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino ha sido escasamente explorada por lo que estudios a este respecto son necesarios.

1.1. Hormonas y desarrollo génito-urinario masculino

La diferenciación sexual humana ocurre durante el primer trimestre de la gestación; una gónada indiferente evoluciona a testículo bajo la influencia del gen SRY, presente en el cromosoma Y y otros genes autosómicos. Los órganos reproductivos femeninos se desarrollan en ausencia del gen SRY y por lo tanto en ausencia de testículo (Toppari, *et al.*, 1995).

El testículo comienza a ser hormonalmente activo en la octava semana de gestación. Las células de Sertoli, bajo la acción de la hormona estimulante del folículo (FSH), producen la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS), la cual induce la regresión de dichos conductos -que se desarrollarían en oviductos, útero y parte superior de la vagina-, participa en la fase abdominal del descenso del testículo e incrementa el número de receptores androgénicos en la membrana de las células de Leydig (Gill and Kogan, 1997). La FSH actúa mediante un mecanismo de *feedback* negativo por lo que la presencia de estrógenos exógenos *in útero* puede inhibir la secreción de esta hormona por la hipófisis del feto, lo que influiría negativamente en la proliferación de células de Sertoli, que sólo tiene lugar en la vida fetal y neonatal temprana, reduciendo el número de células disponibles en la vida adulta para la producción de semen (Sharpe, 1993). Cada célula de Sertoli puede nutrir a un número finito de células germinales que se desarrollarán en espermatozoides maduros (Carlsen, 1995).

Por último, las células de Sertoli regulan el desarrollo y función temprana de las células de Leydig, las cuales, durante las semanas décima y undécima y bajo el estímulo de la gonadotropina coriónica placentaria (hCG) y la hormona luteinizante (LH), segregan testosterona para promover la diferenciación de los conductos de Wolff embrionarios a órganos sexuales masculinos, epidídimo, vesículas seminales y vasos deferentes; la testosterona juega además un papel muy importante en el descenso de los testículos en la vida fetal tardía. El desarrollo de los genitales externos se completa en las semanas décima a decimoquinta de gestación y es dependiente de la conversión por la enzima 5α -reductasa de la testosterona en dihidrotestosterona, la cual se une a los receptores androgénicos de los órganos sexuales; la masculinización del resto del cuerpo es también controlada por los andrógenos y ocurre tras la conversión de testosterona, procedente del testículo, en 5α -dihidrotestosterona en los órganos diana (Gill and Kogan, 1997).

La evaluación hormonal en el feto masculino muestra una primera oleada de testosterona entre la semana 11 y 16 de gestación por encima de 230 ng/dl y al final

de la gestación, debido al *feed-back* negativo en la hipófisis por el elevado nivel materno de estrógenos. La testosterona fetal cae hasta 75-100 ng/dl tras el nacimiento. El descenso en la circulación de estrógenos maternos estimula la síntesis de gonadotropinas hipofisarias y produce un segundo pico de testosterona, con niveles máximos a los 60 días de vida, lo que es decisivo para el descenso espontáneo del testículo no descendido observado clínicamente en los primeros tres meses de vida (Gill and Kogan, 1997).

La acción de los estrógenos sobre la diferenciación sexual humana es controvertida, pero con analogía a la situación en el adulto, probablemente juegue un papel en la regulación y diferenciación de las células de Leydig. En ratas y conejos, la síntesis de estrógenos es activada en los embriones machos y hembras en el mismo momento de la implantación del blastocito en el útero (Toppari, *et al.*, 1995). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la expresión del receptor estrogénico en todas las células del blastocito de ratón, y en las gónadas y tracto reproductivo de machos y hembras de ratón en los días 13 y 15 de la gestación (Gorski and Hou, 1995; Toppari, *et al.*, 1995).

Los estudios anteriores sugieren que los estrógenos intervienen desde estadios tempranos en el desarrollo embrionario de los mamíferos y en el desarrollo de las gónadas, pero no controlan la diferenciación sexual, que depende claramente de la testosterona. Las alteraciones en la diferenciación sexual ocurren cuando actúan factores equivocados en la cascada del desarrollo masculino, o cuando una hembra está expuesta a elevadas concentraciones de andrógenos; en el primer caso, se desarrollará un fenotipo femenino y en el segundo, la hembra estará virilizada.

Dos estudios sobre la supresión del receptor estrogénico en el ratón y un receptor defectuoso en un paciente masculino han contribuido a clarificar la posible importancia de los estrógenos endógenos en el desarrollo sexual. En el primero de ellos (Lubahn, *et al.*, 1993) se produjo una disrupción del receptor estrogénico mediante delección, lo que resultó en una completa resistencia a los estrógenos. Machos y hembras sobrevivieron hasta adultos sin anomalías morfológicas aparentes; sin embargo, las hembras fueron infértiles, con una hipoplasia uterina y ovarios hiperémicos que no contenían ningún cuerpo lúteo; la fertilidad de los machos también estaba disminuida, el tamaño testicular fue pequeño y los contajes espermáticos fueron menores del 10% de los de los controles. Estos hallazgos sugieren que los estrógenos son necesarios, pero no indispensables, para el desarrollo sexual fetal. En el segundo estudio (Smith, *et al.*, 1994) se describe un caso de un hombre de raza blanca de 28 años de edad, con resistencia a los estrógenos por presentar un receptor defectuoso. Se observó un cierre de las epífisis incompleto, por lo que el sujeto

continuó con crecimiento lineal después del desarrollo puberal; estaba normalmente masculinizado, con funciones sexuales normales, pero con pobre calidad seminal y altos niveles de estrógenos en plasma (Toppari, *et al.*, 1995). En resumen, un fenotipo masculino normal puede desarrollarse en ausencia de la acción de los estrógenos a través de su receptor, pero la calidad del semen, y probablemente la fertilidad, se verán comprometidas en ausencia de estrógenos.

En sentido totalmente opuesto, cuando existe una sobreexpresión del receptor estrogénico, hecho que se ha experimentado con ratones transgénicos, se ha observado una diferenciación normal de los órganos sexuales. Sin embargo, las hembras tuvieron problemas de fertilidad y sus gestaciones fueron prolongadas, con pérdida de camadas debido a las dificultades en el parto. En los machos no se encontraron problemas de fertilidad. Tanto en machos como en hembras aparecieron hernias en la pared abdominal; esto es interesante porque ya estaba descrito cómo la administración de estrógenos induce hernias inguinales en el ratón macho y en perros y se considera que las hernias inguinales pueden ser un factor de riesgo para el cáncer de testículo (Toppari, *et al.*, 1995).

La producción seminal es dependiente de las acciones de la FSH y de la testosterona y depende también del número de células de Sertoli que haya en los túbulos seminíferos. La supresión de secreción de FSH por actuación estrogénica durante el período de proliferación de las células de Sertoli (período perinatal), puede determinar la aparición de testes pequeños y una baja capacidad de producción de esperma en la vida adulta. En el momento presente no se sabe si el número de células de Sertoli ha disminuido sensiblemente en el hombre actual y si ésta es la razón para el descenso de los recuentos espermáticos (Toppari, *et al.*, 1995, Hirvonen-Santti, *et al.*, 2003).

La asociación entre desórdenes de la diferenciación sexual y del desarrollo de las gónadas y la aparición de malignidad gonadal está en la actualidad firmemente establecida (Berkowitz *et al.*, 1993). La anomalía que más frecuentemente conduce a neoplasia gonadal es la disgenesia; otros desórdenes incluyen el hermafroditismo verdadero y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos. Tomando como ejemplo el intersexo o hermafroditismo, el crecimiento maligno aparece tempranamente en la infancia, lo que sugiere que el proceso carcinogénico se inició *in útero*. El síndrome de intersexo abarca un conjunto de desórdenes genéticos diferentes, pero todos conducen a un resultado común, el cáncer de células germinales, indicando que una disrupción temprana del desarrollo gonadal puede hacer susceptibles a las células germinales a una neoplasia, por mecanismos desconocidos. En el síndrome de

insensibilidad a los andrógenos, una inapropiada inducción hormonal puede detener la diferenciación gonadal fetal y conducir más tarde a una neoplasia.

1.2. Disruptores endocrinos

El término disruptores endocrinos (Endocrine Disrupting Chemicals/ EDCs) define hoy día a un grupo 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 (COM, 706). En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los ensayos habituales de toxicidad no habían atribuido efecto importante alguno. Además, muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen características óptimas para haber sido, y ser empleados, en grandes cantidades y con gran libertad sin protección medio ambiental especial. En otras ocasiones se trata de compuestos bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los conocidos y caracterizados POPs o contaminantes orgánicos persistentes, sobre los que se han establecido medidas de control adecuadas.

Los efectos hormonales de los disruptores endocrinos pueden ser debidos a que: 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, y/o 4) modifican los niveles de los receptores hormonales (Colborn *et al.*, 1993, Fernández *et al.*, 1998).

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

1. El momento de la exposición es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto. Los efectos son distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto. Si actúan durante un periodo crítico caracterizado por una diferenciación celular o por organogénesis, como por ejemplo en los estadios tempranos de la vida, las lesiones que producen son 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. La exposición embrionaria puede tener consecuencias que no son evidentes hasta la madurez del individuo. 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, ese nivel de concentración es muy inferior al reconocido como límite de seguridad para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.

4. Es posible la acción combinada de los disruptores que pueden adquirir al actuar conjuntamente un efecto paradójico, ya sea sinérgico, antagónico o simplemente aditivo.

Como se ha dicho anteriormente, una de las acciones hormonales mejor documentada atribuible a los disruptores endocrinos es su capacidad de mimetizar o bloquear el efecto de los estrógenos, es decir, la posibilidad de actuar como un estrógeno o como un antiestrógeno. 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, a muy altas concentraciones (Olea *et al.*, 1999). Todo esto ha llevado a considerar de forma especial dentro del grupo de los disruptores endocrinos a esta clase de moléculas que se incluyen todas bajo el epígrafe de xenoestrógenos, entendiendo por tales todos aquellos compuestos que manifiestan actividad estrogénica en ensayos *in vitro* e *in vivo* independientemente de su estructura química, procedencia y aplicaciones (Olea *et al.*, 1996).

1.3. Exposición infantil a disruptores endocrinos

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 (Waliszewski *et al.*, 2000, Sala *et al.*, 2001, Waliszewski *et al.*, 2001, Falcon *et al.*, 2004). Esto supone una importante liberación a sangre de compuestos que la madre ha acumulado en su tejido adiposo, fundamentalmente debido a la liposolubilidad y persistencia de los mismos, a lo largo de años de exposición a través de diversas fuentes: alimentaria, ambiental, laboral, etc. No obstante, no es descartable la exposición aguda, de gran repercusión clínica, si ha acontecido en momentos críticos como el período previo a la gestación y durante la misma. En cualquier caso, a través de la placenta el feto se impregna de la exposición histórica de la madre a estos compuestos, que pasan así a acumularse en

su propio tejido adiposo. Según esto, los mayores niveles de xenobióticos determinados en niños de corta edad reflejarán casi con exclusividad niveles maternos más elevados, ya que no parece plausible que en tan corto período de tiempo las diferencias en las concentraciones de xenobióticos pudieran atribuirse a las diferencias en la exposición a otras fuentes, como el tipo de dieta ingerida por los niños, ya que la exposición alimentaria no ha sido documentada.

La exposición intrauterina, perinatal y postnatal se ha denunciado frecuentemente, sobre todo para aquellas sustancias que se sabe que pasan libremente la barrera placentaria o que se segregan en la secreción láctea (Waliszewski *et al.*, 2001, Harris, *et al.*, 2001, Polder, 2003, Barakat, 2004). Aunque las consecuencias a largo plazo de esta exposición temprana no son bien conocidas, lo cierto es que las observaciones experimentales y los datos provenientes del mundo animal crean el clima apropiado para pensar que el asunto es, cuanto menos, digno de ser estudiado en profundidad y encaja muy bien en la base conceptual de la hipótesis del síndrome de disgenesia testicular.

1.4. Criptorquidia e hipospadias como patologías idóneas para el estudio de asociación entre exposición a disruptores endocrinos y patología hormonodependiente en humanos.

Los datos de exposición y acumulo de compuestos químicos organoclorados, especialmente DDT/DDE y otros pesticidas en leche materna, cordón umbilical y placenta, pueden ofrecer información útil en la investigación de la hipótesis medio ambiental en criptorquidia y/o hipospadias. La base común en los estudios de exposición humana a compuestos químicos y el riesgo de padecimiento de criptorquidia e hipospadias es que, la actividad hormonal atribuida a algunos de estos compuestos es un elemento clave en la disrupción del equilibrio hormonal durante el desarrollo genitourinario masculino. Diferentes grupos de trabajo han abordado diseños epidemiológicos de distinta base con el objetivo de analizar la hipótesis de disrupción endocrina. Así por ejemplo, García-Rodríguez y colaboradores (1996) en un estudio epidemiológico realizado en la provincia de Granada, establecieron que el riesgo de orquidopexia se relacionaba de forma significativa con el consumo de productos fitosanitarios en los municipios de residencia de los niños intervenidos de criptorquidia. Posteriormente, Weidner y colaboradores (1998) encontraron que entre los antecedentes familiares de los niños diagnosticados de criptorquidia o hipospadias

destacaban la ocupación materna en actividades agrícolas, circunstancia que fue posteriormente confirmada en la Comunidad Valenciana por el trabajo de García (1999). Estudios posteriores en los que se midió la presencia de varios pesticidas y el riesgo de criptorquidia, concluyeron que si bien no se encontraba un exceso significativo en el riesgo de aparición de esta patología en niños, en relación con la presencia de algún pesticida en particular, si se consideraba conjuntamente la exposición a cualquiera de ellos, se aprecia una tendencia a una mayor frecuencia de presentación de la patología (Rueda-Domingo *et al.*, 2001; Lopez Navarrete, 2000).

Aunque los estudios existentes hasta la fecha no son concluyentes para confirmar la asociación entre disruptores endocrinos y riesgo de malformación del tracto genitourinario, tampoco son lo suficientemente demostrativos de la no existencia de tal asociación. Por ésta razón se ha sugerido en más de una ocasión que este aspecto de la patología hormonal debería ser investigado más en profundidad dando respuesta y resolviendo al menos dos problemas metodológicos que no han sido convenientemente tratados: i) la mala clasificación de los pacientes en lo que a grado de criptorquidia se refiere y ii) la dificultades en la estimación de la exposición a disruptores endocrinos.

En los apartados siguientes se trata de actualizar la información a este respecto, revisando los conceptos de criptorquidia e hipospadias, detallando los factores de riesgo identificados hasta la fecha y, por último, definiendo nuevos métodos de investigación de exposición medioambiental.

1.4.1. Criptorquidia

El término criptorquidia procede del griego “kriptós”, escondido, y “orchis”, testículo. En términos generales se considera que un testículo es criptorquídico cuando *nunca ha estado en su situación normal en la bolsa escrotal ni se consigue desplazarlo a ella con la exploración física, pero se encuentra en el trayecto normal de descenso, siendo, por tanto, un descenso defectuoso o incompleto del testículo desde su origen retroperitoneal hasta su situación definitiva en el escroto*. El concepto engloba aquellas situaciones que asocian una alteración en el descenso normal del teste de un forma uni o bilateral.

El descenso testicular a través del canal inguinal comienza en la octava semana postconcepción y a las 40 semanas se ha completado. Este descenso tiene

lugar en dos fases. En la primera, que es independiente de los andrógenos, el testículo desciende desde su posición intra abdominal hasta el anillo inguinal interno, hecho que se completa en la semana 12, y permanece a este nivel hasta la semana 26-28; en la segunda fase el testículo desciende hasta el escroto durante el tercer trimestre o en los primeros meses del postparto, proceso que es andrógeno-dependiente (Hutson, *et al.*, 1997). La mayoría de los casos de criptorquidia parecen producirse después de la semana 25 de gestación (Moller and Weidner *et al.*, 1999) y teóricamente cualquier condición en la madre o en el feto que altere la producción de andrógenos puede conducir a la aparición de criptorquidia (Hjertkvist, *et al.*, 1989).

Scorer (1964) definió un testículo como criptorquídico cuando no puede ser arrastrado como mínimo 4 cm por debajo de la cresta púbica en cualquier momento antes de un año de edad, criterio según el cual es muy improbable que el testículo descienda espontáneamente. Son múltiples las clasificaciones de criptorquidia propuestas y el situar un testículo criptorquídico dentro de una u otra localización se dificulta por la subjetividad de la exploración y por cómo se diagnostica la criptorquidia: tras simple palpación, tras manipulación e intentar llevar el testículo al escroto o a la posición más baja posible o de acuerdo a los hallazgos del acto quirúrgico (Withaker, 1992).

El concepto clínico de criptorquidia no debería incluir las falsas criptorquidias constituidas por los testículos susceptibles de descender espontáneamente al escroto, es decir testículos hipermóviles u oscilantes o los testículos retráctiles en ascensor, que han estado alguna vez en el escroto y puede ser llevado a la bolsa mediante determinadas maniobras desde su posición inguinal. Por último, el testículo ectópico, es decir, aquél que no se encuentra en el escroto y está fuera de la trayectoria normal de descenso del testículo se incluiría dentro de una situación de mal descenso testicular pero no como criptorquidia (Garat, 1987(b)).

En la clasificación que se propone a continuación, se engloban los testes no palpables, ya sea por su ausencia o por encontrarse en la zona intraabdominal; y las criptorquidias restantes donde el testículo es palpable y se clasifican considerando que la posición del testículo será la más baja a la que éste puede llevarse por manipulación sin tensión: 1. Testículos no palpables; 2. Testículos palpables: Escrotal; Escrotal alto; Inguinal

En general, la localización más frecuente del testículo no descendido es junto al cuello del escroto o inmediatamente por fuera del anillo inguinal externo (Hutson, 1997).

La criptorquidia es uno de los problemas urológicos pediátricos más frecuentes (Berkowitz *et al.*, 1995; Swerdlow *et al.*, 1997; Moller y Weidner, 1999). La prevalencia al nacimiento es de alrededor del 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 (Garat, 1987(b); Kaplan, 1993; Husmann y Levy, 1995), sin embargo en más del 50% de los casos los testículos descienden definitivamente entre las 6 semanas y los 3 meses de edad (Tzvetkova y Tzvetkov, 1996; Hutson *et al.*, 1997). En la población infantil a partir del año de vida (incluyendo pretérminos y recién nacidos a término) se considera una incidencia entre el 0,8% y el 1,1% (Garat, 1987(b); Palmer, 1991; Husmann y Levy, 1995). En adultos se ha descrito una incidencia aproximada del 0,7-1% (Garat, 1987(b); Berkowitz *et al.*, 1993). Las tasas de orquidopexia, usadas como medida de la prevalencia de criptorquidia, indican que para la presentación unilateral de criptorquidia se ha realizado en el 5% de los chicos al alcanzar la pubertad (Hutson *et al.*, 1997). La presentación bilateral de criptorquidia ocurre en el 10-25% de los casos (Morley y Lucas, 1987; Garat, 1987(b)).

Los datos al nacimiento procedentes de diversas publicaciones parecen indicar un incremento de criptorquidia en los últimos años, si bien los datos epidemiológicos de prevalencia son muy variables y de difícil comparación. De hecho, la propia clasificación del testículo criptorquídico, el momento en que se hace el diagnóstico de la enfermedad (Jensen, 1995), la técnica de exploración utilizada, e incluso la presencia de posibles efectos medioambientales en los diferentes países, pueden ser causas determinantes de que la prevalencia se sitúe con valores tan dispares, entre 4-42 por cada 10.000 niños nacidos. 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.

En Inglaterra, la incidencia de criptorquidia aumento más del 60% entre 1950 y 1980 (Figura 1). En el estudio realizado por Scorer a finales de los años 50 (Scorer, 1964), en el que se incluyeron 3500 niños nacidos en un hospital de Londres, la prevalencia de criptorquidia al nacimiento fue del 21% en los niños de bajo peso al nacer (<2500 g) y del 2,7% para los de peso normal (\geq 2500 g), mientras que a los tres meses de edad los valores obtenidos fueron de 1,74% para niños con bajo peso (<2500 g) y de 0,91% para niños con peso \geq 2500 g. Usando el mismo criterio descrito por Scorer (definición de caso y técnica de exploración), Ansell y colaboradores en los años 80 (John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Study Group, 1992), realizaron un estudio donde incluyeron a 7441 niños, en el que observaron una prevalencia a los tres meses del nacimiento en niños con peso inferior a 2500 g, de un 5,2 % y 1,61 %

en los de peso superior a 2500 g, indicando un incremento significativo en comparación con los datos presentados por Scorer (Toppari, *et al.*, 2001). También, Chilvers y colaboradores (Chilvers, 1984) utilizando datos hospitalarios encontraron en Inglaterra y Gales un incremento en el número de intervenciones de orquidopexia efectuadas antes de los 15 años de edad (1,4% para la cohorte de niños nacidos en 1952 y 2,9% para la de nacidos en 1977). Sin embargo, es difícil diferenciar si esta observación reflejaba un incremento real en la prevalencia de criptorquidia o si respondía a la inclusión de niños con testes retráctiles a los que se practicó cirugía. En Escocia, el número anual de diagnósticos al alta de criptorquidia en niños de 0-14 años se incrementó durante el período 1961-85 (Campbell, 1987). En Dinamarca, la prevalencia de criptorquidia al nacimiento en niños con peso superior a 2500 g varió entre un 1% y un 1,8%, en series de datos obtenidos al final de los años 50 (Toppari, *et al.*, 1995). El análisis de la cohorte de datos del Registro Nacional Danés durante el período 1982-85 indicó una prevalencia de aproximadamente un 2% (Thorup, 1990).

Por otro lado atendiendo a la frecuencia de casos de criptorquidia según la localización del testículo (Garat, 1987(b)), podemos obtener la siguiente distribución: intraabdominal (10%), inguinal (20%), emergente o preescrotal (45%) y ectopia intersticial (teste por arriba y fuera del orificio del conducto inguinal) (25%), aunque estas cifras varían en otras series dependiendo de las clasificaciones topográficas utilizadas: bolsa inguinal superficial (67%), preescrotal (14%) e intraabdominal (5%).

En resumen, algunos datos epidemiológicos indican inequívocamente un incremento en la prevalencia de criptorquidia, pero serían necesarios más estudios regionales prospectivos en los que los criterios diagnósticos sean coincidentes.

1.4.2. Hipospadias

La fusión de los pliegues uretrales y la canulación del glande del pene en el embrión se producen entre la 8ª y la 14ª semana de gestación, bajo la influencia de las hormonas androgénicas producidas por los testículos fetales (Moller and Weidner, 1999). La no fusión de dichos pliegues o la falta de una normal canulación del glande, conduce a la aparición de hipospadias.

La uretra peneana se desarrolla en la cara inferior del tubérculo genital a partir de un prolongamiento anterior de la membrana urogenital que prolifera activamente hasta la base del glande, mientras que la formación de la uretra del glande es independiente y comienza por una invaginación del epitelio que luego se tubuliza y se une a la uretra peneana (Garat, 1987).

El hipospadias es una anomalía congénita de la uretra y del pene, como consecuencia del cierre anómalo de la ranura uretral fetal, terminando la uretra en la superficie ventral del falo, entre el lugar que normalmente ocupa el meato uretral y el periné (Revert, 1988). Los dos elementos fundamentales que lo definen son: defecto ventral de la uretra e incurvación ventral del pene; esta última está en relación directa con la topografía del meato uretral: más incurvación cuanto más proximal sea (Garat, 1987).

Se distinguen los siguientes tipos de hipospadias: 1. Coronal; 2. Del surco; 3. Penoscrotal; 4. Escrotal; 5. Perineal.

Los datos de prevalencia de hipospadias al nacimiento varían considerablemente en la literatura, desde 0,37 hasta 41 por cada 10.000 niños, y son difíciles de comparar debido a las posibles diferencias en la valoración e inclusión de aquellos casos menos severos. No obstante, diversas publicaciones han mostrado un incremento sustancial en la aparición de esta patología, en países como Inglaterra y Gales, Hungría, Suecia, Noruega, Dinamarca, Finlandia, España, Nueva Zelanda, Australia y Checoslovaquia (Toppari, *et al.*, 1995; Paulozzi, 1999; Toppari, 2001).

Los datos daneses, suecos y noruegos están basados en un registro nacional que incluye a la totalidad de la población (ICBDMS –The International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring System). En Dinamarca durante el período 1970-1981 se produjo un incremento de hipospadias de 7,5 casos a 12 por cada 10.000 nacimientos y otro aumento similar posterior durante el período 1982-1988. En Suecia los datos indican un incremento a principios de los años 70; donde la prevalencia de hipospadias al nacimiento fue un 40% más elevada entre 1974-1982 que cuando se la

compara con la del período 1965-1968. De igual forma, los datos noruegos muestran un incremento de hipospadias al nacimiento desde 7-8 por cada 10.000 nacidos entre 1967-1971 hasta 13 por cada 10.000 niños en 1973; siendo la prevalencia en 1988 de 20,7 por cada 10.000 nacimientos (Toppari, *et al.*, 1995).

La prevalencia de hipospadias en Finlandia es considerablemente más baja que la de otros países escandinavos próximos, hecho similar a lo observado para el cáncer de testículo y la calidad del semen (Jensen, 1995; Virtanen, 2001). De la misma manera en EEUU también se ha observado un incremento en la prevalencia de hipospadias durante el período 1968-1993, utilizando datos procedentes de dos sistemas de vigilancia de esta patología previamente existentes y bien establecidos (Paulozzi *et al.*, 1997; Flores-Luévano *et al.*, 2003).

1.4.3. Epidemiología de la criptorquidia

En el estudio realizado por Depue en EEUU, con datos del Proyecto de Colaboración Perinatal del Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y de Comunicación, que incluye 50.000 embarazos entre 1958 y 1965, la prevalencia obtenida de criptorquidia en niños blancos que viven como mínimo hasta los 7 años de edad fue de 2,62%. Esta cifra es comparable al 3,38% obtenido por Swerdlow en Inglaterra para la prevalencia de orquidopexia (Depue, 1984). En otra investigación llevada a cabo por Berkowitz y colaboradores con todos los niños nacidos en el Hospital Monte Sinaí de Nueva York (excluidos gemelos) durante el período Octubre 1987 a Octubre de 1990, se utilizó la técnica y definición de testículos no descendidos de Scorer y del grupo de estudio de criptorquidia del Hospital John Radcliffe, y se examinaron los niños en el momento de nacer, a los tres meses y al año. La prevalencia de criptorquidia al nacimiento se calculó en un 3,45% y al año de edad fue del 1,08% (Berkowitz *et al.*, 1995). En el 2001 en España, se realizó un estudio retrospectivo de casos-contróles, en el que se determinó que la prevalencia de criptorquidia en la provincia de Granada era del 0,91% (Rueda-Domingo *et al.*, 2001). Boisen y colaboradores han publicado recientemente un estudio, en el que la prevalencia de criptorquidia en el nacimiento ha sido de 9,0% en Dinamarca y 2,4% en Finlandia. A los tres meses de edad los valores descienden a un 1,9% y un 1,0% respectivamente (Boisen *et al.*, 2004).

La criptorquidia representa el trastorno más frecuente en la diferenciación sexual en los varones (Møller 1999), que aunque infrecuentemente amenaza la vida del paciente, puede resultar una afectación de la función testicular en la vida adulta

debido a su asociación con infertilidad y malignidad testicular (Garat, 1987(b); Swerdlow, 1997; Skakkebeak, 2001). El antecedente de criptorquidia se asocia con disminución del volumen testicular y progresiva degeneración histológica con pérdida de células germinales y disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y fibrosis de los mismos, así como, con alteraciones de las vías espermáticas y de la concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides, hechos estos que conducen a infertilidad (Chilvers, 1986; Garat, 1987(b)).

Se ha publicado un alto porcentaje de esterilidad en pacientes con criptorquidia bilateral, corregida o no quirúrgicamente (el 79% de los sujetos son infértiles, 15% subfértiles y sólo un 6% muestran un recuento espermático superior a los 40 millones), sin embargo, en casos de afectación unilateral se ha constatado tanto fertilidad normal como subfertilidad (el 33% de los casos son infértiles, el 31% subfértiles y sólo el 36% tienen un recuento espermático superior a 40 millones) (Garat 1987(b), Grasso 1991); según algunos autores esta diferencia puede explicarse en función del momento en el que se produce la escrotalización (Garat 1987(b)). Los testículos de localización intracanalicular o abdominal presentan peor pronóstico en cuanto a la fertilidad que aquellos de localización inguinal (Hutson 1997).

En relación a la malignidad testicular, la criptorquidia es el único factor de riesgo bien establecido para el cáncer de testículo (Berkowitz *et al.*, 1995; Skakkebaek, 2001; Boisen *et al.*, 2004), de forma que aproximadamente entre el 4-11% de las personas con tumores malignos de esta localización tienen historia de criptorquidia. La incidencia de carcinoma *in situ* en biopsias de pacientes con antecedentes de criptorquidia oscila entre el 1,7%-3% (Cortes, 1994). Está ampliamente reconocida la predisposición del testículo criptorquídico en un adulto para padecer tumores de células germinales, con un riesgo de 4 a 50 veces mayor (Garat, 1987(b); Pinczowski, 1991; Cortes, 1994), aunque investigaciones más recientes lo sitúan en 5 a 10 veces superior (Hutson, 1997); también el testículo escrotal en las criptorquidias unilaterales tiene mayor riesgo, aunque no tan elevado (Garat, 1987(b)). El riesgo de tumor en un testículo intraabdominal es seis veces mayor que en un testículo criptorquídico en otra localización (Gill and Kogan, 1997); el 50% de los tumores aparecen sobre testes intra abdominales y aunque puede desarrollarse cualquier tumor, los seminomas son el tipo más frecuente y los teratomas son más raros que en los testículos escrotales (Garat, 1987(b)).

En el estudio realizado por Swerdlow (1997), en el que se incluyeron 1075 niños con criptorquidia tratados con orquidopexia u hormonas durante el período 1951-64 en un hospital de Londres, se obtuvo un riesgo relativo para la aparición de cáncer

de testículo de 7,5 (Intervalo de confianza (IC) del 95%: 3,9-12,8). Este riesgo fue similar al calculado en otros estudios epidemiológicos también de cohortes, en los que el rango oscila entre 5-7. Cuando el diseño epidemiológico es del tipo caso-control, el riesgo relativo se sitúa en un rango de 5-10 (Giwercman, 1987; Pinczowski, 1991). Sin embargo, el riesgo de cáncer de testículo en relación a los diferentes tipos de criptorquidia no está bien establecido y parece ser que la susceptibilidad a la malignidad está determinada por factores prenatales que dañan el testículo produciendo la criptorquidia, más que por la posición del testículo no descendido (Swerdlow, 1997).

Factores de riesgo de criptorquidia

No son muchos los estudios realizados que identifiquen factores de riesgo claramente asociados a la aparición de esta malformación y los datos presentados son conflictivos porque en la mayoría de ellos no se utiliza una definición estandarizada de criptorquidia (Berkowitz *et al.*, 1995). No obstante la precariedad de información, los factores de riesgo descritos pueden agruparse como sigue:

A) Factores maternos:

- Edad: se ha encontrado mayor riesgo tanto en el caso de hijos de madres gestantes jóvenes (Depue, 1984; Hjertkvist *et al.*, 1989), como para aquéllas de edad avanzada (Berkowitz *et al.*, 1995; Akre *et al.*, 1999; Flores-Luevano *et al.*, 2003) aunque otros autores no observan asociación con la edad materna (Weidner *et al.*, 1999).
- Nivel socioeconómico: la clase social baja se asocia con mayor frecuencia a aparición de criptorquidia (Akre *et al.*, 1999; Moller y Weidner, 1999; Weidner *et al.*, 1999, Rueda-Domingo *et al.*, 2001).
- Índice de masa corporal (índice de Quetelet) durante el embarazo: un índice elevado (sobrepeso, obesidad) está asociado a bajos niveles de SHBG, lo que incrementa los niveles maternos de estrógenos libres, situación que conduciría a un exceso de riesgo para la criptorquidia (Depue, 1984; Berkowitz *et al.*, 1995; Kurahashi y Kishi, 2003).
- Edad de la menarquia: los hijos de madres con edad de la menarquia tardía (después de los 15 años) tienen mayor riesgo de presentar criptorquidia (Czeizel, 1995).

- Historia obstétrica: a) paridad o número de hijos: en general, en la mayor parte de los estudios, se ha encontrado una asociación entre baja paridad materna y la aparición de criptorquidia en sus hijos, presentando mayor riesgo el primero de los hijos ([Akre et al., 1999](#); [Moller y Weidner, 1999](#); [Weidner et al., 1999](#); [Biggs et al., 2002](#)), así como mujeres con algún alumbramiento previo ([Berkowitz et al., 1995](#)), b) número de abortos: las madres con 3 ó más abortos espontáneos previos tienen más riesgo de tener un hijo con criptorquidia ([Berkowitz et al., 1995](#)). No se ha encontrado asociación entre el riesgo de criptorquidia y el nacimiento previo de un recién nacido muerto ([Depue, 1984](#)); c) enfermedades durante el embarazo: las que se han asociado con una mayor frecuencia de presentación de criptorquidia son las siguientes: hipertensión arterial (HTA) durante el embarazo (eclampsia, preclampsia) ([Berkowitz et al., 1995](#); [Moller y Weidner, 1999](#); [Biggs et al., 2002](#); [Wang y Wang, 2002](#)), que está relacionada con una mala función de la placenta y por lo tanto con niveles de hormonas sexuales alterados ([Akre et al., 1999](#)); hiperemesis, pues la presencia de vómitos está asociada a elevados niveles de estrógenos maternos; fiebre en el primer trimestre del embarazo ([Wang y Wang, 2002](#)); diabetes, al influir negativamente la función placentaria y debido a una secreción supranormal de hCG que produciría una hiperplasia de las células de Leydig y finalmente un mayor riesgo de criptorquidia ([Berkowitz et al., 1995](#)), la presencia de hemorragia al final del embarazo ([Akre et al., 1999](#)) junto con amenaza de aborto en el primer y/o segundo trimestre ([Wang y Wang, 2002](#)); d) consumo de hormonas sexuales durante el embarazo: del tipo de estrógenos, DES y contraceptivos al inicio del embarazo ([Brucker-Davis et al., 2003](#); [Kurahashi y Kishi, 2003](#)); Rothman y Louik en 1978 encontraron un riesgo relativo de criptorquidia de 1,9 para las madres que consumían anticonceptivos orales (ACO) un mes antes de la concepción o después de forma inadvertida antes de conocer el embarazo ([Depue, 1984](#); [Morley y Lucas, 1987](#)); e) Insuficiencia placentaria: el papel etiológico de la insuficiencia placentaria en la aparición de criptorquidia se apoya en tres hechos: i) es junto al parto de nalgas una de las causas más frecuentes de realización de cesárea; ii) la mala función placentaria tiene como consecuencia recién nacidos más pequeños para la edad gestacional, y por último, iii) el sangrado en el tercer trimestre y la amenaza de aborto están asociados a la insuficiencia placentaria, y también son factores de riesgo para la criptorquidia ([Rueda-Domingo et al., 2001](#); [Biggs et al., 2002](#)).

B) Factores neonatales:

- Presentación fetal: se ha observado mayor riesgo de criptorquidia para la presentación de nalgas, como consecuencia de que esta posición compromete la circulación fetal a nivel escrotal que puede dañar el testículo y alterar su producción de dihidrotestosterona, necesaria para el descenso y cierre del anillo inguinal ([Berkowitz et al, 1995](#); [Akre et al., 1999](#); [Moller y Weidner, 1999](#); [Biggs et al., 2002](#)).

- Terminación del parto: se ha descrito mayor riesgo para los niños nacidos mediante cesárea ([Berkowitz et al, 1995](#); [Rueda-Domingo et al., 2001](#)).

- Estación del año al nacer: se ha descrito un efecto estacional con picos de incidencia de criptorquidia en determinados meses del año ([Berkowitz et al, 1995](#); [Czeizel, 1995](#); [Mamoulakis et al., 2002](#)). Puesto que es necesaria una oleada de testosterona para el descenso normal del testículo, pueden existir variaciones estacionales en los niveles de esta hormona ([Berkowitz et al, 1995](#)), en base, por una parte, a las variaciones en la duración de la luz del día según los meses del año, que afecta a la hipófisis y a la producción hormonal, y por otra, en la estacionalidad que presentan algunas enfermedades infecciosas que pueden dañar la función de la placenta, reducir la síntesis de hCG y por lo tanto, la síntesis de testosterona por parte del testículo fetal.

- Peso del neonato: el bajo peso es el factor más fuertemente asociado con esta malformación. El riesgo de criptorquidia se incrementa conforme disminuye el peso del recién nacido, siendo más pronunciado el efecto en niños con peso inferior a 2500 g ([Berkowitz et al, 1995](#); [Czeizel, 1995](#); [Akre et al., 1999](#); [Moller y Weidner, 1999](#); [Weidner et al., 1999](#); [Rueda-Domingo et al., 2001](#); [Biggs et al., 2002](#); [Kurahashi y Kishi, 2003](#)).

- Edad gestacional: los recién nacidos pretérminos tienen más riesgo de padecer criptorquidia ([Berkowitz et al, 1995](#); [Czeizel, 1995](#); [Moller y Weidner, 1999](#); [Rueda-Domingo et al., 2001](#); [Kurahashi y Kishi, 2003](#)), aunque se ha observado que esta asociación desaparece en algunos casos al ajustar por el peso del niño al nacer ([Weidner et al., 1999](#)). La combinación peso al nacer y edad gestacional también es considerada por algunos autores factor de riesgo en criptorquidia ya que recién nacidos pequeños para su edad gestacional presentan mayor frecuencia de criptorquidia ([Berkowitz et al, 1995](#); [Biggs et al., 2002](#); [Kurahashi y Kishi, 2003](#)).

- Presencia de malformaciones congénitas: la criptorquidia frecuentemente se asocia a la hernia inguinal (Moller y Weidner, 1999) y aparece en el 5% de los casos de hipospadias (Garat, 1987; Akre *et al.*, 1999). Es más frecuente, además, en niños con otra malformación congénita asociada (Berkowitz *et al.*, 1995; Akre *et al.*, 1999; Biggs *et al.*, 2002) del tipo de alteraciones de cadera y malformaciones cardíacas (Hjertkvist *et al.*, 1989). Un importante estudio de casos y controles realizado en Dinamarca, que analizó 6177 casos de criptorquidia nacidos entre 1983 y 1992, encontró un riesgo de malformación tres veces mayor en los sujetos que presentaban también hipospadias, así como un riesgo cuatro veces superior en aquéllos que tenían un hermano mayor con criptorquidia (Weidner *et al.*, 1999).

Como puede deducirse de la anterior enumeración de factores de riesgo, son muchas las variables que se han relacionado con la aparición de criptorquidia, algunas veces no de manera concluyente y en otros casos con observaciones contradictorias según los autores. No obstante, dado que los factores de riesgo para la aparición de criptorquidia guardan una íntima relación con aquellos relacionados con el cáncer de testículo y otras neoplasias afines, y puesto que la investigación de éstos es difícil en el cáncer debido a su largo período de inducción y a la dificultad de obtención de información de eventos 20-40 años atrás en el pasado, cobra aún mayor interés el estudio de la criptorquidia para clarificar la etiología común de estas patologías (Skakkebaek *et al.*, 2001).

Patogenia de la criptorquidia

La criptorquidia puede presentarse aisladamente o formando parte de desórdenes congénitos, endocrinos, cromosómicos o estados de intersexo y su etiopatogenia es multifactorial y no está aún totalmente aclarada. Se consideran los siguientes factores para explicar el fallo en el descenso testicular (Berkowitz *et al.*, 1995; Gill y Kogan, 1997; Hutson *et al.*, 1997):

- A) Causas genéticas: existe una predisposición genética para el desarrollo de criptorquidia, apareciendo en el 6% de los niños con padre criptorquídico y se ha demostrado aumentada la presencia de los marcadores genéticos HLA-A11 y A23 en niños con criptorquidia (Martinetti *et al.*, 1992). Es frecuente la asociación de criptorquidia con síndromes como el de Down, Prader-Willi y

Kallmann ([Berkowitz et al., 1995](#)) y en el caso de criptorquidias unilaterales, las lesiones histológicas del testículo escrotal son superponibles a las del testículo criptorquídeo; esto último apoyaría la teoría disgenésica, según la cual la criptorquidia es consecuencia y no causa de las alteraciones del testículo. También es mayor la incidencia en niños con alteraciones del tubo neural como mielomeningocele, anencefalia, etc. ([Hadziselimovic, 1983](#)); se ha encontrado una asociación significativa entre criptorquidia y retraso mental, parálisis cerebral y epilepsia ([Cortada y Kousseff, 1984](#)).

- B) Causas mecánicas: fundamentalmente referidos a la presión de la cavidad abdominal, muy importante para el descenso del testículo, sobre todo a nivel del canal inguinal, ya que en recién nacidos o lactantes con alteraciones de la musculatura abdominal, hernias umbilicales y otros procesos, que tienden a disminuir la presión intraabdominal, se presenta con elevada frecuencia el testículo en el orificio inguinal interno, no encontrándose ninguna otra causa que haya impedido el descenso ([Husmann y Levy, 1995](#)). Uno de los síndromes asociados a la presencia de criptorquidia es el síndrome de Prunne-Belly o también llamado de “ciruela pasa”, que se caracteriza por una debilidad de la musculatura abdominal.

También se han propuesto factores de tipo anatómico, como un desarrollo anormal del *gubernáculum* (ligamento fetal que guía el testículo hasta el escroto, dilatando el canal inguinal hasta un ancho apropiado para el mismo y ayudando a la transmisión de la presión intraabdominal) o alteraciones en su innervación -nervio genitofemoral- o en otras estructuras asociadas, así como las hernias inguinales, que resultan de un cierre incompleto del proceso vaginal ([Berkowitz et al., 1995](#)).

- C) Causas hormonales: como se ha comentado en la sección introductoria de este trabajo, la hipótesis de que es necesario un eje hipotálamo-hipofisario intacto para el normal descenso del testículo se planteó por primera vez en 1931 ([Husmann y Levy, 1995](#)); como se ha visto en los apartados anteriores, existen evidencias del papel parcial que juegan los andrógenos en este descenso: en primer lugar, la incidencia de criptorquidia está incrementada en situaciones de déficit de gonadotropinas como los síndromes de Kallman, Prader-Labhart-Willi, Lawrence-Moon-Bield y en alteraciones de la síntesis de testosterona ([Palmer, 1991](#)); segundo, la dihidrotestosterona y la gonadotropina coriónica

humana pueden vencer la inhibición del descenso del testículo que produce el estradiol en el ratón y en el conejo y en tercer lugar, la administración prenatal en modelos animales de flutamida, un antiandrógeno, produce una incidencia del 50% de criptorquidia (Husmann y Levy, 1995).

Las alteraciones pueden producirse en los distintos niveles de este eje: desórdenes hipotálamo-hipofisarios (los síndromes ya mencionados de déficit de GnRH e hipoplasia hipofisaria con déficit de gonadotropinas), alteraciones testiculares (anorquia, hipoplasia, déficit en la síntesis de MIS, etc.), déficit de 5 α -reductasa y desórdenes en los receptores androgénicos, como los observados en la feminización testicular y en los Síndromes de Reifenstein y de insensibilidad a los andrógenos (Gill y Kogan, 1997).

También niveles excesivos de estrógenos libres durante el embarazo pueden producir falta de descenso testicular, posiblemente a través de la alteración en la secreción hormonal testicular, si bien en el momento presente existen pocos datos que confirmen esta hipótesis, aunque se ha encontrado asociación entre mayores niveles maternos de estradiol libre durante el primer trimestre del embarazo y la presencia de criptorquidia (Jones *et al.*, 1998). Hay varias observaciones que apoyan dicha hipótesis así, i) la toxemia se asocia con la criptorquidia y en ella hay altos niveles de estrógenos. ii) En el primer hijo probablemente los niveles de estrógenos también sean mayores que en los siguientes y por último, iii) también en el hipospadias y otras malformaciones como las de cadera, asociadas a la criptorquidia, están incrementados los niveles de estrógenos. Uno de los argumentos en contra de esta hipótesis estrogénica es que no persisten las estructuras müllerianas en los casos de criptorquidia sometidos a exploración quirúrgica, pero pudiera deberse a que el momento de actuación de los estrógenos sea después de la disolución de dichas estructuras (Husmann y Levy, 1995).

A modo de resumen puede afirmarse que el descenso del testículo es un evento complejo que está mediado por factores mecánicos, genéticos y hormonales y que la criptorquidia se produce cuando falla uno o más de dichos factores implicados (Husmann y Levy, 1995). El síndrome de Disgenesia Testicular (Skakebaek *et al.*, 2001) es un nuevo marco conceptual que trata de explicar las asociaciones entre estas malformaciones, la disfunción y el riesgo de transformación maligna, desde la perspectiva de la disrupción endocrina en el desarrollo embriológico considerando la multifactorialidad del proceso.

1.4.4. Epidemiología del hipospadias.

El hipospadias es, junto a la criptorquidia, la malformación más común del tracto urogenital masculino (Moller y Weidner, 1999). La prevalencia de hipospadias al nacimiento en la literatura varía considerablemente desde 0,37 hasta 41 por cada 10.000 niños nacidos (Toppari, et al.,1995) y son difíciles las comparaciones interterritoriales. En países europeos la prevalencia se cifra entre 1,09-2,11 casos por cada 1000 nacidos (Stoll et al., 1990) y las series varían entre 2,89 (Stoll et al., 1990), 3-8 (Garat, 1987), 4,1(Calzolari et al., 1986) y 1,42 por cada 1000 nacimientos (Toppari et al., 2001) Entre los factores que pueden contribuir a esta variedad poblacional se encuentran: diferentes niveles de certeza diagnóstica, inclusión o no de las formas menores de hipospadias o diferencias étnicas, entre otros. Al igual que para la criptorquidia, se han realizado pocos estudios que ayuden a establecer variaciones geográficas y/o temporales así como a establecer la hipótesis de exposición medioambiental.

La trascendencia de esta patología deriva de los problemas asociados a la misma, que son de tres tipos (Garat, 1987): psicológicos, asociados a la imagen corporal; urinarios, por la producción de un chorro de la orina sin fuerza y mal dirigido y sobre el que existe pobre control; problemas de infertilidad, relacionados con una eyaculación mal dirigida durante el coito, con lo que el semen no puede salir con potencia suficiente, o en otros casos más graves de hipospadias, absoluta imposibilidad para la realización del acto sexual dada la incurvación del pene. Existen también complicaciones asociadas a esta patología del tipo de uretritis e infecciones (Fernández, 1983).

Factores de riesgo del hipospadias

Si son poco frecuentes los estudios disponibles al respecto de la etiología de criptorquidia algo similar ocurre en el caso del hipospadias donde la mayoría de ellos se han centrado en aspectos relacionados con su herencia (Stoll et al., 1990). Muchos de los factores etiológicos de riesgo asociados a hipospadias son comunes en la patología de criptorquidia (Moller y Weidner, 1999):

A) Factores maternos:

- Edad: existen investigaciones que encuentran mayor riesgo para las madres con avanzada edad, específicamente para aquellas que tienen su primer hijo con más de 40 años (Paulozzi *et al.*, 1997; Silver *et al.*, 1999). Sin embargo, la mayoría de estudios no encuentran asociación entre la edad materna y la aparición de hipospadias (Stoll *et al.*, 1990; Weidner *et al.*, 1999) y los resultados en cuanto a esta variable no son del todo concluyentes.

- Nivel socioeconómico: No se ha encontrado relación entre nivel de educación y riesgo de hipospadias, ni tampoco para la residencia urbana o rural (Stoll *et al.*, 1990).

- Hábito tabáquico: no se ha evidenciado un incremento en la aparición de hipospadias en los hijos de madres fumadoras (Stoll *et al.*, 1990).

- Edad de la menarquia: se ha encontrado mayor proporción de madres con menarquia temprana (a los 10 años de edad o antes) en los niños con hipospadias en relación a los controles, aunque otras investigaciones no asocian la edad de la menarquia con un mayor riesgo de presentación de hipospadias (Stoll *et al.*, 1990).

- Historia obstétrica: se ha observado mayor riesgo para mujeres con baja paridad, presentando mayor frecuencia de hipospadias el primer hijo (Akre *et al.*, 1999; Moller y Weidner, 1999; Silver *et al.*, 1999; Weidner *et al.*, 1999; Aschim *et al.*, 2004), aunque no ha sido confirmado por otros autores (Stoll *et al.*, 1990). Respecto a los antecedentes de aborto, se ha encontrado una mayor proporción de mujeres con hijos con hipospadias que tuvieron amenaza de aborto durante el embarazo, pero el número de abortos previos no se ha relacionado con el hipospadias (Stoll *et al.*, 1990). En relación con haber tenido un recién nacido muerto, se han encontrado resultados contradictorios en cuanto a su asociación con el hipospadias (Weidner *et al.*, 1999).

- Enfermedades durante el embarazo: excepto para el sangrado vaginal (Aschim *et al.*, 2004), la eclampsia (Akre *et al.*, 1999) y preclampsia (Aschim *et al.*, 2004) no se ha detectado mayor riesgo de hipospadias en aquellas mujeres que presentaron alguna enfermedad (infecciosas o metabólicas) durante el embarazo (Calzolari *et al.*, 1986).

- Tratamiento hormonal de forma previa o durante el embarazo: la exposición a progestágenos durante el embarazo (como tratamiento frente a la amenaza de aborto,

por historia previa de abortos o contracepción), se ha asociado con una mayor presentación de hipospadias (Paulozzi *et al.*, 1997). Mau encuentra una elevada prevalencia de hipospadias (1,4%) en hijos de madres expuestas a hormonas sexuales (Mau, 1981; Silver *et al.*, 1999); el riesgo es mayor si el consumo ocurrió durante el primer trimestre. Sin embargo, otros autores no encuentran esta asociación, así como tampoco relacionan la toma de contraceptivos antes del embarazo con la aparición de hipospadias (Silver *et al.*, 1999).

B) Factores neonatales:

- Terminación del parto: se han asociado con una mayor frecuencia de aparición de hipospadias el parto inducido y el parto por cesárea (Aschim *et al.*, 2004).
- Factores placentarios: algunos autores han observado menor peso de la placenta en casos con hipospadias que en controles. La insuficiencia placentaria podría conducir a un retraso en el crecimiento del feto y a nacimientos prematuros, factores que a su vez parecen estar asociados con la aparición de hipospadias (Aschim *et al.*, 2004).
- Estación del año al nacer: no se ha detectado un efecto estacional en la presentación de hipospadias (Stoll *et al.*, 1990).
- Peso del neonato: se ha encontrado un menor peso al nacer en los niños que presentan hipospadias en comparación con niños controles (Akre *et al.*, 1999; Moller y Weidner, 1999; Weidner *et al.*, 1999; Aschim *et al.*, 2004). El riesgo de hipospadias se incrementa conforme disminuye el peso, siendo más pronunciado el efecto en niños con peso inferior a 2500 g (Weidner *et al.*, 1999). No obstante, también, hay otros estudios que no encuentran esta asociación (Stoll *et al.*, 1990).
- Edad gestacional: se ha observado una mayor frecuencia de hipospadias en los recién nacidos pretérminos (Moller y Weidner, 1999; Weidner *et al.*, 1999), aunque esta asociación desaparece al ajustar por el peso del niño al nacer (Weidner *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores no encuentran relación entre la duración de la gestación y el riesgo de presentación de hipospadias (Stoll *et al.*, 1990).
- Peso del neonato en relación con la edad gestacional: los recién nacidos pequeños para su edad gestacional presentan mayor riesgo de aparición de hipospadias (Aschim *et al.*, 2004).

- Presencia de otras malformaciones congénitas: se ha observado un elevado porcentaje de malformaciones renales y del tracto urinario (reflujo vésico-ureteral, agenesia renal, riñón en herradura, etc.), así como otras malformaciones congénitas (sindactilia, paladar hendido, malformación cardíaca, etc.) asociadas a la presentación de hipospadias (Stoll *et al.*, 1990; Akre *et al.*, 1999). Para el caso específico de criptorquidia la frecuencia de asociación con hipospadias es de un 10% (Garat, 1987) y con otros defectos congénitos es de un 8 a un 13% (Aschim *et al.*, 2004).

En la actualidad la etiología de hipospadias es desconocida, aunque existe acuerdo en que están envueltos tanto factores genéticos como no genéticos. 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).

Muchos de los factores de riesgo identificados apuntan hacia un mecanismo endocrino durante la embriogénesis, con alteración en la producción de hormonas masculinas (en el eje hipotálamo-hipofisario o en las gónadas), así como resistencia a la acción de éstas o déficit en la síntesis de enzima convertidora de la testosterona (Paulozzi *et al.*, 1997; Silver *et al.*, 1999). De hecho, el hipospadias se asocia frecuentemente con alteraciones en el desarrollo sexual masculino. Además de con estos factores endógenos, el hipospadias se relaciona con factores hormonales exógenos, como es el consumo materno de progestágenos durante la gestación (Silver *et al.*, 1999). Sin embargo, la mayoría de los casos de hipospadias aparecen como una malformación de causa desconocida.

Resumiendo, puede afirmarse que la hipospadias es un evento complejo que está mediado por factores mecánicos, genéticos y hormonales y que se produce cuando falla uno o más de dichos factores implicados. De nuevo el síndrome de Disgenesia Testicular ofrece un buen marco conceptual que trata de explicar las asociaciones entre estas malformaciones, la disfunción y el riesgo de transformación maligna, desde la perspectiva de la disrupción endocrina en el desarrollo embriológico considerando la multifactorialidad del proceso (Skakkebaek *et al.*, 2001).

1.5. Los compuestos organoclorados persistentes como disruptores endocrinos

La acción hormonal, factor de gran relevancia en la etiopatogenia de criptorquidia e hipospadias, no está limitada a las hormonas naturales y a los compuestos farmacéuticos. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, algunos contaminantes químicos medioambientales de muy diferente origen y estructura química pueden actuar sobre la homeostasis hormonal. A este respecto es notable el efecto disruptor endocrino de muchos compuestos orgánicos persistentes, frecuentemente organoclorados.

La inmensa mayoría de los individuos de las poblaciones occidentales almacenan en su organismo cantidades apreciables de estos contaminantes orgánicos persistentes. Esta contaminación, que abarca a todos los sectores de la población, es un hecho de especial relevancia desde la perspectiva de la salud. Lo habitual es encontrar un 80-90% de los individuos con niveles detestables de uno o varios de estos compuestos, incluso las niñas y los niños recién nacidos, pues el acumulo de estos agentes químicos en tejido graso durante la vida de la madre, supone una fuente de exposición para el hijo, tanto durante la gestación como a través de la lactancia ([Campoy et al., 2001](#); [Sala et al., 2001](#)).

Al tratarse de una exposición tan extendida se ha sugerido que si bien el riesgo de enfermedad puede ser bajo, el riesgo atribuible no es desdeñable. Aunque no hay evidencia de que esto sea así, tampoco hay completa seguridad de que el efecto a largo plazo, de todo este conjunto de sustancias que están en nuestro ambiente, sea despreciable.

También está fehacientemente demostrado que muchos de estos contaminantes orgánicos persistentes disruptores endocrinos se caracterizan por su gran inercia química (baja reactividad en el medio, efectos biocidas durante largo tiempo, y bioacumulación), por su dispersión lo que ha provocado que hayan contaminado amplias zonas del planeta, y por su dificultad de excretarse por el cuerpo humano, en el que tienen larga vida media, acumulándose en los tejidos grasos.

Los disruptores endocrinos bioacumulables llegan hasta nuestro organismo a través de una exposición ambiental “de fondo” y posiblemente a dosis muy bajas. La vía de entrada es fundamentalmente, a través de la dieta, no solo por el consumo de productos vegetales, sino por la ingesta de productos de origen animal, concretamente de las partes más grasas de estos alimentos; e incluso por el agua de bebida.

La carencia en España de estudios representativos de zonas geográficas amplias y bien definidas, que valoren la exposición humana a agentes químicos ambientales en población sana, donde se integren datos de análisis químicos de estos compuestos, junto con los datos clínicos, epidemiológicos y ambientales, ha llevado a nuestro grupo a desarrollar una línea de investigación a este respecto, en la cual se encuadra este trabajo (Brotos Oliver, 1994; Molina Carrasco, 1994; Perez Gómez, 1996; Olea y Olea-Serrano, 1996; Rivas *et al.*, 1997; Pazos *et al.*, 1998; Botella Orts, 1999; Olea *et al.*, 1999; Rivas Velasco, 1999; Lopez Navarrete, 2000; Pulgar *et al.*, 2000; Campoy *et al.*, 2001; Fernández Cabrera, 2001; Moreno-Frias *et al.* 2001; Olea y Zuluaga, 2001; Rivas *et al.*, 2001; Cerrillo García, 2003; Molina Molina, 2003; Botella *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004; Ibarlucea *et al.*, 2004).

La diversidad de fuentes de exposición y la gran variedad de compuestos químicos parece difícil alcanzar una acción global, sin embargo, nos encontramos en un momento histórico al coincidir con el proceso de discusión, acuerdo, firma, aplicación y ratificación del Convenio de Estocolmo (60-64 referencias en Porta 2001). Este convenio, auspiciado por el programa ambiental de la Naciones Unidas, persigue acabar con el uso de varios de estos compuestos y reducir el de otros. En concreto, establece la eliminación de la producción y el uso de aldrin, clordano, dieldrin, endrin, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y toxafeno; la restricción de la producción de la producción y el uso de DDT y la reducción de la emisión desde fuentes antropogénicas de los subproductos no intencionados. El Convenio establece además las condiciones en los que estos compuestos persistentes actualmente existentes deben ser eliminados, prevé la incorporación en el futuro de otros compuestos a la lista de sustancias que deberán eliminarse y señala los planes de aplicación de cada país, que se revisarán de forma periódica, constituyendo así un programa eficiente de eliminación y control de los compuestos orgánicos persistentes.

Se presenta a continuación, de forma resumida, información sobre un grupo de compuestos organoclorados persistentes que se clasifican dentro del grupo de disruptores endocrinos y que son de interés para el presente trabajo. Se trata de pesticidas organoclorados, de estructura química diversa entre los que se encuentran los diclorodifeniletanos (*DDT, DDD, DDE, dicofol, metoxicloro*), ciclodienos (*clordano, oxiclordano, heptacloro, epoxido, aldrin, dieldrin y endosulfan*) hexaclorobenceno y hexaclorociclohexanos o carboximidias como por ejemplo, la *vinclozolina* o 3(3,5-diclorofenil)-5-metil-5-viniloxazolidin-2,4-diona.

Debido a la diversidad estructural, los pesticidas con frecuencia se clasifican atendiendo a algunas de las propiedades derivadas de su comportamiento frente a organismos vivos, su vida media o su patrón de degradación medio ambiental, los

plaguicidas organoclorados se incluyen dentro de los compuestos persistentes. Así, los pesticidas clasificados en función de su persistencia en el medio ambiente, definida como el tiempo necesario para que un 75-100% del compuesto desaparezca del medio. La escala de persistencia distingue entre: Pesticidas no persistentes (de 1 a 12 semanas); Pesticidas moderadamente persistentes (de 1 a 18 meses); Pesticidas persistentes (de 2 a 5 años).

Aunque inicialmente la persistencia de estos productos se consideró como una cualidad deseable para su empleo, ya que su efecto biocida duraba más tiempo, pasado el tiempo se han puesto de manifiesto los inconvenientes de este comportamiento ya que la alta lipofilia junto con la estabilidad química magnifica los efectos biológicos indeseables (Dich *et al.*, 1997)

La mayoría de los países industrializados han prohibido su utilización después de haberse revelado sus efectos adversos sobre la salud, sin embargo debido a su persistencia en los medios naturales y su lipofilia, pueden encontrarse aún hoy en día, incluso en individuos no expuestos de forma directa.

A este respecto, DDT no es más que un ejemplo de esta gran familia de pesticidas organoclorados que comparten como característica común su capacidad para mimetizar a las hormonas naturales alterando la homeostasis hormonal 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 (Millar y Shape, 1998).

1.5.1. DDT y sus metabolitos

El DDT fue sintetizado por Zeidler en 1874, aunque fue Müller (Premio Nobel de Medicina 1948) el que descubrió su acción insecticida. Este hallazgo inició una revolución en el campo de los plaguicidas desencadenando la incorporación de productos derivados de síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades.

Fue utilizado en EEUU por primera vez en 1943 como pesticida en campañas anti-malaria durante la II Guerra Mundial y extendiendo su uso en la vida civil a partir de 1945. El primer informe de DDT en la leche animal fue publicado en 1945, y el primer informe de DDT en grasa humana y leche materna apareció en 1948 y 1951. La restricción en la utilización de DDT no llegó hasta 1969, siete años después de la publicación de "Silent Spring" de Rachel Carson. En 1972 el Gobierno de EEUU prohíbe el uso doméstico de DDT. Sin embargo se sigue usando todavía en algunas regiones del mundo (Carson, 1962; Krieger *et al.*, 1994). Al ser el DDT un derivado clorado se abrió, a su vez, un camino de búsqueda de materias activas que contenían

uno o más átomos de cloro en su estructura, desarrollándose así un conjunto de productos, cuya lista no está acabada, y que ocupan un lugar de importancia en el total de plaguicidas empleados.

DDT es una molécula rígida y liposoluble con una vida media de aproximadamente 100 años. Se acumula y se concentra, por lo que aún hoy en día se puede encontrar a lo largo de toda la cadena alimentaria. Posee una bajísima tensión de vapor (1.5×10^{-7} milímetros de Hg) y una volatilidad muy escasa, lo que unido a su poca sensibilidad a la luz ultravioleta explicaría su notable persistencia en el medio ambiente. Estas indicaciones justifican por si solas el hecho de que la producción mundial de DDT sea mayor en la actualidad que en pasado (Sharpe *et al.*, 1995).

El DDT empleado en las formulaciones no corresponde a producto puro, se trata de una mezcla de isómeros entre los cuales el más abundante es *p,p'*-DDT, que contribuye en un 80% aproximadamente; le sigue *o,p'*-DDT en un 20%, aunque se pueden encontrar cantidades mínimas de otros isómeros (*p,p'*-DDD, *p*-diclorobenceno y otras impurezas derivadas de su síntesis). Los *orto-para* isómeros son menos estables que las configuraciones *para-para* por lo que se encuentran en la naturaleza en concentraciones muy bajas.

En cuanto a su metabolismo encontramos diferencias dependiendo del organismo donde este tenga lugar. Así, en los vertebrados, es común la presencia en orina y heces del producto de oxidación DDA, sin embargo para el hombre el DDT se almacena bajo la forma de DDE, un derivado etilénico del DDT. Un tercer camino de degradación del DDT, es la formación del derivado dicloro o DDD, también empleado como insecticida. Al *p,p'*-DDE, se le ha atribuido actividad estrogénica (Soto *et al.*, 1995), así como, propiedades antiandrogénicas al competir con la dihidrotestosterona por su enlace al receptor (Kelce *et al.*, 1995). El componente con mayor capacidad estrogénica es el *o, p'* DDT (20% del peso de DDT), que como se ha indicado se degrada a DDE, el metabolito más abundante y persistente en el medioambiente (IARC., 1991). Tanto la potencia estrogénica del DDT como la de sus metabolitos se ha evaluado mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*.

Algunos animales y peces metabolizan rápidamente el DDT a *p, p'* DDE y los seres humanos pueden consumir preformado el *p,p'* DDE en la dieta y acumularse en el tejido adiposo. Sin embargo, estudios realizados en hombres en el pasado voluntarios sanos muestran poca capacidad de metabolizar DDT en DDE (Morgan *et al.*, 1971). La mayor parte de *p, p'* DDE acumulado en tejido adiposo humano proviene de la ingesta de *p, p'* DDE previamente más que de la transformación de DDT a *p, p'* DDE (Morgan *et al.*, 1971).

Estudios realizados en mujeres embarazadas, muestran como la presencia de DDT y DDE en suero materno es un factor que incrementa el riesgo de hijos pretermino o con anterioridad a la semana 37-38 de gestación, además, como ya se ha descrito, se ha visto en niños de madres expuestas la aparición de malformaciones urogenitales (criptorquidia e hipospadias), y/o retraso en el crecimiento (Longnecker *et al.*, 2001; Flores-Luévano *et al.*, 2003; Longnecker *et al.*, 2002; Siddiqui *et al.*, 2003).

Dentro de este grupo se debe incluir también a el metoxicloro. Su espectro de acción es similar al del DDT, que presenta una acción más suave y menor toxicidad para los mamíferos. Este compuesto se metaboliza más rápidamente y es más biodegradable que los anteriores.

El metoxicloro presenta actividad proestrogénica, *in vivo* produce efectos adversos sobre la fertilidad y sobre la actividad uterina en hembras (Ousterhout *et al.*, 1981); en los machos se ha visto una alteración del comportamiento sexual, cuando has sido expuestos en útero (Cummings, 1997).

1.5.2. Endosulfan

El Endosulfán es el pesticida organoclorado que ocupa, hoy día, el primer lugar en consumo en los países industrializados. A diferencia de otros órganoclorados “históricos” su uso es frecuente y su empleo en áreas agricultura intensiva en la península Ibérica es una práctica habitual (Olea *et al.*, 1999; Cerrillo *et al.*, 2004).

En 1994 Soto y colaboradores presentaron el primer informe sobre la estrogenicidad del endosulfán al demostrar que este ejercía un efecto proliferativo sobre células de cáncer de mama mantenidas en cultivo, y que este efecto era comprable al inducido por el estradiol, estrógeno natural (Soto *et al.*, 1994). Informes posteriores han confirmado esta observación por lo que endosulfán se clasifica hoy entre los pesticidas estrogénicos con capacidad disruptora endocrina (Jin *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1999).

El consumo de cantidades importantes de endosulfán en el medio agrícola ha provocado que su presencia ambiental sea cada vez más frecuente (Alarcón Rodríguez, 2004). En aquellos trabajos en los que se ha buscado expresamente la persistencia de endosulfán como contaminantes de alimentos, aguas, aire o suelos se ha puesto de manifiesto que hoy día ocupa uno de los primeros lugares en cuanto a concentración y porcentaje de muestras positivas, en muchos casos comparable a la positividad del DDT y sus metabolitos.

De hecho los informes científicos sobre la presencia de este pesticida en ambiente son un tanto preocupantes. Por ejemplo, endosulfán es el pesticida más frecuentemente encontrado en el análisis de aguas superficiales realizado en Almería (Fernández-Alba *et al.*, 1998) y en la Comunidad Valenciana (Hernández *et al.*, 1996). En el primero de los casos, los estudios de vigilancia llevados a cabo en tierras almerienses durante un año sirvieron para demostrar la presencia y cuantificar la concentración ambiental del endosulfán alfa, beta y sulfato que se mueve en el rango de 0.5-540 ng/l (Penuela *et al.*, 1998). Estos datos parecen confirmar la ubicuidad del pesticida previamente denunciada por Seba y Snedaker (1995) que refieren a endosulfán como el pesticida más frecuentemente encontrado en la capa superficial de las aguas marítimas (Seba y Snedaker, 1995).

Desde el punto de vista de la exposición humana, tanto con carácter laboral como ambiental, es cada vez más frecuente encontrar este pesticida en las listas de organoclorados incluidos en las muestras analizadas.

Los estudios de exposición a pesticidas en el área de agricultura intensiva almeriense no son nuevos y se mueven entre la medida de la excreción de los compuestos químicos y sus metabolitos y la estimación de los cambios clínicos y bioquímicos objetivados (Parrón *et al.*, 1996, Alarcón Rodríguez, 2004). La exposición de la población general establecida en áreas eminentemente agrícolas ha sido también documentada (Rivas *et al.*, 1998; Olea *et al.*, 1999; Cerrillo *et al.*, 2004).

Por ejemplo, en la población infantil de Murcia y Granada se encontró el residuo de endosulfán y algunos metabolitos en el 40% y 30% de las muestras de grasa analizadas, respectivamente (Molina Carrasco, 1994). Es sorprendente, por otra parte, que al residuo de este pesticida le acompañan otros de compuestos químicos cuyo uso fue prohibido hace décadas. La persistencia ambiental de esos organoclorados y la exposición materno-infantil pudiera ser una explicación aceptable para tal exposición.

En lo que respecta a los adultos, las fuentes de exposición de la población agrícola general al organoclorado endosulfán pueden ser variadas. Como se ha dicho, existe, de una parte el contacto directo y la inhalación por aquellos individuos total o parcialmente expuestos. De otra, la contaminación de ropas y utensilios utilizados durante los tratamientos agrícolas que son llevados a la residencia del trabajador. Importante también es la exposición alimentaria a través del residuo del pesticida y la contaminación de las aguas de bebida (García *et al.*, 1999; Campoy *et al.*, 2001 (b); Botella *et al.*, 2004). Por estas razones ha merecido la atención durante estos últimos años el estudio de la exposición alimentaria al endosulfán. En Aragón se realizó un

estudio con objeto de determinar el residuo de 21 organoclorados en la dieta, encontrándose que HCB, Lindano, DDT y sus metabolitos y beta endosulfán eran los contaminantes habituales (Lázaro *et al.*, 1996).

Muestras de sangre y tejido adiposo humano, tomados de individuos provenientes de áreas donde se ha desarrollado la agricultura intensiva han sido motivo de estudio con objeto de investigar la impregnación interna de la población con el residuo de diversos pesticidas y el riesgo de padecimiento de cáncer de mama (Rivas *et al.*, 1999). La presencia de op'DDT, pp'DDT, DDE, endosulfán, clordano y metoxicloro fue confirmada en aquellas muestras en que se determinó un exceso de actividad hormonal de carácter estrogénico (Fernández *et al.*, 2004). Precisamente es esta estimación de la carga hormonal exógena el factor que con mayor fiabilidad identifica el riesgo de padecimiento de la enfermedad tumoral mamaria (Ibarluzea *et al.*, 2004).

Pero aún así, el caso de endosulfán es un buen ejemplo de la lentitud por parte de la Administración, de los científicos y los productores en dar una respuesta a un problema anunciado. Ha costado años de seguimiento y esfuerzo de diversos grupos de trabajo interesados en una particular forma de toxicidad crónica el acumular la evidencia necesaria para que endosulfán sea considerado un pesticida organoclorado, xenobiótico estrogénico y con una presencia ambiental tremendamente importante (Olea *et al.*, 1996; Olea *et al.*, 1998; Olea *et al.*, 1999). Tal evidencia es difícil de conseguir, máxime cuando los ejemplos nos advierten del efecto tardío y dilatado en el tiempo. En casos como éste, más que nunca, el principio de precaución debería ser una premisa de decisión en la mente de todos.

1.5.3. Dieldrín y Aldrín

Dieldrín es un pesticida organoclorado utilizado en los EEUU desde los años 50 hasta la mitad de los 70 contra los insectos para proteger las cosechas. Su uso fue prohibido por la Agencia de Protección del Medioambiente Americana en 1987 (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) Aldrín es estructuralmente parecido a dieldrín y con usos similares, que puede degradarse a dieldrín. Todos sus aplicaciones fueron también prohibidas en 1987 por la Agencia de Protección del Medioambiente Americana (ATSDR, 2002).

Como demuestran Hoyer y colaboradores la concentración sérica de dieldrín está asociada a un incremento significativo en el riesgo de cáncer de mama (Hoyer *et al.*, 1998; Hoyer *et al.*, 2000(a)). En un estudio posterior también observan que existe

asociación entre los niveles séricos de dieldrín y la supervivencia, de manera que altos niveles de dieldrín en sangre se relacionan con un mayor riesgo de muerte en relación con niveles bajos (Hoyer *et al.*, 2000(b)). Sin embargo, estos resultados no son corroborados en un segundo estudio llevado a cabo en la misma población y por los mismos autores (Hoyer *et al.*, 2001) ni tampoco en otros tres estudios, uno llevado a cabo en Noruega por Ward y colaboradores y dos realizados en Estados Unidos por Dorgan y colaboradores y Gammon y colaboradores (Dorgan *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000; Gammon *et al.*, 2002).

El dieldrín es el principal metabolito del aldrín. Ambos son muy solubles en lípidos, muy persistentes y bioacumulables a través de los ecosistemas. Se ha demostrado la estrogenicidad del dieldrín (Soto *et al.*, 1995) y, estudios de exposición de ratas a estos compuestos, sugieren alteraciones en la fertilidad masculina (Toppari *et al.*, 1996).

El empleo de aldrín y dieldrín ha sido muy desigual en los diferentes países ya que la disponibilidad y el precio de ambos compuestos es muy diferente. Ambos compuestos se incorporan rápidamente al tejido graso en individuos expuestos y se produce una metabolización activa de aldrín a dieldrín. De esta manera se ha empleado de forma rutinaria la medida de dieldrín en tejido adiposo y sangre para monitorizar la exposición a ambos compuestos.

1.5.4. Mirex

Forma parte de los derivados del pentaclorociclodecano, que se caracterizan por tener una estructura en forma de caja. El mirex se utilizaba como retardador del fuego de plásticos, de pinturas, y de mercancías eléctricas, pero este uso se ha restringido o ha sido prohibido en la mayoría de los países.

Mirex es altamente resistente a la biodegradación y tiene un período de persistencia de hasta diez años en el sedimento. Mirex se conoce por ser uno de los pesticidas más estables y más persistentes, debido a que presenta un alto grado de cloración y dificultad de metabolización o eliminación lo cual facilita su acumulación. Por su alta lipofilidad se acumula en el tejido adiposo y se excreta con mucha dificultad. Por lo tanto, se trata de un insecticida que sufre biomagnificación y es concentrado miles de veces en la cadena alimentaria (Ahlborg *et al.*, 1995). Ha habido pocos estudios sobre exposición humana a mirex, y existen pocos datos sobre sus

efectos en salud humana. Dosis de mirex similares a las ingeridas en la dieta han mostrado ser capaces de provocar reacciones adversas en animales ([ATSDR, 2001](#)).

1.5.5. Hexaclorobenceno (HCB)

El HCB esta distribuido ampliamente en el medioambiente y las dos fuentes principales de exposición son la agricultura y las industrias. Antiguamente fue utilizado como funguicida, pero actualmente la mayor fuente de HCB es la emisión industrial como producto relacionado con el uso de organoclorados en procesos de manufactura. Tiene una fuerte tendencia de acumularse en la cadena alimentaria y en los tejidos ricos en grasa en humanos y animales ([Sala et al., 2001](#)).

El hexaclorobenceno (HCB), como el diclorodifenil dicloroetano (p,p'-DDE) y los bifenilos policlorados (PCBs), son también compuestos organoclorados ubicuos en la naturaleza que se incorporan al organismo humano principalmente a través de la dieta. En la actualidad, como la mayoría de estos compuestos están prohibidos, su origen se circunscribe a países del tercer mundo donde su empleo está limitado para usos específicos o como subproductos en la síntesis de otros compuestos organoclorados.

En 1994, un estudio realizado en la población de Flix (Ribera del Ebro, Tarragona) puso en evidencia que sus habitantes presentaban concentraciones séricas muy elevadas de HCB debido a la proximidad a una empresa electroquímica ([Sala et al., 2001](#)). Asimismo, se observó que los niños nacidos en dicha población entre 1997 y 1999 presentaban, ya en el momento de nacer, concentraciones muy elevadas de HCB, observándose alteraciones en el desarrollo neurológico de los niños varones incluidos en el estudio ([Sala et al., 2001](#)).

A pesar de que el grado de contaminación por HCB en esta población continúa siendo elevado, en un estudio publicado en 2003 se ha observado que éste ha sido el compuesto organoclorado que más ha disminuido en los últimos años. Esta disminución podría ser debida a las mejoras realizadas en los procesos de incineración en la empresa electroquímica. No obstante, las consecuencias sobre la salud, especialmente el desarrollo infantil empiezan ahora a entenderse ([Ribas-Fitó et al., 2003](#)).

Debido al posible impacto de los procesos ambientales sobre la salud humana, sería necesario esclarecer mediante más estudios cuáles son las concentraciones de estos compuestos en nuestra población.

1.5.6. Hexaclorociclohexanos: Lindano

Dentro del grupo de los hexaclorociclohexanos uno de los pesticidas organoclorados más utilizados es el isómero gamma lindano, pues ha servido en agricultura, veterinaria, e incluso en el ámbito de la salud humana ya que es un insecticida de amplio espectro (sirve tanto para matar a insectos fitófagos como para los parásitos de los animales).

El lindano puede entrar en el organismo por vía respiratoria, cutánea y gastrointestinal (Dick *et al.*, 1997). Su toxicidad ha sido comprobada y por esta razón está siendo prohibido en varios países, a pesar de lo cual el riesgo de exposición no ha desaparecido ya que, como todos los organoclorados, el lindano es una molécula muy estable y persistente en el ambiente. Por ser muy liposoluble, tiende a bioacumularse en los tejidos con mucha grasa, como la glándula mamaria, el hígado y el sistema nervioso.

El lindano es perjudicial para la salud humana y para el ambiente aún a pequeñas dosis ya que en exposiciones crónicas (toxicidad crónica), causa problemas hepáticos, renales, hormonales, ginecológicos, sanguíneos (anemias) y del sistema nervioso (Toppari *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha encontrado que en varios modelos animales es cancerígeno, y se podría pensar que también puede serlo para el hombre, aunque esto no está aún demostrado. La OMS recomienda tratar el HCH y sus isómeros como si fuesen cancerígenos.

1.6. Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad en patología relacionada con el tracto genito-urinario

La identificación de las causas concretas que producen los desórdenes reproductivos, especialmente aquellas que afectan la vida embrionaria y fetal, choca con muchas dificultades, entre ellas, la inaccesibilidad del feto, las limitaciones éticas de la experimentación y los largos periodos de tiempo identificados entre la exposición y la manifestación clínica del fracaso funcional y/o orgánico.

La experimentación animal y los estudios epidemiológicos se convierten en el recurso más apropiado para tratar de establecer la exposición a disruptores endocrinos y enfermedad. Pero si los primeros tienen la desventaja de la simplificación de muchos de los modelos, los segundos no siempre dan los resultados esperados. De hecho, las contradicciones son la pauta más frecuente. Por ejemplo, algunos

autores piensan que los datos existentes no permiten concluir que sea cierta una caída global en el contaje espermático, mientras que otros sugieren que la heterogeneidad de las poblaciones, las variaciones geográficas, los métodos analíticos y la consideración de factores confundentes son los mayores obstáculos para poder concluir de forma positiva (Jorgensen, *et al.*, 2001, Swan *et al.*, 2003). A pesar de ello, el papel de los disruptores endocrinos no debería ser olvidado si se consideran algunos ejemplos particulares de exposición laboral, muy bien documentados y con consecuencias claramente definidas. Este es el caso de la exposición de trabajadores al nematocida dibromocloropropano (DBCP, hexaclorobenceno (HCB), y al insecticida clordecona, referentes continuos en salud reproductiva del varón (Sala, *et al.*, 2001, Cocco, 2002).

Una de las mayores dificultades en el desarrollo de estos estudios es la correcta definición de exposición que descansa sobre métodos indirectos que puedan solo identificar ésta de forma aproximada. En todo caso, todo esfuerzo hecho en una mejora de los métodos disponibles para evaluar exposición, efecto y susceptibilidad individual es bienvenido ya que el desarrollo y validación de biomarcadores contribuiría a una mejor clasificación de la exposición.

1.6.1. Marcadores de exposición:

La caracterización de disruptores endocrinos con actividad hormonal estrogénica y/o antiestrogénica y la identificación de las vías de exposición ha sido y es una labor concienzuda que en nuestro grupo de investigación nos ha permitido contribuir de forma considerable al censo de xenobióticos estrogénicos, fundamentalmente en tres grupos de compuestos químicos: i) compuestos organoclorados (Olea *et al.*, 1998, Botella Orts, 1999) y ii) compuestos químicos industriales de origen muy diverso (Pulgar *et al.*, 2000, Rivas *et al.*, 2001; Molina Molina, 2003), iii) otros estrógenos de procedencia animal o vegetal (Pazos *et al.*, 1998, Olea *et al.*, 1999; Fernández Cabrera, 2001; Almstrup *et al.*, 2002).

La atención dirigida hacia estos tres grupos de compuestos químicos es debida, en parte, a la frecuencia de su empleo, la cantidad utilizada y/o la extensión a determinados usos con carácter casi universal. Además existen otras razones científicas que justifican la atención prestada a estos de compuestos: i) bioacumulación en el tejido adiposo, presencia en la leche humana y otros medios biológicos ii) la actividad hormonal estrogénica y androgénica, iii) la metabolización a

entidades químicas altamente reactivas, algunas de las cuales tienen afinidad por el ADN intranuclear, por lo tanto son clasificados como potenciales carcinógenos.

Además se ha podido probar de forma clara la existencia de fuentes de exposición, en muchos casos inadvertida, cuya publicación ha suscitado no pocas respuestas airadas por parte de los responsables/usuarios, hasta que otros grupos de investigadores han confirmado la evidencia presentada por nosotros (Pazos *et al.*, 1998; López Navarrete, 2000; Rivas *et al.*, 2001; Olea y Zuluaga, 2001; Porta *et al.*, 2002; Botella *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004).

Nuestro grupo de trabajo también ha abordado la problemática de la exposición a compuestos organoclorados pero tratando de recoger numerosas recomendaciones enunciadas en la bibliografía publicada (Woodruff *et al.*, 1994; Longnecker *et al.*, 1997; Longnecker *et al.*, 1999). Por esta razón, además de hacer un análisis extensivo de la medida de los residuos de organoclorados a una serie inicial de 16 compuestos de interés por su clasificación como xenoestrógenos (lista que se va viendo aumentada poco a poco), se utilizaron el tejido adiposo, placenta, sangre, leche materna y cordón umbilical, para la identificación y cuantificación de los organoclorados acumulados, bajo la premisa de que estos compartimentos orgánicos pueden informar sobre la exposición histórica de un individuo (Campoy *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2002; Botella *et al.*, 2004). La determinación de pesticidas organoclorados en dichos medios biológicos es recomendada por distintos autores por ser útiles biomarcadores de la carga estrógena corporal (Stellman *et al.*, 1998).

De esta forma hemos identificado como compuestos estrogénicos los pesticidas organoclorados lindano, aldrín, dieldrín, endrín, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, metoxicloro y endosulfán y sus metabolitos que demostraron ser agonistas totales o parciales. Los pesticidas organoclorados más potentes, entre estos fueron: *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDT, metoxicloro y endosulfán (Pazos *et al.*, 1998; Rivas *et al.*, 2001; Moreno Frías *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004).

Hemos podido también definir los requerimientos óptimos para que una molécula presente una buena actividad estrogénica comparable al estrógeno natural. Tanto la presencia de los grupos –OH en posición *para* en anillos fenólicos, como la longitud de la cadena sustituida en el carbono central suponen factores de potenciación del efecto hormonal (Pérez *et al.*, 1998; Pulgar, *et al.*, 2000; Rivas, *et al.*, 2001; Olea *et al.*, 2003). Además tres son las variables que regulan la potencia con la que un contaminante produce disrupción en el sistema endocrino: 1) la similitud funcional con la hormona, 2) la magnitud de la exposición y 3) el momento en que ésta se produce. Ésta última variable es la más importante. El periodo embrionario y fetal

es el momento de la vida de mayor susceptibilidad a los tóxicos, pues es cuando ocurren eventos fundamentales para el desarrollo como la organogénesis, la diferenciación sexual de las gónadas y el tracto reproductivo, la neurogénesis y la diferenciación sexual del sistema nervioso.

Una vez creado un censo de compuestos químicos con actividad estrogénica el pensamiento lógico conduce a la puesta a punto de las técnicas necesarias para identificar la exposición humana a tales sustancias, ya que el fin último es tratar de asociar la exposición con la frecuencia de enfermedad. Por este motivo gran parte del esfuerzo de nuestro grupo se centra en el desarrollo de las técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de los xenoestrógenos en fluidos y tejidos humanos (Garrido *et al.*, 2000; Martínez Vidal *et al.*, 2000; Moreno Frías *et al.*, 2001; Botella *et al.*, 2004; Moreno Frías *et al.*, 2004), especialmente en placenta y sangre de cordón umbilical, vías de exposición capaces de explicar los niveles de algunos disruptores detectados en recién nacidos.

1.6.2. Marcadores de efecto:

El reconocimiento de los compuestos químicos con actividad estrogénica se ha visto dificultada durante años por dos motivos fundamentales:

1. La complejidad de los tests predictivos
2. La imposibilidad de atribuir a un compuesto químico actividad de tipo estrogénico, tomando como base la simple observación de su estructura molecular.

Además, los efectos de una sustancia con actividad hormonal pueden variar dependiendo de la dosis, del tiempo de exposición, del tipo de muestra biológica, del organismo expuesto, de la interacción con otras hormonas, así como de su metabolismo. Algunos compuestos son estrogénicos o androgénicos *per se*, mientras que otros necesitan ser biodegradados o biotransformados en intermediarios activos. Por ejemplo, Bulger y colaboradores comprobaron que la pérdida de un grupo metilo por parte del metoxicloro era esencial para que esa sustancia tuviera actividad estrogénica *in vivo* (Bulger *et al.*, 1978). Una sustancia puede resultar negativa en un test y por el contrario ser activa en otro. La situación se complica aún más cuando se tiene en cuenta que muchos de estos compuestos son versátiles en su unión a receptores nucleares. Además, los estudios más sencillos de desplazamiento de la unión del ligando natural a su receptor específico no pueden distinguir entre un

competidor que desencadene un efecto último de carácter agonista-estrogénico/androgénico- o antagonista-antiestrogénico/antiandrogénico. Hoy día tampoco es del todo conocido el sitio aceptor que representa el receptor hormonal, lo que dificulta el reconocimiento de las condiciones mínimas para que un producto sea hormonalmente activo.

Varios tests y bioensayos actualmente existentes, de muy diversa índole, han sido propuestos por diferentes organismos internacionales para la identificación de mimetizadores/antagonistas hormonales. Se pretende con ello ayudar en la estimación del riesgo de exposición a compuestos químicos y tiene entre sus fines el que puedan ser utilizados como instrumentos de regulación en las relaciones de comercio exterior en todo el mundo (Estrategia Comunitaria, 1999).

Pero a pesar del esfuerzo realizado, en un período de tiempo tan limitado, se ha denunciado que los efectos hormonales atribuidos a algunos compuestos químicos bajo sospecha de ser potenciales disruptores endocrinos no podrán ser objetivados con los tests toxicológicos actualmente en uso. Se han señalado varias razones para justificar este fracaso (Olea *et al.*, 2002):

- i) Un compuesto químico puede tener efectos relacionados con disrupción endocrina a dosis inferiores a las actualmente aceptadas como Nivel de Efecto No Observado (NOAEL).
- ii) Muchos de los tests de toxicidad no están diseñados para detectar efectos que ocurren tras la exposición en los primeros momentos del desarrollo.
- iii) Son muy pocos los tests que evalúan el efecto combinado de varios compuestos químicos.
- iv) Las alteraciones de la función endocrina pueden tener consecuencias en cualquier órgano y en cualquier momento de la vida del individuo debido a la especial acción de las hormonas durante el desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis en periodos críticos.

Desarrollar nuevos tests específicos para detectar disrupción endocrina es al mismo tiempo un problema de fácil solución y una tarea no exenta de complejidad. Es sencillo asignar a un compuesto químico la categoría de mimetizador hormonal – agonista o antagonista. No se debe olvidar que muchos de los bioensayos que sirvieron, hace ahora más de setenta años, para definir hormonas estrogénicas son también útiles para identificar compuestos químicos naturales o no con actividad estrogénica.

Creemos que el fracaso en la demostración de la existencia de una relación de causalidad entre la exposición a xenobióticos estrogénicos, disruptores hormonales y

el riesgo de padecimiento de criptorquidia y/o hipospadias puede obedecer a alguna de las siguientes presunciones:

- i) Asumir que la cuantificación del residuo de uno, o unos pocos, xenobióticos estrogénicos en una muestra biológica es un indicador suficiente de exposición individual.
- ii) Asumir que la demostración de exposición a través de la cuantificación química de los xenobióticos arbitrariamente escogidos es suficiente para predecir el efecto biológico conducente a enfermedad.
- iii) Ignorar la existencia de efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos entre los diferentes xenobióticos que actúan a través de un mecanismo común, a pesar del rechazo a esta hipótesis provocado, en parte, por la ligereza en publicar datos experimentales de difícil reproducción.
- iv) Reducir la medida de la exposición histórica retrospectiva de la madre, a unos pocos datos sobre exposición conseguidos en el momento del diagnóstico.
- v) Ignorar la exposición documentada a xenobióticos hormonales no bioacumulables, con actividades biológicas muy significativas en términos de potencia/concentración

Para resolver parte de estas dificultades, nuestro grupo de trabajo ha estandarizado un sistema mixto, químico-biológico, que permite a partir de muestras biológicas diversas, sangre-suero, saliva, leche materna, placenta o tejido graso, extraer los xenobióticos hormonales, testar su actividad hormonal en el bioensayo E-Screen e identificar y cuantificar los compuestos responsables de tal efecto hormonal (Rivas *et al.*, 1997; Pazos *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2004). La consecución de este sistema mixto ha supuesto la validación de cada uno de los pesticidas organoclorados estudiados, de tal manera que: i) se ha estandarizado el método químico para identificación y cuantificación de xenobióticos organoclorados mediante cromatografía de gases (CG) (Valenzuela Torres, 1996) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Brotons Oliver, 1995); ii) se ha desarrollado el método de extracción de xenobióticos liposolubles a partir de grasa (Rivas Velasco, 1999) , suero (Sonnenschein *et al.*, 1995; Botella Orts, 1999; Crespo, 2001) y placenta iii) se ha adaptado y mejorado sensiblemente el test biológico de identificación de actividad hormonal estrogénica basado en el empleo de células de cáncer de mama en cultivo (Villalobos *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1999), y por último, iv) se ha descrito una metodología de pasos consecutivos que permite extraer xenobióticos de muestras biológicas y cuantificar su actividad estrogénica en el bioensayo apropiado (Pazos *et al.*, 1998; Rivas Velasco, 1999; Rivas *et al.*, 2001).

Confirmando los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, la metodología analítica desarrollada permite separar los xenobióticos lipofílicos organoclorados con actividad estrogénica de aquellos estrógenos naturales contenidos en muestras tejido adiposo humano. Esta metodología se hace indispensable para que las muestras puedan ser ensayadas en tests biológicos en los que los estrógenos naturales desencadenarían los efectos específicos relacionados con su actividad, como es el estímulo de la proliferación celular. Por tanto se deben obtener muestras exentas de estrógenos endógenos que al ser evaluadas en el test biológico den una respuesta hormonal que pueda ser atribuida al contenido en xenoestrógenos, sin la interferencia de las hormonas naturales.

En el diseño experimental del estudio epidemiológico en que se encuadra nuestro trabajo se decidió utilizar la placenta como fuente de información para estimar la dosis interna de xenoestrógenos. La purificación de las muestras para el análisis cromatográfico se realizó mediante el empleo de HPLC semipreparativa, método ya desarrollado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo ([Rivas *et al.*, 1997](#), [Rivas *et al.*, 2001](#), [Fernandez *et al.*, 2004](#)), en condiciones que permiten obtener un alto rendimiento y que no se arrastren otras sustancias potencialmente tóxicas para las células empleadas en el ensayo biológico. Este método se ha realizado con éxito para muestras de suero, tejido adiposo y que se adapta perfectamente a las muestras de placenta.

La preocupación, puesta de manifiesto en esta memoria, por la exposición infantil a xenobióticos es la que inclinó a la cuantificación de los xenobióticos estrogénicos fundamentalmente pesticidas organoclorados, en muestras de placenta junto con el desarrollo metodológico que permitiera establecer la técnica adecuada para la estimación de la carga estrogénica total contenida en las muestra biológicas.

2. Objetivos

Si bien es cierto que los estudios realizados hasta la fecha no son concluyentes para confirmar una asociación entre la exposición materno-infantil a compuestos químicos con actividad hormonal y el riesgo de malformación del tracto genito-urinario, tampoco son los suficientemente demostrativos de la no existencia de tal asociación.

Dentro de este contexto, la exposición a disruptores endocrinos se ha presentado como una hipótesis que merece una especial atención, una vez que tanto los modelos de experimentación animal, como la observación medioambiental de especies animales, señalan la etapa de crecimiento embrionario y maduración fetal como un momento crítico para el efecto perjudicial de los contaminantes ambientales con actividad hormonal.

La realización de los estudios epidemiológicos en este sentido deberían considerar en la fase de diseño dos de las grandes dificultades que subyacen en la hipótesis que liga la disrupción endocrina y la malformación genitourinaria: la deficiente clasificación de los casos de criptorquidia y las dificultades de estimación de la exposición medioambiental a disruptores endocrinos.

No cabe duda que la primera de las dificultades puede superarse en gran parte con el establecimiento de criterios estrictos y homogéneos de clasificación tras la exploración clínica. El segundo problema parece más arduo en su resolución ya que el conjunto de xenoestrógenos es en términos numéricos lo suficientemente grande e incompleto para ser abarcado en un solo estudio y el desarrollo de biomarcadores de exposición es muy precario.

Por tanto, la hipótesis principal de este trabajo que se basa en la posibilidad de que la exposición intrauterina a compuestos medioambientales con actividad hormonal pueda condicionar el desarrollo normal de las células de Sertoli y Leydig y tiene una manifestación precoz en las alteraciones clínicamente observables del tracto genitourinario masculino, puede ser resuelta con un diseño apropiado en el que se superen las dificultades antes enunciadas.

Los objetivos que se proponen en este trabajo son:

1. Describir la exposición a un grupo seleccionado de pesticidas organoclorados del recién nacido a través de la estimación de los residuos en tejido placentario.
2. Desarrollar un método para la cuantificación de la actividad hormonal estrogénica de las placentas atribuible a efecto combinado de los xenoestrógenos y estrógenos endógenos contenidos en el tejido.
3. Investigar los factores asociados a la presentación de malformaciones del tracto genitourinario (criptorquidia e hipospadias) en un estudio epidemiológico de casos y controles, de base hospitalaria.
4. Analizar el peso que la exposición intrauterina a pesticidas organoclorados y a xenoestrógenos tiene sobre el riesgo de presentación de criptorquidia e hipospadias una vez identificados los factores de riesgo previamente considerados y los factores confundentes evidenciados.

3. Material y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. INSTRUMENTACIÓN QUÍMICO-ANALÍTICA

Cromatógrafo líquido (HPLC)

Para el análisis de los contaminantes químicos presentes en las muestras biológicas ensayadas hemos utilizado un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), modelo Waters 501 Millipore, equipado con dos bombas y un inyector modelo U6K con capacidad de carga de 500 μ L. El detector Ultravioleta/Visible del mismo es del tipo Waters 490 Millipore, provisto del programa Millennium Chromatography Manager software.

Cromatógrafo de gases (CG)

Se ha utilizado un cromatógrafo de gases Varian-3350 (EE.UU) con detector de captura de electrones (^{63}Ni) y el sistema Millennium Chromatography Manager como software.

Cromatógrafo de gases/masas (CG/MS)

Se ha empleado también un cromatógrafo de gases/masas: Saturn Varian 2100 T GC/MS (Walnut Creek, CA) con inyector Varian 1177 columna

Columnas para cromatografía

Para las diferentes técnicas cromatográficas se han empleado diversas columnas:

- 1) columna de vidrio para cromatografía Pyrex con 6 mm de diámetro interno rellena con Alúmina de Merck (Alemania) [90 (70-230) nº. 1097]
- 2) columna modelo Lichrocart de Merck para HPLC rellena de Lichrospher (Si-60) con tamaño de partícula interno de 5 μm
- 3) columna capilar de metil silicona, para cromatografía de gases (VF-5ms 30m x 0,25mm DF= 0,25 CP894415) de Quadrex (EE.UU.).
- 4) columna de sílice para cromatografía de masas (VF-5ms 30m x 0,25mm DF= 0,25 CP894415)

Equipo de filtración para HPLC

Para la preparación y limpieza de los disolventes a emplear en los procesos de cromatografía se ha utilizado un equipo de filtración aplicado sobre un kitasato de Millipore. Las muestras se procesaron mediante jeringa y equipo de filtración Nucleopore.

Así mismo, se utilizó un baño de ultrasonidos en el que se introducían los disolventes químicos durante diez minutos, para eliminar las posibles burbujas de aire que contenían.

Rotavapor

Para la desecación de las muestras a presión reducida y temperatura controlada se ha empleado un rotavapor Büchi R-300® (Büchi, Italia).

3.1.2. CULTIVOS CELULARES

Incubadora de CO₂ para cultivos celulares

La incubadora de CO₂ termo regulada es una cámara que permite la regulación de la temperatura y la concentración de gases (aire y CO₂). Un ventilador mantiene homogénea la distribución de ambas variables en su interior. La humedad necesaria para contrarrestar la evaporación producida en su interior la proporciona un recipiente que contiene agua destilada.

Se han utilizado estufas incubadoras REVCO ÚLTIMA y ASSAB (Estocolmo, Suecia) modelo T-304. Las experiencias de cultivo se llevaron a cabo a la temperatura de $37,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$, en una atmósfera constituida por aire con 5% de CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ siempre que éstos sean superiores a un $\pm 0,1\%$. La saturación de la atmósfera con vapor de agua se logra al burbujear el CO₂, inyectado en la incubadora en dos cubetas llenas de agua destilada.

Contenedor de nitrógeno líquido

Las líneas celulares tumorales establecidas utilizadas en este trabajo se han almacenado en nitrógeno líquido a -173°C , utilizándose para ello un contenedor de nitrógeno líquido, marca Thermolyne Locator, modelo CY50900.

Cámaras de flujo laminar

Para evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares se han utilizado cabinas de flujo laminar vertical (Flow Laboratories, Irvine, Escocia). Su funcionamiento se basa en hacer circular corrientes de aire con una velocidad máxima de 0,46 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) garantizan el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

Microscopios

Para la observación de los cultivos celulares se ha utilizado un *microscopio invertido* Olympus IMT/201 que a diferencia de los convencionales tienen localizado el tambor con los objetivos debajo de la platina porta muestras y la iluminación incide por

la parte superior. El microscopio está dotado de tres objetivos de diferentes aumentos (x10, x20 y x40) y de un ocular con posibilidad de aplicación de un dispositivo fotográfico con contraste de fases.

Recuento celular

Para el recuento de elementos celulares en suspensión, se utilizaron los aparatos siguientes:

Lector de placas de densidad óptica: Para algunas experiencias de proliferación celular se ha utilizado conjuntamente con lo anterior 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).

3.2. Métodos

3.2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En Octubre de 2000 se inició un estudio epidemiológico prospectivo donde se reclutaron recién nacidos varones en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Durante este tiempo se indexaron un total de 668 niños de los 4455 varones nacidos. De la cohorte establecida se seleccionó una subpoblación de casos y controles. Se trata de un diseño observacional e individual, en el que se comparan un grupo de sujetos (casos) que presentan el efecto objeto de estudio, alteraciones congénitas en el desarrollo del aparato genital masculino, con otro grupo de individuos que no lo poseen (controles), en relación a la presencia de determinadas características o factores de riesgo (exposición a contaminantes ambientales, disruptores endocrinos, en muestras biológicas). El reclutamiento se mantuvo durante, aproximadamente, dos años, finalizando en Junio de 2002.

3.2.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

La recogida de información del presente estudio fue llevada a cabo en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, hospital de referencia para toda el área sur de la provincia de Granada, con una población de referencia estimada de 280.123 personas.

3.2.3. POBLACION DE ESTUDIO

3.2.3.1. Población de referencia

Inicialmente, la población de referencia en el estudio estaría constituida por todos los varones recién nacidos en la provincia de Granada en el período de reclutamiento comprendido entre Octubre de 2000 y Junio de 2002. No obstante, al tratarse de un estudio de casos y controles de base hospitalaria, y en función de algunas imposiciones del diseño del estudio que más adelante se detallarán, es necesario realizar las puntualizaciones que se describen seguidamente.

A) Casos

Se consideró como caso a todos los niños de sexo varón nacidos durante el periodo de reclutamiento que presentaban criptorquidia y/o hipospadias, de acuerdo con los siguientes criterios:

- Diagnóstico de criptorquidia: testículo ubicado fuera de la bolsa escrotal, identificable en cualquier punto del trayecto fisiológico que debe recorrer hasta llegar a ella desde su lugar de formación cerca del polo inferior del riñón.
- Diagnóstico de hipospadias: malformación peneana consistente en un defecto ventral de la uretra e incurvación ventral del pene.

B) Controles

Se consideró como control a todo niño de sexo varón nacido durante el periodo de reclutamiento, que no presentaba ninguna de las patologías propias de los casos.

Para cada caso se le asignaron *a priori* dos controles, teniendo en cuenta los siguientes criterios de apareamiento:

- Paridad (Primípara o multípara)
- Fecha de nacimiento (± 15 días)
- Semana de gestación (± 7 días)

3.2.3.2. Población potencialmente elegible

La población potencialmente elegible del presente estudio estuvo constituida por aquella fracción de las poblaciones de referencia de los casos y de los controles durante el período de estudio en el Servicios de Ginecología del Hospital Universitario San Cecilio, que cumpliera los siguientes criterios adicionales de inclusión y exclusión:

A) Criterios de inclusión

Consentimiento informado requerido a los padres del niño, de forma escrita, previa información sobre los objetivos del estudio y los requisitos para su realización.

B) Criterios de exclusión

Rehusar participar en el estudio.

3.2.3.3. Muestra

A) Factores determinantes

El tamaño y las características de la muestra finalmente estudiada estuvieron condicionados por las siguientes circunstancias:

A) Tamaño prefijado: no fue posible realizar una estimación previa del tamaño muestral necesario, por las siguientes razones:

- Ausencia de información *a priori* sobre la prevalencia de las patologías propias de los casos.
- Ausencia de información *a priori* sobre la magnitud de la asociación entre la concentración de contaminantes ambientales (pesticidas en placenta) y la presencia de anomalías congénitas del desarrollo urogenital masculino.

Desde esta perspectiva, el proyecto de tesis se planteó como un estudio de investigación, cuyos resultados habrían de tener repercusiones, de cara a planear posteriores estudios. Por ello, y dado el elevado coste en personal y en material derivado del reclutamiento y de las determinaciones analíticas efectuadas sobre las muestras de placenta, junto con la relativa rareza de las patologías incluidas, las únicas condiciones previas impuestas al tamaño muestral fueron las siguientes:

- Proponer en la medida de lo posible, un diseño caso-control con una razón *a priori* de 1:2, para ambos grupos de casos.
- Obtener un número mínimo de 50 sujetos en el grupo de estudio de los casos y sus correspondientes controles.

B) Factibilidad de la obtención de información: de una parte de la población incluida en la muestra final, no se logró información para todas o algunas de las variables del estudio, por las siguientes razones:

- No disponibilidad del cuestionario realizado a la madre.
- No disponibilidad del examen físico del niño.
- No disponibilidad de las muestras biológicas debido a que en diversas ocasiones, por razones ajenas a la voluntad del investigador, el personal clínico no pudo obtener las muestras para su procesamiento.
- Pérdida de las muestras biológicas: por fallos puntuales en el proceso de transporte, identificación, almacenamiento y procesamiento las muestras biológicas obtenidas no pudieron ser finalmente procesadas.

B) Tamaño final

Finalmente, la muestra del estudio [sujetos para los que se dispuso de información sobre su status de efecto (criptorquidia y/o hipospadias), y sus controles apareados; y al menos una de las variables independientes consideradas], estuvo constituida por 164 sujetos, repartidos en los siguientes grupos:

- Casos: 50 sujetos
- Controles: 114 sujetos

3.2.4. RECOGIDA DE LA INFORMACIÓN

La información se obtuvo a partir de las siguientes fuentes: por una parte se realizó una encuesta epidemiológica a la madre, así como un examen físico al recién nacido y por otra, se analizaron la muestra biológica (placenta) obtenidas en el momento del parto a los dos grupos (los casos y los controles).

3.2.4.1. Encuesta epidemiológica

Se realizó una encuesta epidemiológica donde se recoge información sobre hábitos de vida, historia clínica de la madre (variables relacionadas fundamentalmente con el embarazo y antecedentes obstétricos) y otros datos sociodemográficos y antropométricos de interés. Del mismo modo se realizó un examen físico al recién nacido tras el nacimiento (\pm 48 horas) donde se recogían las siguientes variables: edad gestacional, peso, talla, perímetros, patologías asociadas, y otras variables de interés. La encuesta epidemiológica junto con el protocolo de examen físico se presentan en el apartado de anexos.

3.2.4.2. Muestras biológicas

3.2.4.2.1. Obtención y almacenamiento de las muestras biológicas

Dado que una parte esencial del diseño adoptado es la medida de la exposición mediante métodos químicos y biológicos, se prestó especial atención al muestreo biológico con la obtención, tras consentimiento informado de la madre, de muestras de sangre materna, sangre de cordón umbilical y placenta.

Las muestras de placenta fueron obtenidas en paritorio, durante el parto y se transvasaron a un vial de congelación tras su identificación manteniéndose a -70°C hasta su estudio. A cada muestra se le asigna un número de código que consta de la letra C y 3 dígitos que identifica al paciente (C-000).

3.2.4.2.2. Análisis químico de pesticidas en muestras de placenta

A) Extracción y purificación de las muestras

De los distintos procedimientos de extracción, el más utilizado habitualmente se basa en la separación por cromatografía de adsorción en columna, utilizando distintos adsorbentes (alúmina, carbón activado, sílica gel, sephadex, etc., o mezcla de ellos) y eluyentes como éter de petróleo, éter etílico, hexano, etc. Esta metodología permite eliminar prácticamente la totalidad de las sustancias interferentes. En este trabajo, para la extracción de los xenoestrógenos a partir de las muestras de tejido adiposo, se ha desarrollado una metodología basada en el método descrito en 1984 por Okond'ahoka modificado y validado por nuestro grupo de trabajo (Okond'ahoka *et al.*, 1984, Botella *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2001).

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 para cromatografía, con la alúmina preparada.
- 4) Se pesan 1,6g de la muestra de tejido placentario, mantenida hasta su procesamiento a una temperatura de -70°C.
- 5) Dicha alícuota de tejido placentario se homogeniza en un homogenizador de pistón con 2 mL de hexano.
- 6) Se vierte el extracto orgánico sobre la parte superior de la columna de cromatografía 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 eluido se concentra en el rotavapor hasta un volumen final de 1 mL, cuidando no llegar a sequedad.
- 9) El extracto obtenido se deseca completamente en corriente de nitrógeno.

B) Cromatografía de purificación mediante HPLC

El residuo seco se purifica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): se disuelve el extracto en 1mL de hexano y se somete a un proceso cromatográfico que permite la separación de xenoestrógenos de estrógenos naturales, sin destruirlos. El mililitro se inyecta en HPLC y eluye mediante un gradiente de concentraciones con dos fases móviles: n-hexano (fase A) y n-hexano: metanol: 2-isopropanol (40:45:15)(v/v) (fase B) a un flujo de 1,0 mL/min. Las condiciones de trabajo fueron: tiempo (t) = 0 min, 100% fase A; t = 17 min, 60% fase A; t = 25 min,

100% fase B; $t = 32$ min, 100% fase A. El eluido se recoge en tres fracciones. La fracción α se colecta durante los 11 primeros minutos, la fracción x entre los minutos 11 y 13 y por último la fracción β se colecta entre los minutos 13 y 25 (Brotons *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1996; Rivas *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2004).

Las fracciones α de HPLC se secaron, disolvieron en hexano, marcaron con el patrón interno (p,p'-diclorobenzofenona) e inyectaron en el cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (DCE). En cromatografía de gases, las fracciones x y β no presentaron señal.

C) Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE)

El método utilizado para determinar pesticidas organoclorados es la cromatografía de gases con detector de captura de electrones, debido a que son moléculas que en su estructura tienen átomos de cloro y responden muy bien a dicho detector. Las condiciones de trabajo fueron: DCE a 300°C; inyector a 250°C; Programa: T^a inicial 130°C (1 min); 20°C/min hasta 150°C; 10° C/min hasta 200°C; 20°C/min hasta 260°C (20 min). El gas portador fue nitrógeno a un flujo de 30 mL/min y el gas auxiliar nitrógeno a un flujo de 40 mL/min. El volumen de inyección fue 1 μ L. Con objeto de que el análisis cromatográfico fuese cuantitativo se siguió el método del patrón interno. Para ello, se seleccionó un compuesto químico p,p'-diclorobenzofenona cuyas características analíticas permitieran un comportamiento similar al de las moléculas a analizar, con un tiempo de retención situado en el punto intermedio del cromatograma realizado con las sustancias problema, con una elevada calidad analítica y un grupo de pureza superior al 99%. La reproducibilidad para el patrón interno fue excelente y la curva de calibrado tenía un ajuste $R^2 = 0,988$ en un rango de concentraciones comprendidas entre 0,03-1,50 μ g/mL.

La determinación de los límites de detección de los compuestos a estudiar se estableció de acuerdo con MacDougall y Long (MacDougall *et al.*, 1980; Long y Wineffordner, 1983). Por último, para la realización de las curvas de calibrado y el cálculo del factor de respuesta se utilizó la técnica del patrón interno de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Los valores del ajuste lineal de los datos experimentales pusieron de manifiesto la precisión del método desarrollado.

Los tiempos de retención de los 16 compuestos químicos analizados se muestran en la siguiente tabla, junto con curvas de calibrado, coeficientes de correlación (R^2), linealidad del detector, límite de cuantificación de los pesticidas organoclorados en cromatografía de gases.

Pesticidad	TR (min.)	Curva de calibrado	R^2	Linealidad del detector (ng/mL)	Límite de cuantificación (ng/mL)
Lindano	7.990	$y=0.0079x+0.0644$	0.9888	1.0-100	0.5
E-eter*	8.87	$y=0.0344x+0.0882$	0.9512	0.1-20.0	0.1
Aldrin	9.770	$y=0.0041x+0.0457$	0.9657	1.0-200	1.0
E-lactona	10.19	$y=0.0355x+0.2405$	0.9911	0.1-20.0	0.1
E-diol	10.48	$y=0.0437x+0.1905$	0.9942	1.0-10.0	0.5
E- I	11.04	$y=0.0035x+0.1081$	0.9423	0.5-150	0.5
p,p` DDE	11.29	$y=0.0056x+0.0358$	0.9967	1.0-200	1.0
o,p`DDD	11.41	$y=0.0010x+0.0214$	0.9979	1.0-500	1.0
Dieldrin	11.53	$y=0.0049x+0.0804$	0.9914	1.0-150	1.0
Endrin	11.80	$y=0.0037x+0.0097$	0.9895	3.0-300	3.0
E- sulfato	11.87	$y=0.0163x+0.0403$	0.9767	0.5-20.0	0.5
o,p`DDT	12.13	$y=0.0023x+0.0652$	0.9880	1.0-200	1.0
E-II	12.61	$y=0.0042x+0.2330$	0.9666	2.0-200	2.0
p,p`DDT	12.71	$y=0.0071x+0.0072$	0.9970	1.0-100	1.0
Metoxicloro	13.81	$y=0.0069x+0.0244$	0.9980	1.0-50.0	1.0
Mirex	15.62	$y=0.0023x+0.1008$	0.9913	1.0-500	1.0

*E= endosulfan

D) Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

En todos los casos se llevó a cabo la confirmación de dichos pesticidas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Las condiciones de trabajo del CG fueron: T^a del horno: 50°C (2min), 30°C/min hasta 185°C (1 min), 2°C/min hasta 250°C y a 30°C/min hasta 300° (5 min); T^a del inyector: 250°C; flujo del inyector: 1mL/min. Temperatura de la trampa de iones del espectrómetro de masas 200°C, temperatura del Manifold 50°C, temperatura de la línea de transferencia 280°C, voltaje de modulación axial 3.8 voltios; gas portador He. Volumen de inyección 2 µL.

La tabla siguiente muestra los tiempos de retención de cada uno de los pesticidas confirmados por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Pesticida	Tiempo de retención (min)
Aldrin	15.999
Endrin	23.102
Dieldrin	21.755
E-eter	13.332
E-lactona	11.409
E-diol	23.500
E- sulfato	26.554
E- I	20.084
E-II	23.880
Lindano	11.741
o,p`DDT	24.433
p,p`DDT	26.996
o,p`DDD	21.925
p,p` DDE	21.504
Metoxicloro	31.482
Mirex	34.633

3.2.4.2.3. Metodología biológica

A) Líneas celulares

Se ha utilizado la línea celular de cáncer humano MCF-7. Esta línea fue establecida por Soule y colaboradores (Soule *et al.*, 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. Sonnenschein (Tufts University, Boston, EE.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.

B) Experimentos de proliferación celular: Test E-Screen

El test E-Screen se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Soto (Soto *et al.*, 1992) modificada por Villalobos (Villalobos *et al.*, 1995). Las células MCF-7 en confluencia fueron tripsinizadas y alícuotas de esta suspensión se sembraron en placas de 24 pocillos a concentraciones iniciales de 20.000-40.000 células por pocillo en medio de mantenimiento, medio mínimo esencial y con rojo fenol, DMEM(+RF), suplementado con el 5% de suero bovino fetal. Una vez que las células están adheridas al soporte plástico de la placa (generalmente 24-48 horas) se retira el medio de mantenimiento y se añade medio experimental desprovisto de rojo fenol y suplementado con el 10% de suero humano desprovisto de estrógenos, CDHuS. Estradiol 17- β y las alícuotas de las fracciones α y β se añaden al medio de cultivo. El ensayo finaliza a las 144 horas de subcultivo (fase exponencial) tras la aspiración del medio y la fijación de las células para la aplicación de la técnica de la sulforrodamina-B, pudiendo, finalmente, comparar la proliferación celular inducida por el estradiol y las alícuotas de las fracciones α y β .

C) Evaluación de la estrogenicidad de los extractos de tejido placentario: fracciones α y β

Las fracciones cromatográficas α y β obtenidas por cromatografía líquida preparativa se ensayaron en el ensayo biológico E-Screen para determinar la carga hormonal correspondiente a cada fracción. Para ello, los extractos secos y duplicados de ambas fracciones se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo experimental suplementado con el 10% CDHuS y se agitaron con un vortex durante, al menos 5 minutos. Posteriormente las fracciones se esterilizaron con filtro de tamaño de poro de 0,22 μm y se realizaron diluciones en medio de cultivo 1:1, 1:5 y 1:10 con objeto de poder asegurarse que efectos tóxicos de las muestras no enmascararan actividades estrogénicas o antiestrogénicas. Las diluciones obtenidas se sometieron, finalmente, al test E-sceen junto a grupos celulares no tratados (control) y a grupos celulares expuestos a estradiol-17 β a concentración 10 pM.

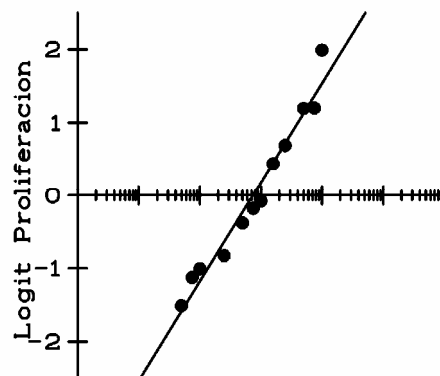
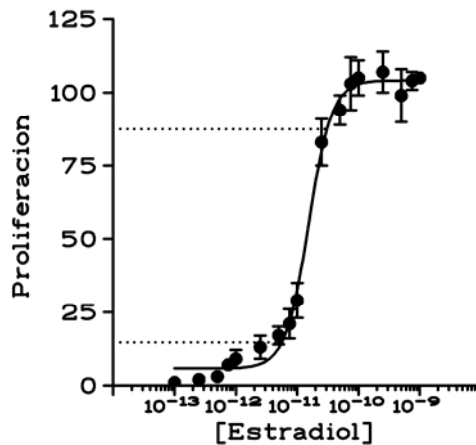
La actividad biológica de las muestras de tejido placentario extraídas y testadas en el ensayo E-Screen permite cuantificar el efecto hormonal estrogénico y puede ser transformada en *unidades equivalentes de estradiol* (Eeq), es decir, la concentración de estradiol que produciría un efecto proliferativo similar. Este concepto ha sido definido como carga estrogénica total efectiva (TEXB) (Rivas *et al.*, 2001), ya que asigna un valor de estrogenicidad a las muestras biológicas y convierte un marcador de exposición en un marcador de equivalencia biológica y de efecto biológico (Fernández *et al.*, 2004). En este estudio nos referiremos a la TEXB α o β según haga referencia a la carga estrogénica total efectiva de una u otra de las fracciones cromatográficas antes mencionadas.

Como paso previo a la aplicación del test E-Screen a los extractos de placenta de la población de estudio, fue necesario optimizar el bioensayo. Para ello se realizaron de forma sucesivas curvas estándar construidas para la respuesta proliferativa con estradiol-17 β y su transformación logarítmica para la correcta lectura de los valores de proliferación. La curva estándar se actualiza de forma programada con la inclusión de datos numéricos generados en cada ensayo (Figuras 1 y 2). Todos aquellos puntos experimentales que puedan leerse en la parte lineal de la curva sigmoide de dosis-respuesta son considerados en la lectura de equivalentes de estradiol. La parte lineal de la curva considera el segmento comprendido entre el 15 y el 85% de la respuesta máxima para el estrógeno natural.

Los datos de proliferación correspondientes a las diluciones 1, 1:5 y 1:10 de cada extracto de tejido placentario se transforman tras la aplicación del factor de corrección para la dilución de cada punto experimental, procediendo al cálculo de la

media aritmética de los datos obtenidos. En la curva estándar estos datos se extrapolan a sus valores correspondientes de equivalentes de estradiol.

Los resultados finales se expresan además de equivalentes de estradiol por mililitro, en función del contenido en lípidos y en función de los gramos de placenta utilizados.



Figuras 1 y 2: Curva estándar de estradiol y su transformación logit. Utilizando concentraciones conocidas del estrógeno natural comprendidas entre 0,1 pM y 1 nM, se contruye de forma periódica una curva sigmoide que relaciona concentración con efecto proliferativo relativo. Se ha señalado el rango útil de lectura de la curva estándar que resulta lineal en la transformación logit.

3.2.5. VARIABLES RECOGIDAS

A continuación se describen todas las variables utilizadas en el presente estudio, tanto las recogidas originalmente a partir de las fuentes de información antes descritas, como las variables nuevas construidas mediante transformaciones, recodificaciones y combinación de las variables originales.

3.2.5.1. Variables de la encuesta epidemiológica

3.2.5.1.1. De la madre

- Edad de la madre al parto: Variable cuantitativa continua, obtenida como la diferencia entre el día del parto del correspondiente caso o control y el día de nacimiento de la madre, expresada en años completos. Para el análisis descriptivo esta variable se codificó en cuatro categorías: < 20 años/ 20-26 años/ 26-30 años/ >30 años. Para el análisis estadístico bivariante y multivariante posterior, fue recodificada en solo 2 categorías: ≤ 30 años/ >30 años.
- Grupo sanguíneo: variable categórica nominal policotómica que presenta las siguientes categorías: O/ A/ B/ AB.
- Rh: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: positivo y negativo.
- Peso al inicio del embarazo: variable cuantitativa continua expresada en Kg. Esta variable se codificó en cuatro categorías: < 55 kg/ 55-60 kg/ 61-68 kg/ ≥ 69 kg.
- Peso en la última visita durante el embarazo registrada: variable cuantitativa continua expresada en Kg. Esta variable se codificó en cuatro categorías: <67 kg/ 67-74 kg/ 74-82 kg/ ≥ 83 kg.
- Cambio de peso: variable cuantitativa continua expresada en Kg.
- Índice de masa corporal o de Quetelet (IMC): variable cuantitativa continua calculada dividiendo el peso de la mujer en Kg entre la talla en m al cuadrado. Se categorizó posteriormente mediante los cuartiles, en las siguientes categorías: <20,65/ 20,65 – 23,05 Kg/cm²/ $\geq 23,05$ – 25,79 Kg/cm²/ $\geq 25,80$ Kg/cm².

- Estado civil: Variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casada/ conviviendo con su pareja/ soltera.
- Lugar de residencia durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica, con tantas posibles categorías como municipios figuran en el censo correspondiente a la provincia de Granada. Esta variable se recategorizó posteriormente, con los siguientes grupos: municipios rurales (aquéllos con menos de 10.000 habitantes) / municipios urbanos (aquéllos con más de 10.000 habitantes).
- Nivel de escolaridad: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: sin estudios/ estudios primarios/ medios/ Formación profesional (FP)/ Diplomatura/ Licenciatura.
- Actividad laboral actual: Variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como profesiones afines. Posteriormente fue recodificada en tres categorías: hogar/ agricultura/ otras.
- Exposición a productos químicos: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
- Edad de la menarquia: variable cuantitativa continua expresada en años completos. Se utilizaron las categorías: ≤ 11 años / 12-13 años / ≥ 14 años en el análisis descriptivo.
- Abortos previos: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: si y no.
- Paridad: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: primípara y multípara.
- Uso de anticonceptivos: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
- Uso de anticonceptivos orales (ACO): variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.

-
- Duración del consumo de ACO: variable cuantitativa continua expresada en las siguientes categorías: menos de 1 año/ 1-5 años/ 6-15 años.
 - Tiempo en que deja los anticonceptivos hasta que se queda embarazada: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: menos de 2 meses/ 2-4 meses/ 5-12 meses/ más de 1 año.
 - Tratamiento de infertilidad: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
 - Problemas durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
 - Tipo de problema: variable categórica nominal policotómica con las categorías: pérdida de líquido amniótico/ náuseas/ vómitos/ hemorragia vaginal.
 - Consumo de fármacos durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica con las categorías: sí y no.
 - Tipo de fármacos consumidos durante el embarazo: variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como fármacos indicaron las madres. Esta variable fue posteriormente recategorizada en las siguientes categorías: relajantes uterinos/ antibióticos/ preparados hormonales/ antieméticos/ analgésicos/ antianémicos.
 - Suplementos dietéticos consumido durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
 - Tipo de suplemento dietético: variable categórica nominal policotómica con las categorías: ácido fólico/ hierro/ calcio.
 - Consumo de alcohol: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
 - Consumo de drogas: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.

- Consumo de tabaco: variable dicotómica con las siguientes categorías: no fumador/ fumador.
- Percepción de exposición al tabaco: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
- Tiempo de exposición al tabaco: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: menos de 30 minutos al día/ de 30 minutos a 2 horas al día/ más de 2 horas al día.
- Uso de cosméticos durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
- Tipos de cosméticos utilizados: variable policotómica con las siguientes categorías: crema/ loción/ aceite/ varios.
- Parte del cuerpo en el que uso los cosméticos: variable nominal policotómica con las siguientes categorías: todo el cuerpo/ parte superior del cuerpo/ parte inferior del cuerpo/ brazos y piernas/ solo barriga/ varias.
- Tratamiento del pelo durante el embarazo: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
- Tipo de tratamiento del pelo: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: mechas/ tinte-champú colorante/ permanente.
- Periodo de gestación en el que se trató el pelo: variable categórica nominal policotómica con las categorías: 1º trimestre/ 2º trimestre/ 3º trimestre/ todo el parto.
- Tipo de terminación del parto: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: espontáneo/ cesárea / instrumental.
- Tipo de instrumentalización en el parto: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: fórceps/ vacuo / espátulas/ desconocida.

-
- Tipo de presentación en el parto: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: cefálica / nalgas / transversa.
 - 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 días.
 - Frecuencia de consumo de quesos 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 días.
 - Frecuencia de consumo de quesos añejos: 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 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 días.
 - Frecuencia de consumo de carne de soja: 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 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 días.
 - Frecuencia de consumo de ensaladas: 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 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 días.

- Frecuencia de consumo 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.

- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- 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 días.
- Frecuencia de consumo de productos ecológicos: 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.

3.2.5.1.2. Del padre

- Edad: Variable cuantitativa continua expresada en años completos.
- Problemas en las gónadas: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.
- Nivel de escolaridad: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: sin estudios/ estudios primarios/ medios (BUP)/ Formación profesional (FP)/ Diplomatura/ Licenciatura.
- Profesión: variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como profesiones afines existen. Posteriormente fue recodificada en dos categorías: agricultura/ otras.
- Exposición a productos químicos: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí y no.

3.2.5.1.3. Del niño

- Edad gestacional: variable cuantitativa continua expresada en semanas y en días. Se establecieron las siguientes categorías: 32-37semanas/ 37-39 semanas / ≥ 39 .
- Estación de año: variable categórica nominal policotómica en la que se recogen las siguientes categorías: primavera/ verano/ otoño/ invierno.
- Peso al nacer: variable cuantitativa continua expresada en gramos. Esta variable se codificó en las siguientes categorías: < 2500 g / ≥ 2500 g .
- Longitud: variable cuantitativa continua expresada en centímetros.
- Perímetro cefálico: variable cuantitativa continua expresada en centímetros.
- Presencia de criptorquidia y/o hipospadias: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: presencia y ausencia. En el caso que la malformación fuese criptorquidia, esta variable a su vez se codificó además teniendo en cuenta el tipo (localización) y la severidad de la misma (Toppari *et al.*, 1995).

- Otras incidencias en el tracto genito-urinario: variable categórica nominal policotómica con los siguientes diagnósticos: hidrocele/ micropene/ epispadia/ fimosis/ hidrocele y fimosis/ hidrocele, micropene y fimosis/ malformación en el prepucio/ malformación del prepucio y fimosis.

3.2.5.2. Variables del análisis de las muestras de placenta

- Presencia de cada uno de los 16 pesticidas analizados en placenta: Variable dicotómica con las categorías si y no.
- Número de pesticidas identificados en la muestra: variable cuantitativa expresada en número desde 1 hasta 16 pesticidas.
- Concentración de cada uno de los 16 pesticidas analizados en tejido adiposo: variable cuantitativa continua expresada en ng/gramo (ng/g) de tejido placentario, obtenida para los pesticidas organoclorados analizados: aldrín, endrín, dieldrín, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, endosulfán sulfato, o,p'-DDT, pp'-DDT, o,p'-DDD, p,p'-DDE, lindano, mirex y metoxicloro. Esta variable cuantitativa continua se ha caracterizado en rangos distintos según cada caso. Para DDT se calculó además el sumatorio de las concentraciones de este compuesto y metabolitos halladas en la muestra, expresado como ng DDE/g de placenta. Igualmente se ha hecho con endosulfán y metabolitos, expresando el sumatorio como ng endosulfán l/ g placenta.

3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis epidemiológico de la información recabada por medio del cuestionario, el examen físico de los recién nacidos, el análisis químico y el ensayo biológico del tejido placentario, se ha centrado fundamentalmente en: i) describir las variables de exposición, ii) caracterizar la muestra de estudio (casos y controles) en función de los potenciales factores de riesgo para criptorquidia e hipospadias, iii) caracterizar la carga estrogénica de las fracciones α y β en función de los potenciales factores de riesgo para criptorquidia e hipospadias, iv) estudiar la relación entre los niveles en placenta de diversos organoclorados o de la carga estrogénica y algunas

variables antropométricas y de historia reproductiva y v) estimar el riesgo asociado a la presencia en placenta de determinados niveles de plaguicidas y a la carga estrogénica de las fracciones α y β .

3.2.6.1. Estudio descriptivo

Para las variables cuantitativas continuas se obtuvieron sus parámetros de tendencia central (media, 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, excluyendo los casos con valores faltantes.

3.2.6.2. Análisis bivariante

Se analizó si existían diferencias en la variable de malformación del tracto genito-urinario masculino en los recién nacidos, según las variables independientes. Para ello se usó la prueba chi cuadrado para las variables independientes cualitativas o la prueba de Fisher para las muestras con menos de 5 individuos. Para las variables independientes continuas se utilizó regresión logística condicional. Para cuantificar la fuerza de la asociación, se calculó la Odds ratio cruda y la Odds ratio ajustada mediante regresión logística condicional. Para cada factor de riesgo potencial se diseñó un modelo específico en el que además de la variable explicativa se incluyeron otras variables que, a partir de los resultados del análisis crudo y la bibliografía, pudieran comportarse como variables de confusión. Para todas las Odds ratio se calcularon los intervalos de confianza del 95%.

Carga estrogénica total efectiva TEXTB: Las diferencias en los valores medios de TEXTB- α y TEXTB- β según los factores de riesgo de criptorquidia e hipospadias se testaron por medio de la t de Student o del ANOVA, cuando se requirió comparar más de dos medias. La relación entre la carga estrogénica de ambas fracciones y los factores de riesgo se testó por medio de un contraste de tendencia lineal.

Dado que los niveles de organoclorados y los de carga estrogénica, a pesar de su transformación logarítmica, no se ajustaban frecuentemente a una distribución normal, también se aplicó el test no paramétrico ANOVA de una vía.

3.2.7. APLICACIONES INFORMÁTICAS

Los datos procedentes de las encuestas epidemiológicas fueron introducidos en una base de datos SPSS (versión 11) junto con los datos procedentes del análisis de las muestras biológicas de tejido placentario.

4. Resultados

4.1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO. PARTICIPACIÓN

Como se ha indicado en la sección de Material y Métodos, la población objeto de estudio fue la correspondiente a los recién nacidos varones durante el periodo de reclutamiento comprendido entre Octubre de 2000 y Junio de 2002, en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Durante este tiempo se reclutaron un total de 668 niños de los 4455 varones nacidos. Dentro de esta cohorte se estableció un estudio de casos controles anidado, en donde *a priori* se asignaron 2 controles para cada caso, siguiendo los criterios de apareamiento ya descritos.

Mediante este procedimiento se identificaron 50 casos (niños nacidos con malformación del tracto genitourinario) y 114 controles apareados. De los 50 casos hubo que excluir a dos (4% de pérdida) debido a que sus madres rechazaron participar en el estudio. De los 48 casos restantes, en 13 de ellos se dispone de información incompleta, (en 12 casos no se obtuvo muestra de placenta y en 1 no se realizó la encuesta antes del alta hospitalaria de la madre). De los 114 controles apareados, la información obtenida también fue incompleta para 14 de ellos, (en 5 controles no se obtuvo muestra de placenta y en 9 no se realizó la encuesta antes del alta hospitalaria de la madre).

Se obtuvo tejido placentario en 36 (75%) casos y en 109 (95,6%) controles, a la que se le realizó tanto el análisis químico de los compuestos seleccionados como el análisis de la carga estrogénica.

Todas las madres fueron informadas del objeto del estudio, de la colección de muestras biológicas y del examen físico que se le realizaría al niño, una vez obtenido consentimiento para participar en el estudio se obtuvo la aprobación y se siguieron los criterios establecidos por el Comité de Ética del hospital. La confidencialidad de los datos se ha mantenido 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.

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

En primer lugar, se presenta la información obtenida en el cuestionario epidemiológico pasado a las 162 madres reclutadas en el momento del parto, así como los parámetros recogidos tras el examen físico realizado a los recién nacidos, con objeto de investigar posteriormente los posibles factores determinantes de la concentración de compuestos organoclorados en tejido placentario y la asociación con el riesgo de malformación del tracto genitourinario.

De esta manera, se muestran a continuación las secciones que recogen los datos estadísticos descriptivos para cada una de las características epidemiológicas de la población de estudio. En el caso de las variables cuantitativas se estima la media, mediana y desviación estándar para cada una de ellas. Para las variables cualitativas se calcula el valor de n y el porcentaje de frecuencia y, en algunas de ellas, se categoriza según el número de valores que puedan tomar.

4.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

Se muestran a continuación los datos obtenidos en el análisis de las encuestas para la información concerniente a las madres.

4.2.1.1. Variables antropométricas

Edad: La edad media de las madres incluidas en el estudio en el momento del parto fue de 29 años (DE \pm 4,96), con un mínimo y un máximo de 17 y 43 años respectivamente. Esta variable se codificó para el análisis descriptivo en cuatro categorías.

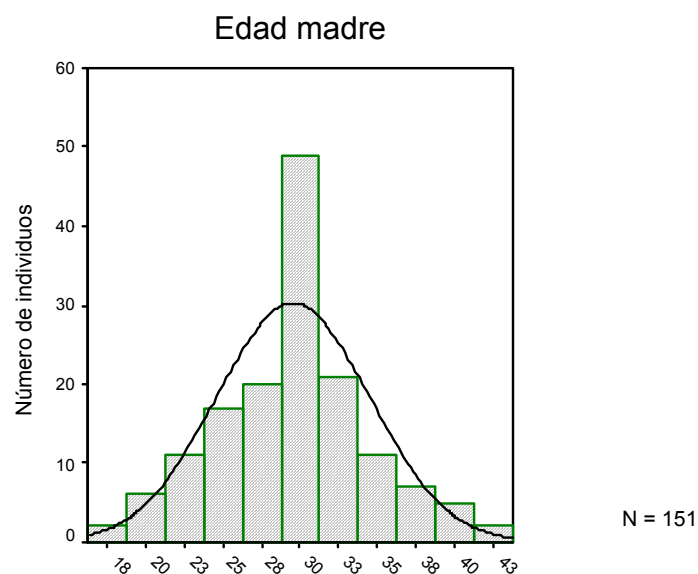
Edad (años)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	29,5 \pm 4,9	30		
< 20			3	2,0
20-26			28	18,5
\geq 26-30			58	38,4
> 30			62	41,1
Total			151	100

DE: desviación estándar

Para el análisis bivariante la variable edad de la madre se recodificó posteriormente en 2 categorías como se presenta en la tabla siguiente.

Edad (años)	n	%
\leq 30	73	48,3
> 30	78	51,7
Total	151	100

La gráfica siguiente muestra el histograma de frecuencias de presentación por edades.



Grupo sanguíneo y Rh: los grupos sanguíneos que predominan han sido grupo A (45,5%) y 0 (41,3%) y el factor Rh predominante fue el positivo en el 90,1% de las madres, como se muestra en la siguiente tabla. El valor de n ha disminuido a 121, debido a la ausencia de esta información en la historia clínica de algunas de las madres.

Grupo sanguíneo	n	%
0	50	41,3
A	55	45,5
B	9	7,0
AB	7	5,8
Total	121	100
Rh		
Positivo	109	90,1
Negativo	12	9,9
Total	121	100

Peso al inicio del embarazo: el peso medio antes del embarazo fue de 62 kg (DE \pm 1,67), con un mínimo y un máximo de 43 kg y 110 kg, respectivamente.

Peso al inicio del embarazo (kg)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	62,7 \pm 11,7	60,0		
< 55			39	25,8
55 – 60			37	24,5
61 – 68			39	25,8
\geq 69			36	23,8
Total			151	100

Peso después del embarazo: la media obtenida fue de 75 kg (DE \pm 12,3), con un rango de valores entre 50 y 122 kg, lo que supone un incremento medio de 13 kg, como se muestra en las tablas siguientes.

Peso después del embarazo (kg)	Media \pm DE	Mediana	n	%
	75,7 \pm 12,3	75,0		
< 67			36	23,8
67 – 74			39	25,8
\geq 74 – 82			43	28,5
\geq 83			33	21,9
Total			151	100

La variación de peso antes/después del embarazo sitúa el incremento medio en 13 kg.

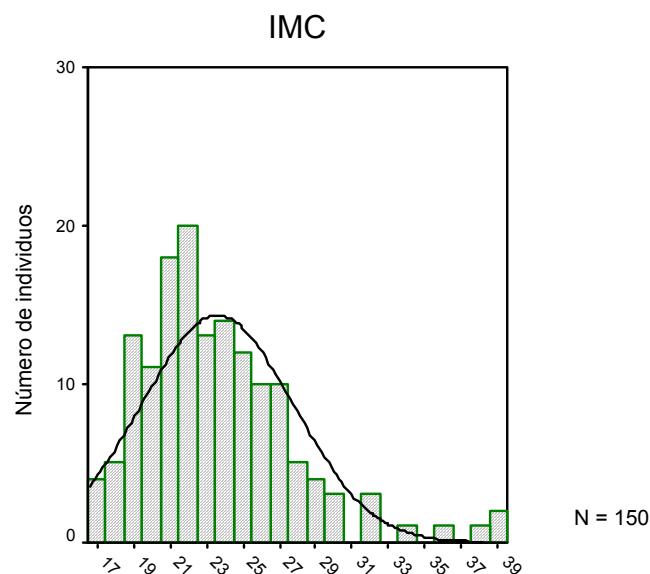
Cambio de peso en el embarazo (kg):

Media	± DE	Mediana	Mínimo	Máximo
13,1	5,4	12,0	-7	29

Índice de masa corporal (IMC): La variable cuantitativa IMC fue calculada dividiendo el peso de la mujer al inicio del embarazo en Kg entre la talla en metros, elevada al cuadrado (Kg/m^2). La media ($23,6 \pm 4,2$) esta dentro de los valores normales de IMC que considera la OMS, de este modo la mayoría de las madres de nuestro estudio no presentaron sobrepeso. El valor de la media será el punto de cohorte para el análisis bivariante. A continuación se muestran los datos numéricos y las tablas correspondientes, el valor de n disminuye a 150 debido a que dos de las mujeres no recordaron el peso al inicio del embarazo.

IMC (Kg/m^2)	Media ± DE	Mediana	n	%
	$23,6 \pm 4,2$	22,9		
< 20,65			37	24,7
20,65 - 23,05			38	25,3
≥ 23,05 - 25,80			38	25,3
≥ 25,80			37	24,7
Total			150	100

La gráfica siguiente muestra el histograma de frecuencias de presentación del IMC.



A continuación se muestra la distribución de madres según su IMC cuando se toma como referencia los rangos de IMC adoptados por la OMS, observándose que un 63,8% de las madres de nuestro estudio se engloban en los rangos correspondientes a peso normal. Por otro lado existe un 22,8% de madres que presentan sobrepeso, y un 7,4% obesidad.

IMC según la OMS (kg/m²)	n	%
Bajo peso ($\leq 18,5$)	9	6,0
Normal (19 – 24,99)	95	63,3
Sobrepeso (25 – 29,99)	35	23,3
Obesidad, Clase I (30 – 34,99)	7	4,7
Obesidad, Clase II (35 – 39,99)	4	2,7
Total	150	100

4.2.1.2. Características sociodemográficas

Se presentan a continuación algunas de las características sociales, educativas y laborales de la población de estudio.

Estado civil: Las mujeres casadas representan la mayoría de la población de estudio (90,1%), de modo que existe una distribución no normal.

Estado civil	n	%
Casada	137	90,1
Conviviendo con su pareja	14	9,2
Soltera	1	0,7
Total	152	100

Lugar de residencia: esta variable se categorizó considerando ambiente rural a aquellas poblaciones con un número de habitantes menor o igual a 10000 y ambiente urbano a aquellas poblaciones con más de 10000 habitantes. De esta manera la distribución fue casi paritaria.

Lugar de residencia	n	%
Rural	82	53,9
Urbana	70	46,1
Total	152	100

Nivel de escolaridad: Las madres reclutadas en este estudio tienen en su mayoría estudios primarios, solamente el 9,2% admiten no tener estudios de ningún tipo y un porcentaje similar declara tener estudios universitarios (10,5%). En el análisis bivariante la variable nivel de escolaridad se recodificó en 3 categorías (Sin estudios-primarios/ Medios-FP/ Diplomatura-Superiores).

Nivel de escolaridad	n	%
Sin estudios	14	9,2
Primarios	74	48,7
Medios	22	14,5
Formación profesional	15	9,9
Diplomatura	11	7,2
Licenciatura	16	10,5
Total	152	100

Actividad laboral actual: la mayoría de las madres reclutadas se dedican a tareas del hogar (25,0%) o de tipo administrativo (25,0%).

Actividad laboral actual	n	%
Administración	38	25,0
Agricultura	20	13,2
Autónoma	10	6,6
Hogar	38	25,0
Hostelería	11	7,2
Limpieza	10	6,6
Peluquería	7	4,6
Sanitaria	5	3,2
Profesional liberal*	13	8,6
Total	152	100

* En la categoría de profesional liberal se han incluido las siguientes profesiones declaradas: traductora, profesora, abogada, guía, música, economista.

Debido a que muchos estudios epidemiológicos han relacionado la ocupación de los padres, específicamente en actividades agrícolas, con malformaciones congénitas, esta variable se ha recalculado en tres categorías (hogar, agricultura y otras), destacando que solamente el 13,2% de las madres incluidas en el estudio participan en las actividades del campo.

Actividad laboral actual	n	%
Hogar	38	25,0
Agricultura	20	13,2
Otras	94	61,8
Total	152	100

Por último, se ha recategorizado la actividad laboral teniendo en cuenta para cada profesión el nivel de exposición a sustancias potencialmente tóxicas, observando que la mayoría de ellas presentan una exposición media a contaminantes (51,32%), según se muestra en la siguiente tabla.

	n	%
Ocupación de baja exposición a contaminantes*	36	23,7
Ocupación de exposición media a contaminantes**	78	51,3
Ocupación de alta exposición a contaminantes***	38	25,0
Total	152	100

*Hogar, administración, profesión liberal; ** Hostelería, autónoma; *** Limpiadora, campo, peluquería, sanitaria.

Percepción de la exposición a productos químicos: esta variable recoge la percepción que las madres incluidas en este estudio tienen de haber estado expuestas a compuestos químicos como pesticidas, desinfectantes, productos de limpieza, productos fitosanitarios, etc. En su mayoría (90,8%) las madres no tienen percepción de haber estado expuestas a ningún tipo de compuesto químico, como se muestra en la siguiente tabla.

Percepción de la exposición a productos químicos	n	%
Si	14	9,2
No	138	90,8
Total	152	100

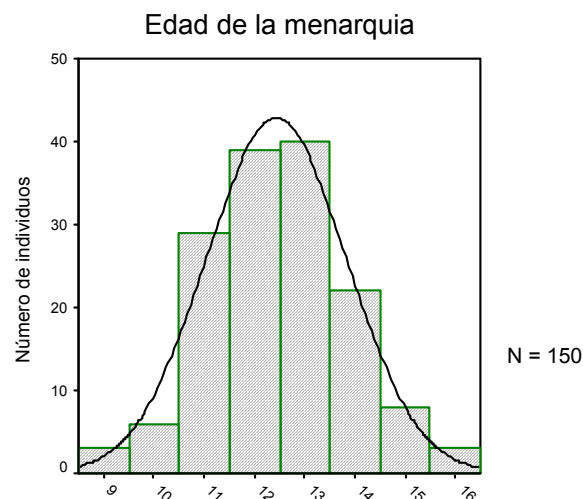
4.2.1.3. Características reproductivas de la madre

Se recogen a continuación las variables obstétricas de las 162 mujeres incluidas en el estudio, referentes al periodo previo al embarazo.

Edad de la menarquia: La media de edad obtenida ha sido 12 años y 5 meses ($DE \pm 1,39$), con un mínimo y máximo de 9 y 16 años. El 25,3% de madres presentaron su primera menstruación antes de los 11 años. Tal y como se observa en la tabla el valor de n disminuye a 150 debido a que dos de las mujeres encuestadas no recuerdan a que edad tuvieron su primera menstruación.

Edad de la menarquia	Media \pm DE	Mediana	n	%
	12,4 \pm 1,4	12,0		
≤ 11			38	25,3
12 –13 años			79	52,7
≥ 14 años			33	22,0
Total			150	100

La figura siguiente muestra el histograma de distribución de las madres en función de la edad de la menarquia. La distribución de valores para esta variable es normal.



Abortos previos: el 93,4% de las madres de nuestro estudio no ha tenido ningún aborto previo en el momento del reclutamiento, presentando este antecedente tan solo diez de las mujeres participantes.

Abortos previos	n	%
Si	10	6,6
No	141	93,4
Total	151	100

Paridad: esta variable clasifica a las mujeres según el número de niños nacidos vivos y/o de niños nacidos muertos (aborto) previos al reclutamiento. Si el niño reclutado es el primer niño nacido vivo, sin antecedentes previos de otros embarazos la madre se clasifica como primípara, en todos los demás casos la madre se clasifica como múltipara. Cerca de tres de cada cinco mujeres reclutadas son primíparas (59,9%).

Paridad	n	%
Primipara	91	59,9
Múltipara	61	40,1
Total	152	100

Métodos anticonceptivos: Dentro de esta variable se incluye la utilización de algún método anticonceptivo, entre los que se incluyen: dispositivo intrauterino (DIU), anticonceptivos orales (ACO), diafragma, gel, cremas, espumas, y/o método de la temperatura basal, en algún momento de la vida reproductiva de la mujer. En nuestra población de estudio, la mitad de las madres declararon haber usado alguno de estos métodos, como se muestra en la siguiente tabla. Además se detalla el tiempo que duró el tratamiento, así como, el tiempo que transcurrió desde la suspensión del mismo hasta el embarazo.

Uso de anticonceptivos	n	%
Si	77	50,6
No	75	49,4
Total	152	100

De las 77 mujeres que declararon haber usado algún anticonceptivo, 7 de ellas utilizaron como método el DIU y 67 (87,0%) se decantaron por el uso de anticonceptivos orales (ACO). La tabla siguiente muestra la duración del tratamiento anticonceptivo para las madres que usaron ACO, observando que en la mayoría la duración media es de 1 a 5 años.

Anticonceptivos orales	n	%
Si han usado ACO	67	87,0
Menos de 1 año	17	22,0
1-5 años	39	50,6
6-15 años	11	14,4

La tabla siguiente recoge el tiempo transcurrido desde que dejó los anticonceptivos hasta que se quedó embarazada.

	n	%
<i>Tiempo tras suspensión</i>		
Menos de 2 meses	20	25,9
2-4 meses	16	20,8
5 -12 meses	17	22,1
Más de 1 año	24	31,2
Total	77	100

Según se observa en la tabla anterior, un 46,7% de las madres que afirmaron haber usado algún tipo de anticonceptivo, quedó embarazada en un periodo inferior a cuatro meses, y una de cada tres declaró haber tardado más de 1 año en quedarse embarazada.

Tratamiento de infertilidad: tan solo una de cada veinte mujeres reclutadas en este estudio ha declarado haberse sometido a tratamiento para la infertilidad.

Tratamiento de infertilidad	n	%
Si	9	5,9
No	143	94,1
Total	152	100

4.2.1.4. Antecedentes clínicos y de exposición durante el embarazo

Se muestra a continuación las variables recogidas que hacen referencia a los hábitos de las madres reclutadas, los problemas que han tenido durante el embarazo, así como los posibles tratamientos médicos y la exposición ambiental ocurrida.

Problemas durante el embarazo: el 55,9% de las madres tuvieron algún problema durante el embarazo. En la tabla siguiente se observa que las náuseas (53,3%) y vómitos (42,1%) fueron las incidencias más frecuentes en la mayoría de los casos, y tan solo un 4,9% de ellas tuvieron pérdida de líquido amniótico.

Problemas durante el embarazo	n	%
Si	85	55,9
No	67	44,1
Total	152	100

La tabla siguiente recoge el tipo de problema detectado durante el embarazo para aquellas 85 mujeres que declararon haberlo tenido.

Tipo de problema	n	%
Pérdida de líquido amniótico	8	9,4
Náuseas	81	95,3
Vómitos	64	75,3
Hemorragia vaginal	21	24,7

Consumo de fármacos durante el embarazo: la mitad de las mujeres ha declarado haber tomado alguna medicación durante la gestación. Los fármacos mayoritarios consumidos por las madres de nuestro estudio fueron los antieméticos.

Fármacos durante el embarazo	n	%
Si	77	50,7
No	75	49,3
Total	152	100

La tabla siguiente recoge el tipo de medicación tomada por aquellas madres que declararon haber tomado algún tipo de tratamiento.

Tipo de fármacos	n	%
Antianémicos	10	14,1
Antibióticos	15	21,1
Relajantes uterinos	10	14,1
Antieméticos	27	38,0
Analgésicos	9	12,7
Total	71	100

Otra de las preguntas que se incluyeron en la encuesta epidemiológica hacía referencia al uso de suplementos dietéticos. Así, se preguntó si las madres habían tomado ácido fólico, hierro, calcio u otro tipo de preparado vitamínico durante el embarazo. De los resultados obtenidos cabe destacar que ninguna mujer afirmó haber tomado algún tipo de complejo vitamínico y la distribución del resto se recoge a continuación.

Suplementos dietéticos	n	%
Si	130	85,5
No	22	14,5
Total	152	100

La mayor parte de las embarazadas tomaron suplementos (85,5%) siendo el ácido fólico el más común. Esta tabla se ha calculado sobre las 130 mujeres que habían declarado consumir algún tipo de suplementos dietéticos durante el embarazo.

Tipo de suplemento	n	%
Ácido fólico	79	51,9
Hierro	52	34,2
Calcio	22	14,6

Consumo de alcohol durante el embarazo: ninguna de las madres refirió haber consumido alcohol durante el embarazo; posiblemente esta pregunta no fue bien entendida por las mujeres puesto que en una pregunta posterior (sección 2.1.5) hay madres que declaran ser consumidoras no habituales de alguna bebida alcohólica.

Consumo de drogas durante el embarazo: solamente 2 mujeres confirmaron haber consumido algún tipo de droga durante el embarazo.

Consumo de tabaco durante el embarazo: esta información se refiere solamente al hábito tabáquico durante el embarazo. Cerca de un tercio de las madres de nuestro estudio declaran ser fumadoras (30,3%), de ellas solamente 6 (13,0%) afirman haber dejado de fumar durante el embarazo.

Consumo de tabaco	n	%
No fumador	100	65,8
Exfumadora*	6	3,9
Fumador	46	30,3
Total	152	100

*Mujeres que dejaron de fumar durante el embarazo

Por otra parte, se preguntó a las madres, si habían estado expuestas al humo del tabaco de forma pasiva durante el embarazo. La mayoría de las madres de nuestro estudio afirman haber estado expuestas (61,2%), con un tiempo de exposición aproximado de más de 2 horas al día, como se muestra en las tablas que se presentan a continuación.

Percepción de la exposición al tabaco	n	%
Si	93	61,2
No	59	38,8
Total	152	100

La tabla siguiente recoge el tiempo estimado de exposición pasiva al humo del tabaco. Esta tabla se ha calculado sobre las 93 mujeres que habían declarado estar expuestas al humo del tabaco durante el embarazo.

Tiempo de exposición al tabaco	n	%
Menos 30 min/día	30	32,2
30min-2 horas/día	14	15,1
Más 2 horas/día	49	52,7
Total	93	100

Dentro de nuestro interés por conocer las vías de exposición durante el embarazo a diferentes compuestos químicos, se incluyó en la encuesta epidemiológica una serie de preguntas con el objeto de investigar la exposición a compuestos químicos vehiculizados a través de los cosméticos. La primera tabla de esta serie recoge el porcentaje de respuestas afirmativas y negativas para el uso de cosméticos.

Uso de cosméticos durante el embarazo	n	%
Si	131	86,2
No	21	13,8
Total	152	100

La tabla siguiente recoge el tipo de cosmético empleado. Esta tabla se ha calculado sobre las 131 mujeres que habían declarado usar cosméticos durante el embarazo.

Tipo de cosmético	n	%
Crema	69	52,7
Loción	3	2,3
Aceite	11	8,4
Varios	48	36,6
Total	131	100

La tabla siguiente recoge la parte del cuerpo sobre el que el cosmético fue aplicado. Esta tabla se ha calculado sobre las 131 mujeres que habían declarado usar cosméticos durante el embarazo.

Parte del cuerpo en la que usó los cosméticos	n	%
Todo el cuerpo	85	64,9
Parte superior	8	6,1
Parte inferior	3	2,3
Brazos y piernas	3	2,3
Solo barriga	14	10,7
Varias	18	13,7
Total	131	100

El análisis de las respuestas correspondientes a este grupo de preguntas muestra que en su mayoría las madres han usado algún cosmético durante el embarazo (86,2%), siendo la crema hidratante el producto más utilizado (52,7%) que principalmente se aplicó en todo el cuerpo (64,9%).

En este bloque de información también se recoge la aplicación de algún tipo de tratamiento para el pelo durante el embarazo (mechas, tintes, permanente, champú colorante). La mayoría de las madres contestaron afirmativamente (65,1%), siendo el tinte el tratamiento más usado (47,3%). Cuando se preguntó acerca del momento del embarazo en el que se lo aplico, en la mayoría de los casos fue a partir del segundo trimestre o bien durante todo el embarazo (93,9%).

Tratamiento del pelo durante el embarazo	n	%
Si	99	65,1
No	53	34,9
Total	152	100

La tabla siguiente recoge las respuestas sobre el tipo de tratamiento del pelo. Esta tabla se ha calculado sobre las 99 mujeres que habían declarado recibir algún tipo de tratamiento del pelo durante el embarazo.

Tipo de tratamiento del pelo	n	%
Mechas	33	21,7
Tinte/Champú colorante	71	46,7
Permanente	8	5,3

También se pudo conocer en que periodo de gestación se realizaron los tratamientos del pelo.

Periodo de gestación en el que se trató el pelo	n	%
1º trimestre	6	6,1
2º trimestre	20	20,2
3º trimestre	25	25,2
Todo el periodo	48	48,5
Total	99	100

*Esta tabla se ha calculado sobre las 99 mujeres que habían declarado recibir algún tipo de tratamiento del pelo durante el embarazo.

4.2.1.5. Hábitos alimentarios durante el embarazo

En los apartados siguientes se recogen las tablas con datos referentes al tipo de dieta que ha consumido la madre durante todo el embarazo. Las variables se agruparon en las cinco siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces a la semana/ 4-6 veces a la semana/ todos los días.

De forma sucesiva se presentan los resultados correspondientes a productos lácteos, vegetales, proteínas, carnes, pescado, conservas y diferentes bebidas, incluida el agua.

Productos lácteos	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Yogurt	8	5,3	16	10,5	17	11,2	17	11,2	94	61,8
Queso fresco	45	29,6	21	13,8	34	22,4	17	11,2	35	23,0
Queso añejo	48	31,6	25	16,4	40	26,3	17	11,2	22	14,5

Vegetales	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Legumbres	2	1,3	5	3,3	79	52,0	47	29,0	19	11,7
Ensalada	5	3,3	1	0,7	18	11,8	20	13,2	108	71,1
Vegetales verdes frescos	22	14,5	12	7,9	41	27,0	42	27,6	35	23,0
Vegetales frescos	20	13,2	13	8,6	40	26,3	42	27,6	37	24,3
Vegetales congelados	45	29,6	45	29,6	49	32,2	11	7,2	2	1,3
Vegetales en conserva	77	50,7	36	23,7	29	19,7	9	5,9	1	0,7

Frutas	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Frutas	2	1,3	10	6,6	11	7,2	18	11,8	111	73,0
Zumo de fruta fresco	39	25,7	24	15,8	23	15,1	16	10,5	50	32,9
Zumo de fruta envasado	49	32,2	14	9,2	41	27,0	19	12,5	29	19,1
Frutos secos	61	40,1	39	25,7	31	20,4	9	5,9	12	7,9

Alimentos proteicos	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Huevos	4	2,6	10	6,6	123	80,9	13	8,6	2	1,3

Carnes	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Aves	3	2,0	6	3,9	121	79,6	16	10,5	6	3,9
Carne (cerdo, ternera)	13	8,6	16	10,5	110	72,4	10	6,6	3	2,0
Hígado	81	53,3	26	17,1	37	24,3	5	3,3	3	2,0

Pescados	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Pescado blanco	7	4,6	23	15,1	103	67,8	16	10,5	3	2,0
Pescado azul	7	4,6	30	19,7	91	65,1	12	7,9	4	2,6
Marisco	40	26,3	72	47,4	36	23,7	4	2,6	-	-

Conservas	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Pescado	49	32,2	43	28,3	53	34,9	6	3,9	1	0,7
Carne	144	94,7	6	3,9	2	1,3	-	-	-	-
Judías guisadas	87	57,6	22	14,6	37	24,5	5	3,3	-	-
Alubias	131	86,2	12	7,9	8	5,3	1	0,7	-	-

Otros alimentos	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Productos ecológicos*	72	47,7	18	11,8	28	18,4	15	9,9	19	12,5
Chocolate	44	28,9	36	23,7	37	24,3	15	9,9	20	13,2

*El término productos ecológicos se refiere a productos en los que no se ha utilizado ningún pesticida.

Otra de las preguntas realizadas en la encuesta epidemiológica fue referente al número de vasos de agua consumidos diariamente durante el embarazo. De las 152 madres encuestadas solamente 2 de ellas declararon no beber expresamente diariamente agua.

Consumo de agua en el embarazo (vasos/día)	n	%
Ninguno	2	1,3
1- 3	28	18,4
Más de 3 vasos	122	80,3
Total	152	100

Se considera el consumo de agua fuera de las comidas.

La tabla siguiente recoge los datos numéricos de consumo diario o semanal de infusiones y bebidas.

Bebidas e infusiones	Cantidad	n	%
Café	1 taza /día	34	22,4
	2 tazas /día	14	9,2
Té	1 taza /día	13	8,6
	≥ 2 tazas /día	2	1,4
Cacao	1 taza /día	60	39,5
	≥ 2 tazas /día	21	13,8
Cola	1 litro /semana	39	26,7
	≥ 2 litros /semana	23	14,3
Cerveza	*1 botella /semana	4	2,8
	≥ 2 botellas /semana	2	1,4

* Corresponde a una botella con un volumen de 1/3 litros.

A la vista de los resultados obtenidos en el cuestionario de la frecuencia de consumo de alimentos se puede deducir que los hábitos nutricionales de la población del estudio siguen las pautas de la dieta habitual de la región y se pueden considerar próximas a las recomendaciones de la dieta mediterránea, así si la frecuencia de lácteos debe ser de 2 a 3 raciones día encontramos que el 62% de las mujeres incluidas en el estudio consumen a diario yogurt y solamente un 10% lo hacen de forma esporádica (1-3 mes). El consumo de vegetales adecuado sería de 2-3 raciones semana y un 52% de las madres de nuestro estudio afirman tomar legumbres de 1-3 semana; por otro lado, el 71% consume ensaladas y vegetales frescos a diario.

Según las recomendaciones de la dieta mediterráneo, las frutas que deberían de consumirse a diario, lo que coincide con los datos obtenidos en nuestro estudio ya que un 73% sigue esta pauta. En cuanto a los alimentos proteicos encontramos que un 81% consumen de 1-3 veces a la semana esto es relativamente próximo a la recomendación de 3 raciones a la semana. Las vísceras se recomienda que no se consuman más de 2 veces al mes, el 52% de las mujeres de nuestro estudio afirman no consumirlas nunca, mientras que solo un 24% de ellas las consume entre una y tres veces a la semana. En cuanto al consumo de aves y carnes (cerdo, ternera) 79% y el 72% de la población encuestada afirma consumirlas.

Las mujeres de nuestro estudio afirman haber consumido de 1-3 veces por semana pescado indistintamente blanco y azul (65-68%).

Otros productos mencionados en la encuesta como productos ecológicos o conservas no son consumidos de forma frecuente por este grupo de estudio, de otra parte alimentos frutivos tales como dulces, chocolate, cacao son consumidos de forma muy desigual por la población en estudio.

Las bebidas (infusiones, refrescos y cerveza) no han supuesto una preferencia en las madres del nuestro estudio solamente cabe destacar que el 39% de las mujeres tomaron una taza al día de cacao.

Las bebidas más consumidas durante el embarazo por las madres de nuestro estudio han sido café y/o cacao al menos 1 taza al día. Seis mujeres han declarado haber consumido cerveza durante el embarazo.

4.2.1.6. Características del parto

Se presentan a continuación algunas variables relativas a las características clínicas del parto.

Terminación del parto: el parto fue espontáneo en el 66,4% de la madres para las que se pudo recoger esta variable (n=128), necesitando asistencia instrumental tan solo 16 de ellas. El porcentaje de cesáreas recogidos en nuestro estudio, está dentro de los valores para esta cirugía practicados en España: entre el 20 y 22 por ciento de los nacimientos. Como en la mayoría de los países desarrollados, se superó el límite del 15 por ciento de cesáreas aconsejado por la Organización Mundial de la Salud.

Terminación del parto	n	%
Espontáneo	85	66,4
Cesárea	27	21,1
Instrumental	16	12,5
Total	128	100

En los partos en los que la terminación fue instrumental (12,5%) el vacuo fue el tipo de instrumentación más frecuentemente utilizada, como se muestra en la tabla siguiente.

Esta tabla se ha calculado sobre las 16 mujeres que habían tenido una terminación del parto de tipo instrumental.

Tipo de instrumentación	n	%
Fórceps	5	3,9
Vacuo	8	6,2
Espátulas	1	0,8
Desconocida	2	1,6
Total	16	12,5

La tabla siguiente muestra la distribución de la forma de presentación fetal en el alumbramiento. En el 92% de los casos recogidos la presentación fetal fue cefálica.

Presentación fetal	n	%
Cefálica	115	92,0
Nalgas	2	1,6
Transversa	8	6,4
Total	125	100

4.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL PADRE

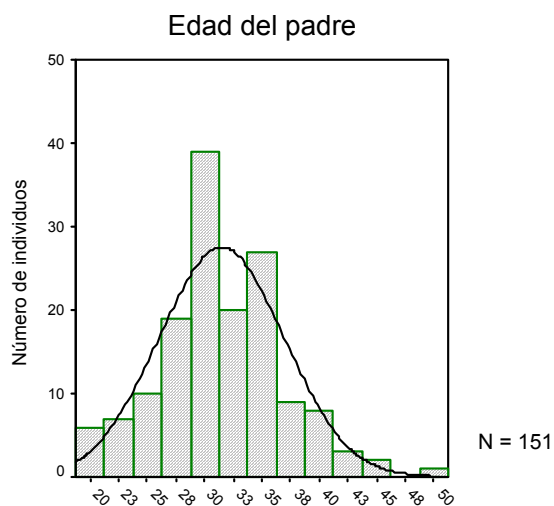
Se presentan a continuación algunas de las características de interés para este estudio obtenidas en la información de los cuestionarios referente a los padres.

Edad: La edad media de los padres incluidos en el estudio fue de 31 años ($DE \pm 5,5$), con un mínimo y un máximo de 19 y 50 años respectivamente. La media de edad de la madre y del padre coincide tanto en su valor medio como en el rango de edades. El valor de la media fue el punto de corte seleccionado para el análisis bivalente. La tabla que se muestra a continuación, así como la figura correspondiente recoge estos extremos de forma detallada.

Edad (años):

Media	$\pm DE$	Mediana	Mínimo	Máximo
31,5	5,5	31,0	19	50

La gráfica siguiente muestra el histograma de frecuencias de presentación por edades.



Problemas en las gónadas: tan solo 2 padres tenían antecedentes de alguna malformación del tracto genito-urinario, concretamente presentaron criptorquidia en un caso y en el otro hipospadias.

Nivel de escolaridad del padre: Al igual que ocurría con las madres, el nivel de estudios que predomina es la educación primaria (49,4%), con un 15% de individuos sin estudios y un 18,6% de padres con estudios superiores, como se observa en la siguiente tabla. El valor de n a disminuido a 150, debido a que no se recogió el nivel de escolaridad de uno de los padres y en el otro caso se trataba de una madre soltera. En el análisis bivariante la variable nivel de escolaridad se recodificó en 3 categorías (Sin estudios-primarios/ Medios-FP/ Diplomatura-Superiores).

Nivel de escolaridad del padre	n	%
Sin estudios	15	10,0
Primarios	74	49,4
Medios	11	7,3
Formación profesional	22	14,7
Diplomatura	11	7,3
Licenciatura	17	11,3
Total	150	100

Actividad laboral del padre: dentro de la ocupación recogida en el momento de la entrevista, las más frecuentemente referida son el trabajo de tipo administrativo, agricultura y la construcción en un porcentaje de 19,6, 13,5 y 18,9% respectivamente, como se muestra en la tabla siguiente.

Actividad laboral actual	n	%
Administración	29	19,6
Agricultura	20	13,5
Autónomo	5	3,4
Construcción	28	18,9
Hostelería	11	7,4
Limpieza	3	2,0
Mecánico, conductor	13	8,8
Peluquería	2	1,4
Pintor	4	2,7
Sanitario	6	4,1
Profesional liberal*	16	10,7
Otros	11	7,5
Total	148	100

* En la categoría de profesional liberal se han incluido las siguientes profesiones declaradas: traductor, profesor, abogado, guía, músico, economista.

Debido a que muchos estudios epidemiológicos han relacionado la ocupación de los padres, específicamente en actividades agrícolas, con malformaciones congénitas, esta variable se ha recalculado en dos categorías (agricultura y otras), la mayoría de los padres de nuestro estudio (86,5%) tienen una actividad laboral diferente a la agricultura, al igual que ocurría con las madres.

Actividad laboral actual	n	%
Agricultura	20	13,5
Otros	128	86,5
Total	148	100

La variable trabajo se ha recategorizado teniendo en cuenta para cada profesión el nivel de exposición a contaminantes siguiendo los criterios comentados previamente, observándose entonces que la mayor parte de los padres presentan una exposición media/alta a contaminantes (77,0%), según se muestra en la siguiente tabla.

	n	%
Ocupación de baja exposición a contaminantes*	34	23,0
Ocupación de exposición media a contaminantes**	59	39,8
Ocupación de alta exposición a contaminantes***	55	37,2
Total	148	100

*Administración, profesión liberal; **Hostelería, autónomo, mecánico, conductor; ***construcción, limpieza, agricultura, sanitaria, pintura.

Percepción de la exposición a productos químicos: Por último, esta variable refleja la percepción de las madres de nuestro estudio sobre el que sus maridos estén o no expuestos a compuestos químicos como pesticidas, desinfectantes, productos de limpieza, productos fitosanitarios, entre otros, ya que, como se recordará el cuestionario se pasó a la madre durante la hospitalización por parto y el padre puede que no esté presente cuando se le hizo la entrevista. En la mayor parte de los casos (80,8%) no se tiene esta percepción de exposición laboral. El valor que falta es debido a que una de las mujeres es madre soltera.

Percepción de la exposición a productos químicos	n	%
Si	29	19,2
No	122	80,8
Total	151	100

4.2.3. CARACTERÍSTICAS DEL NIÑO

Se presentan a continuación las variables de interés para este estudio recogidas en el momento de inclusión de los recién nacidos en el grupo objeto de estudio.

Edad gestacional: la mayoría de los niños (80%) presentaron una edad gestacional por encima de 38 semanas (272,4 días), con un rango comprendido entre 32 (224 días) y 42 (294 días) semanas de gestación. Para el análisis descriptivo, esta variable se codificó en tres categorías, observándose que solamente un 19,1% de los niños reclutados tuvieron una edad gestacional inferior a 37 semanas. Para el análisis bivariante y multivariante esta variable se recodificó en dos categorías, por encima y por debajo de 37 semanas, criterio establecido para considerar un recién nacido prematuro.

Edad gestacional	Media	± DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Semanas	38,9	1,85	39,0	32	42
Días	272,4	13,0	273	224	294

La distribución de las pacientes en función de la edad gestacional se recoge en la tabla siguiente.

Edad gestacional	n	%
32-37 semanas	31	19,1
37-39 semanas	62	38,3
Más de 39 semanas	69	42,6
Total	162	100

Estación del año: en relación con la estación del año en que nacieron los niños se observa que hay una proporción de nacimientos discretamente superior en primavera, en detrimento del verano.

Estación del año	n	%
Primavera	52	32,1
Verano	27	16,7
Otoño	41	25,3
Invierno	42	25,9
Total	162	100

A continuación se recogen una serie de variables en las que se incluyen tanto el peso al nacimiento como los resultados de la exploración genitourinaria del niño, prestando especial atención a la posición testicular y al desarrollo peneano, de especial interés para este estudio.

Peso al nacer: el peso medio de los recién nacidos se situó en torno a los 3247 g. A su vez esta variable se categorizó en bajo peso (peso inferior a 2500g) y peso normal (≥ 2500 g). Tan solo 10 niños mostraron bajo peso al nacer.

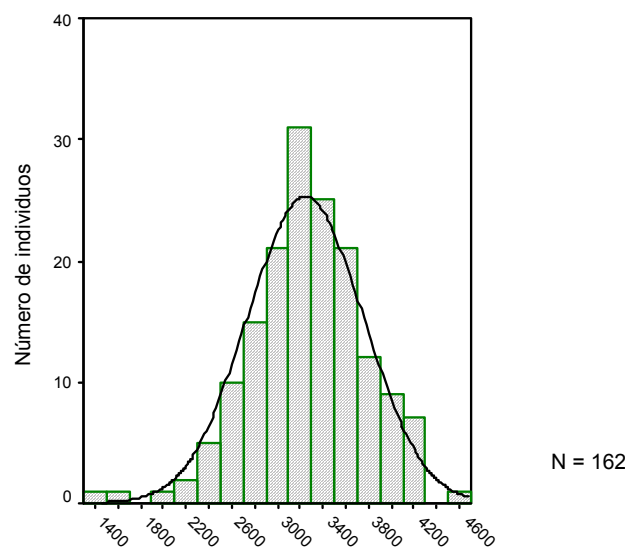
Peso al nacer (gramos):

Media	\pm DE	Mediana	Mínimo	Máximo
3246,9	509,6	3235,0	1450	4590

La distribución de los niños según el peso al nacer se recoge en la tabla siguiente.

Peso al nacer	n	%
< 2500g	10	6,2
≥ 2500 g	152	93,8
Total	162	100

En el histograma siguiente muestra como la distribución de valores para la variable peso al nacer es normal.



En la tabla siguiente se muestran los valores medios para la talla de los niños y el perímetro cefálico, así como el rango de ambas medidas antropométricas. El valor de la media de longitud y perímetro cefálico será el punto de corte para el análisis bivariante.

	Media	± DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Longitud (cm)	50,9	4,1	50,5	45	58
Perímetro cefálico (cm)	34,6	1,5	34,5	30,5	39,5

De especial interés para este estudio es la distribución de la población según los resultados de la exploración clínica del tracto genitourinario. En la tabla siguiente se presentan los resultados de frecuencias y porcentajes de criptorquidia y/o hipospadias.

Presencia de criptorquidia y/o hipospadias	n	%
Si	48	29,6
No	114	70,4
Total	162	100

Del total de las malformaciones recogidas (criptorquidia e hipospadias), en el 96% de los casos se trató de una u otra patología y en tan solo 2 de ellos (4,2%) ambas alteraciones estuvieron presentes en el mismo individuo. El tipo de criptorquidia más frecuente fue la unilateral derecha (48,3%) seguido de la bilateral. Además, como puede observarse la severidad en criptorquidia predomina sobre la patología leve.

	n	%
Tipo de malformación		
Criptorquidia	27	56,2
Hipospadias	19	39,6
Criptorquidia e hipospadias	2	4,2
Total	48	100
Tipo de Criptorquidia		
Unilateral izquierda	5	17,2
Unilateral derecha	14	48,3
Bilateral	10	34,5
Total	29	100
Severidad de la criptorquidia		
Severa (escrotal, inguinal y no palpable)	17	58,6
Leve (escrotal alto)	12	41,4
Total	29	100

También se pudo recoger otras incidencias del tracto genitourinario, destacando entre las patologías relacionadas con criptorquidia e hipospadias, por afectar al tracto genitourinario, la fimosis como variable más frecuente (52,4%), seguida de la combinación hidrocele más fimosis en un 36,5%. Esta variable se recodificó para el análisis bivalente en dos categorías (Ninguna incidencia/ alguna incidencia).

Otras Incidencias del tracto genitourinario	n	%
Hidrocele	7	6,6
Micropene	1	0,9
Epispadia	1	0,9
Fimosis	56	52,4
Hidrocele y fimosis	39	36,5
Hidrocele, micropene y fimosis	1	0,9
Malformación del prepucio	1	0,9
Malformación del prepucio y fimosis	1	0,9
Total	107	100

4.3. EXPOSICIÓN A PESTICIDAS ORGANOCLORADOS: XENOESTRÓGENOS

La exposición química del embrión y el feto durante la gestación puede ser estimada mediante la información recogida en el cuestionario realizado a las madres reclutadas en el estudio y de forma más directa a través de la identificación y cuantificación del residuo químico en muestras biológicas de las madres y los niños recién nacidos. Se ha entendido que la identificación, cuantificación y determinación de un grupo seleccionado de compuestos químicos en el tejido placentario obtenido en el momento del alumbramiento es una forma apropiada de medir exposición intrauterina y que la medida del efecto combinado del extracto placentario en el bioensayo E-screen es un buen indicador de exposición estrogénica.

4.3.1. Determinación de residuo químico en tejido placentario

Todos los plaguicidas analizados fueron detectados en las muestras de tejido placentario, siendo los menos frecuentes dieldrin (20,7%) y mirex (21,4%) y los más frecuentes p,p'-DDE (84,8%) y lindano (61,4%). La frecuencia de presentación con valores cuantificables situados por encima del límite de detección, de todos los compuestos analizados, se presenta en la siguiente tabla.

Pesticida	n	%
Grupo DDT		
o,p'DDD		
Si	63	43,4
No	82	56,6
p,p'-DDE		
Si	123	84,8
No	22	15,2
o,p'- DDT		
Si	71	49,0
No	74	51,0
p,p'-DDT		
Si	48	33,1
No	97	66,9

Pesticida	n	%
Grupo Endosulfan		
Endosulfan eter		
Si	77	53,1
No	68	46,9
Endosulfan lactona		
Si	48	33,0
No	97	67,0
Endosulfandiol		
Si	71	49,0
No	74	51,0
Endosulfan I		
Si	76	52,4
No	69	47,6
Endosulfan II		
Si	71	49,0
No	74	51,0
Endosulfan sulfato		
Si	39	26,9
No	106	73,1
Grupo aldrin/dieldrin/endrin		
Aldrin		
Si	57	39,3
No	88	60,7
Dieldrin		
Si	30	20,7
No	115	79,3
Endrin		
Si	70	48,3
No	75	51,7
Otros pesticidas		
Lindano		
Si	89	61,4
No	56	38,6
Metoxicloro		
Si	58	40,0
No	87	60,0
Mirex		
Si	31	21,4
No	114	78,6
Hexaclorobenceno		
Si	77	53,5
No	67	46,5

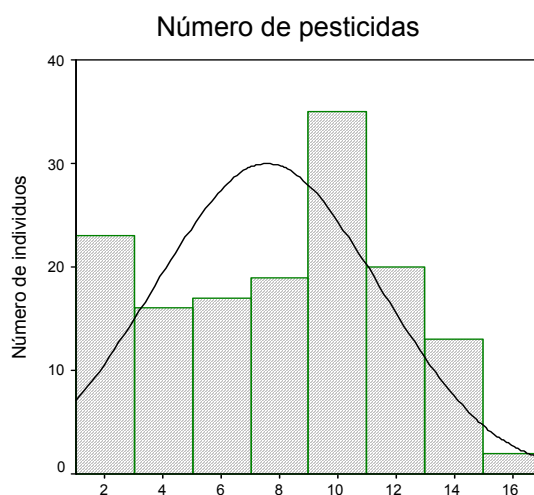
Se ha determinado el número de pesticidas detectados en cada una de las muestras de tejido placentario. Todas las placentas presentaron concentraciones cuantificables de al menos uno de los residuos analizados, con una media de 7,6 residuos por placenta, como se observa en la tabla siguiente.

	Media \pm DE	Mediana
Nº de pesticidas por muestra analizada	7,6 \pm 3,8	8,00

La tabla siguiente muestra el número residuos presentes en las muestras de placenta analizadas, y el porcentaje correspondiente.

Nº de pesticidas por muestra analizada	n	%
1	5	3,4
2	18	12,4
3	7	4,8
4	9	6,2
5	10	6,9
6	7	4,8
7	12	8,3
8	7	4,8
9	18	12,4
10	17	11,7
11	8	5,5
12	12	8,3
13	10	6,9
14	3	2,1
15	1	0,7
16	1	0,7

La gráfica siguiente muestra el histograma de frecuencias de presentación del número de pesticidas encontrados en las muestras de placentas.



En la tabla siguiente se muestran los valores de la media aritmética (ng/g de tejido placentario) y la desviación estándar así como la frecuencia de muestras con niveles detectables, valores mínimos y máximos, de los 17 residuos cuantificados en tejido placentario.

Pesticida	n (%)	Media*	± DE	Mínimo*	Máximo*
Grupo DDT					
o,p'DDD	63 (43,4)	16,94	44,12	0,09	280,98
p,p'-DDE	123 (84,8)	9,21	19,63	0,06	158,08
o,p'-DDT	71 (49,0)	5,08	9,96	0,34	40,50
p,p'-DDT	48 (33,1)	6,44	20,24	0,50	126,99
Σ DDT**	139 (97,2)	37,06	98,19	0,45	1025,07
Grupo Endosulfan					
Endosulfan eter	77 (53,1)	0,27	0,24	0,02	1,02
Endosulfan lactona	48 (33,1)	22,45	20,20	0,12	74,67
Endosulfan diol	71 (49,0)	7,44	8,90	0,28	45,16
Endosulfan I	76 (52,4)	4,40	6,42	0,20	28,27
Endosulfan II	71 (49,0)	2,99	6,16	0,54	46,20
Endosulfan sulfato	106 (73,1)	4,07	6,27	0,25	44,46
Σ Endosulfan**	139 (96,5)	20,00	28,45	0,14	189,45
Grupo aldrin/dieldrin/endrin					
Aldrin	57 (39,3)	1,49	5,91	0,38	45,18
Dieldrin	30 (20,7)	2,57	3,27	0,50	12,50
Endrin	70 (48,3)	6,64	10,23	0,64	67,01
Otros pesticidas					
Lindano	89 (61,4)	0,72	0,96	0,02	6,87
Metoxicloro	58 (40,0)	1,94	5,09	0,20	34,52
Mirex	31 (21,4)	2,74	3,10	0,50	15,12
HCB*	77 (53,5)	8,75	12,36	1,00	60,46

Los valores medios presentados en la tabla han sido estimados tan solo para aquellas muestras con valores superiores al límite de cuantificación. *(ng/g tejido placentario); **Σ DDT: esta variable se ha calculado sumando los valores de DDT y sus metabolitos. Σ Endosulfan: esta variable se ha calculado sumando los valores de todos los endosulfanes.

4.3.2. Correlación entre los niveles de pesticidas detectados en tejido placentario

En la tabla siguiente se exponen los resultados de la relación existente entre los diferentes residuos de pesticidas identificados en el tejido placentario.

El estudio de la correlación simple entre las variables de concentración de plaguicidas en tejido placentario se ha estudiado mediante la aplicación del test estadístico no paramétrico de correlación "Γ de Spearman". Cabe destacar la correlación significativa encontrada entre algunos de los pesticidas y sus metabolitos. De esta manera es posible observar como existe una correlación significativa entre DDD y o,p'-DDT, p,p'-DDT y metoxicloro ($p < 0,01$) y entre los dos isómeros del DDT ($p < 0,01$).

En lo que respecta a los isómeros α y β del endosulfán, identificados en esta memoria como endosulfán-I (E-I) y endosulfán-II (E-I, E-II), de nuevo la correlación es estadísticamente significativa ($p < 0,01$) de tal manera que las madres expuestas a uno de los compuestos lo están también al otro. Además es interesante considerar que los metabolitos endosulfán-diol, -eter y -lactona se asocian con los compuestos de uso comercial, endosulfan-I y II, mientras que el endosulfán-sulfato no tiene, en nuestro estudio, asociación con los compuestos parentales.

Por último, la asociación entre aldrín y sus compuestos de metabolización dieldrín y endrín ($p < 0,01$), de nuevo es significativa estadísticamente, lo que viene a reforzar la fuerte asociación entre los compuestos de uso comercial y su producto de transformación y/o degradación.

	p,p'DDE	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxic	E-eter	E-lactona	E-diol	E-I	E-II	E-sulfato	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Lindano	Mirex	HCB
DDD	0,028	0,472**	0,239**	0,310**	0,181*	0,170*	0,167*	0,463**	0,232**	0,323**	0,216**	- 0,031	0,119	0,194*	0,296**	0,379**
P=	0,736	0,000	0,004	0,000	0,029	0,041	0,045	0,000	0,005	0,000	0,009	0,714	0,154	0,019	0,000	0,000
DDE		- 0,067	- 0,017	- 0,287**	- 0,138	- 0,027	- 0,191*	- 0,025	- 0,009	0,131	- 0,205*	- 0,134	- 0,101	- 0,168*	0,053	- 0,190*
P=		0,422	0,841	0,000	0,098	0,743	0,021	0,769	0,911	0,116	0,014	0,107	0,226	0,043	0,524	0,023
o,p'-DDT			0,330**	0,167*	0,179*	0,172*	0,095	0,473**	0,299**	0,113	0,449**	0,193*	0,363**	0,345**	0,244**	0,329**
P=			0,000	0,045	0,031	0,038	0,257	0,000	0,000	0,175	0,000	0,020	0,000	0,000	0,003	0,000
p,p'-DDT				0,131	- 0,002	0,116	- 0,023	0,231**	0,372**	- 0,055	0,321**	0,180*	0,178*	0,378**	0,218**	0,101
P=				0,116	0,986	0,165	0,781	0,005	0,000	0,512	0,000	0,030	0,032	0,000	0,008	0,229
Metoxic				0,217**	0,107	0,217**	0,302**	0,277**	0,096	0,249**	0,142	0,229**	0,236**	0,152	0,219**	
P=				0,009	0,202	0,009	0,000	0,001	0,251	0,003	0,089	0,006	0,004	0,068	0,008	
E-eter					0,220**	0,306**	0,174*	0,174*	0,094	0,223**	0,014	0,239**	0,138	0,132	0,329**	
P=					0,008	0,000	0,036	0,036	0,262	0,007	0,869	0,004	0,097	0,113	0,000	
E-lacton						0,201*	0,237**	0,199*	0,048	0,228**	- 0,049	0,225**	0,141	0,304**	0,141	
P=						0,015	0,004	0,016	0,570	0,009	0,558	0,007	0,092	0,000	0,091	
E-diol							0,259**	0,152	0,085	0,169*	0,141	0,002	- 0,005	0,003	0,271**	
P=							0,002	0,067	0,308	0,042	0,090	0,979	0,956	0,969	0,001	
E-I								0,361**	0,355**	0,260**	0,220**	0,092	0,231**	0,297**	0,408**	
P=								0,000	0,000	0,002	0,008	0,269	0,005	0,001	0,000	
E-II									- 0,054	0,286**	0,258**	0,271**	0,335**	0,094	0,107	
P=									0,517	0,000	0,002	0,001	0,000	0,258	0,203	
E-sulfato										- 0,051	- 0,024	- 0,041	- 0,004	0,143	0,245**	
P=										0,539	0,772	0,622	0,965	0,087	0,003	
Aldrin											0,301**	0,254**	0,404**	0,179*	0,288**	
P=											0,000	0,002	0,000	0,032	0,000	
Dieldrin												0,208*	0,226**	- 0,020	0,206	
P=												0,012	0,001	0,812	0,013	
Endrin													0,229**	0,231**	0,124	
P=													0,006	0,005	0,137	
Lindano														0,089	0,201*	
P=														0,287	0,015	
Mirex																0,230**
P=																0,006

*p<0,05; **p<0,001

4.3.3. Correlación entre los niveles de pesticidas detectados en tejido placentario y las características de la población de estudio.

A continuación se presentan las tablas en las que se muestran los niveles medios de DDE, dieldrin, lindano y endosulfan sulfato en tejido placentario de acuerdo a las variables seleccionadas en las madres del estudio, atendiendo a la posible exposición crónica de la madre a estos compuestos, usando el análisis de la varianza (ANOVA).

Los niveles de DDE en tejido placentario son más elevados en las madres de menor edad (próxima a la significación estadística de acuerdo con el test de Anova, $p=0,06$). En el caso del DDE las madres que dieron a luz por primera vez tuvieron unos niveles de DDE ligeramente superiores, aunque tras la aplicación del test no ha resultado estadísticamente significativa ($p=0,708$). Por último, se han obtenido mayores niveles de DDE en aquellas muestras de placenta de madres que afirman vivir en un ambiente rural.

Variable	n	p,p'DDE(ng/g de placenta)		Valor de p (ANOVA)
		Media	IC 95%	
Edad				
≤26 años	32	14,51	3,36 – 25,65	0,06
26-30 años	46	4.06	2.84 – 5.28	
> 30 años	54	8.34	3.65 – 13.04	
IMC				
< 20.65	35	10.02	0.76 – 19.28	0.802
20.65 – 23.05	31	7.37	1.01 – 13.74	
23.05 – 25.80	32	10.58	3.20 – 17.96	
> 25.8	31	5.33	3.47 – 7.18	
Paridad				
Multipara	50	7.56	3.32 – 11.79	0.370
Primípara	81	8.86	4.09 – 13.63	
Gestación				
≥ 37 semanas	120	8.41	4.81 – 12.00	0.674
< 37 semanas	12	7.73	1.54 – 13.91	
Lugar de residencia				
Rural	66	10.94	4.59 – 17.28	0.106
Urbano	60	5.32	3.43 – 7.21	

La tabla nos muestra unos niveles de dieldrin más elevados en las madres de menor edad. Los niveles de dieldrin son más elevados para aquellas madres que viven en un ambiente rural, aunque tras la aplicación del test no ha resultado estadísticamente significativa ($p= 0,423$). Por otro lado no se han encontrado una asociación significativa para los niveles de dieldrin con la paridad, semana de gestación y el índice de masa corporal.

Variable	n	Dieldrin (ng/g de placenta)		Valor de p (ANOVA)
		Media	IC 95%	
Edad				
≤26 años	32	0,95	0,010 – 1,887	0,361
26-30 años	46	0,60	0,016 – 1,191	
> 30 años	54	0,35	0,035 – 0,662	
IMC				
< 20.65	35	0,41	0,149 – 0,975	0.882
20.65 – 23.05	31	0,57	0,187 – 1,334	
23.05 – 25.80	32	0,49	0,173 – 0,821	
> 25.8	31	0,77	0,163 – 1,717	
Paridad				
Multipara	50	0,25	0,615 – 0,444	0,148
Primípara	81	0,73	0,231 – 1,239	
Gestación				
≥ 37 semanas	120	0,62	0,270 – 0,979	0,423
< 37 semanas	12	0,16	0,114 – 0,447	
Lugar de residencia				
Rural	66	0,80	0,248 – 1,349	0,251
Urbano	60	0,40	0,020 – 0,788	

La tabla muestra unos niveles de lindano más elevados en las madres de menor edad (estadísticamente significativo $p= 0,038$). Los niveles de lindano son más elevados para los niños prematuros, así como para aquellas madres que viven en un ambiente rural, aunque no se alcanza la significación estadística ($p= 0,337$). Por otro lado no se han encontrado una asociación significativa para los niveles de lindano con la paridad y el índice de masa corporal.

Variable	n	Lindano (ng/g de placenta)		Valor de p (ANOVA)
		Media	IC 95%	
Edad				
≤26 años	32	0,81	0,28 – 1,33	0,038
26-30 años	46	0,37	0,24 – 0,51	
> 30 años	54	0,35	0,19 – 0,51	
IMC				
< 20.65	35	0,43	0,19 – 0,66	0,280
20.65 – 23.05	31	0,32	0,14 – 0,52	
23.05 – 25.80	32	0,72	0,25 – 1,19	
> 25.8	31	0,42	0,14 – 0,72	
Paridad				
Multipara	50	0,53	0,31 – 0,74	0,122
Primípara	81	0,44	0,23 – 0,64	
Gestación				
≥ 37 semanas	120	0,45	0,29 – 0,61	0,890
< 37 semanas	12	0,68	0,17 – 1,18	
Lugar de residencia				
Rural	66	0,54	0,28 – 0,80	0,670
Urbano	60	0,39	0,23 – 0,55	

Al igual que en los casos anteriores, los niveles de endosulfan sulfato en tejido placentario son más elevados en las madres de menor edad, aunque tras la aplicación del test no ha resultado estadísticamente significativa ($p= 0,118$). Se han obtenido unos niveles ligeramente superiores en aquellas muestras de placenta de madres que afirman vivir en un ambiente rural. Por último, no se ha encontrado una tendencia significativa para los niveles de endosulfan sulfato y la paridad, el índice de masa corporal y la gestación.

Variable	n	Endosulfan sulfato (ng/g de placenta)		Valor de p (ANOVA)
		Media	IC 95%	
Edad				
≤26 años	32	4,73	1,36 – 8,11	0,118
26-30 años	46	2,06	1,13 – 2,98	
> 30 años	54	2,61	1,34 – 3,87	
IMC				
< 20.65	35	2,52	1,09 – 3,96	0,410
20.65 – 23.05	31	2,26	0,73 – 3,79	
23.05 – 25.80	32	2,95	0,83 – 5,07	
> 25.8	31	2,29	1,28 – 3,30	
Paridad				
Multipara	50	3,77	1,62 – 5,93	0,128
Primípara	81	2,22	1,33 – 3,10	
Gestación				
≥ 37 semanas	120	2,98	1,89 – 4,07	0,740
< 37 semanas	12	2,44	0,54 – 4,34	
Lugar de residencia				
Rural	66	2,87	1,57 – 4,16	0,730
Urbano	60	2,43	1,43 – 3,42	

Para el resto de residuos de plaguicidas no mostrados rara vez se encontró correlación con las variables de interés epidemiológico de la madre seleccionadas (antropométricas y de historia reproductiva: IMC, paridad, etc). Tan solo se encontró asociación con la edad de la madre para el o,p'-DDT obteniéndose una Γ de Spearman de 0,170, con una significación de $p= 0,047$, de tal manera que mayor edad se acompaña de menores niveles del residuo, al igual que varía para el residuo de p,p'DDE.

4.3.4. Análisis biológico de la actividad hormonal y/o tóxica de los extractos de las muestras de tejido placentario

La exposición al efecto continuado de compuestos químicos con actividad hormonal estrogénica se ha investigado en este trabajo mediante la cuantificación de la estrogénicidad de los extractos tisulares en el ensayo biológico E-screen. Para ello se procedió al análisis detallado de la actividad hormonal de las dos fracciones cromatográficas obtenidas, identificadas como alfa (α) y beta (β) y correspondientes a la elución cromatográfica de los xenoestrógenos organohalogenados (fracción α) y otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas (fracción β). 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 a un décimo (1:10); para la totalidad de las muestras y separando según se trate de casos o de controles.

En la tabla siguiente se muestra el valor de la media aritmética de la carga estrogénica total efectiva (TEXB), la desviación estándar, la mediana y la frecuencia de positividad de las muestras de tejido placentario con actividad estrogénica demostrable en el ensayo E-screen, expresada en unidades equivalentes de estradiol (Eeq) pM por volumen de extracto o por gramo de tejido placentario, para la totalidad de las muestras.

CASOS y CONTROLES	Frecuencia (%)	Media (pM)	± DE	Mediana (pM)
Fracción - α	102/140 (72,8)			
Eeq/mL		2,63	10,45	0,18
Eeq/g de lípidos		234,62	1291,28	12,05
Eeq/g de placenta		1,82	6,65	0,12
Fracción - β	108/140 (77,1)			
Eeq/mL		3,11	10,87	0,36
Eeq/g de lípidos		179,05	554,94	17,70
Eeq/g de placenta		2,04	17,3	0,26

Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de media, mínimo y máximo están expresados en equivalentes de estradiol (Eeq) por 1mL de medio de cultivo, en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de lípido y en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de placenta.

La siguiente tabla muestra la carga estrogénica total efectiva (TEXB) de las fracciones cromatográficas alfa y beta correspondientes a las muestras de tejido placentario de los casos (diagnosticados de criptorquidia y/o hipospadias).

CASOS	Frecuencia (%)	Media (pM)	± DE	Mediana (pM)
Fracción - α	26/36 (72,2)			
Eeq/mL		4,16	11,64	0,22
Eeq/g de lípidos		633,95	2455,46	11,00
Eeq/g de placenta		2,92	8,16	0,14
Fracción - β	25/36 (69,4)			
Eeq/mL		3,91	10,49	0,57
Eeq/g de lípidos		218,41	494,41	18,00
Eeq/g de placenta		2,52	6,22	0,34

Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de media, mínimo y máximo están expresados en equivalentes de estradiol (Eeq) por 1mL de medio de cultivo, en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de lípido y en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de placenta.

La siguiente tabla muestra la carga estrogénica total efectiva (TEXB) de las fracciones cromatográficas alfa y beta correspondientes a las muestras de tejido placentario de los controles (niños sin malformación del tracto genito-urinario).

CONTROLES	Frecuencia (%)	Media (pM)	± DE	Mediana (pM)
Fracción - α	56/104 (53,8)			
Eeq/mL		2,12	10,02	0,18
Eeq/g de lípidos		96,39	355,49	12,65
Eeq/g de placenta		1,45	6,05	0,12
Fracción - β	56/104 (53,8)			
Eeq/mL		2,82	11,04	0,35
Eeq/g de lípidos		165,42	576,02	16,7
Eeq/g de placenta		1,87	6,66	0,22

Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de media, mínimo y máximo están expresados en equivalentes de estradiol (Eeq) por 1mL de medio de cultivo, en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de lípido y en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de placenta.

A continuación, las tablas siguientes muestran las frecuencias de positividad, negatividad, (valores inferiores al límite de detección del ensayo) y toxicidad de la carga estrogénica total efectiva (TEXB).

	n	%
Fracción - α		
E-Screen positivo	72	51,4
E-Screen negativo	42	30,0
E-Screen toxica	26	18,6
Fracción - β		
E-Screen positivo	76	54,3
E-Screen negativo	16	11,4
E-Screen toxica	48	34,3

Se ha definido la toxicidad como aquellas situaciones en las que el efecto proliferativo evidenciado en el E-screen es significativamente menor para el punto de ensayo 1:1 cuando se compara con el punto de ensayo de dilución 1:5.

La tabla siguiente muestra la distribución en dos rangos de concentraciones de los valores estimados para el TEXB de las fracciones α , β .

	n	%
Fracción - α (Eeq/g de placenta)		
$\leq 0,12$	70	50
$> 0,12$	70	50
Fracción - β (Eeq/g de placenta)		
$\leq 0,24$	68	48,6
$> 0,24$	72	51,4

Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores están expresados en equivalentes de estradiol (Eeq) por gramo de placenta.

4.4. ESTUDIO DE LOS FACTORES ASOCIADOS A MALFORMACIONES EN EL TRACTO GENITO-URINARIO (CRIPTORQUIDIA E HIPOSPADIAS)

En este apartado se presenta el análisis correspondiente al estudio de casos y controles (análisis crudo, estratificado y de regresión logística no condicional y condicional) para cada una de las variables de la encuesta epidemiológica, que se consideraron de interés tras el primer análisis estadístico descriptivo, para cada uno de los compuestos químicos organoclorados y para la carga estrogénica total efectiva (TEXB).

En cada tabla se presentan las razones de odds crudas (ORc) y su correspondiente intervalo de confianza al 95% (IC 95%) de las variables independientes, para casos de criptorquidia e hipospadias en relación con los controles. Con respecto al análisis estratificado para cada variable potencialmente confundente, se muestran las razones de odds en cada estrato de los casos frente a los controles. Los resultados del análisis de regresión logística condicional y no condicional se resumen mediante la razón de odds ajustada (ORa) calculada para el grupo de casos establecido, en función de las variables introducidas en el modelo.

4.4.1. ANÁLISIS BIVARIANTE

4.4.1.1. Características de los padres

En las tablas siguientes se muestran la distribución de casos y controles en función de las variables de exposición de la madre considerando las características antropométricas y sociodemográficas de la madre previas al embarazo, durante el embarazo y del parto y, por último, las características sociodemográficas del padre.

A) Variables antropométricas de la madre

Edad de la madre: Un posible factor de riesgo asociado a la aparición de criptorquidia y/o hipospadias es la edad materna en el momento del parto. La tabla siguiente muestra la estimación del riesgo en el análisis de regresión logística no condicional para la edad clasificada en mayor o menor de 30 años.

Edad de la madre	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
≤ 30 años	33 (37,1)	56 (62,9)	0,09	1
> 30 años	15 (24,2)	47 (75,8)		0,54 (0,34-1,399)

Prueba Chi cuadrado de Pearson

Como puede observarse la edad de la madre superior a 30 años parece ejercer cierto efecto protector sobre el riesgo de criptorquidia e hipospadias.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la edad de la madre en ≤ 30 años y > 30 años.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Edad de la madre					
≤ 30 años	29 (32,4)	56 (65,9)	0,565	1	1
> 30 años	14 (24,1)	44 (75,9)		0,62 (0,00-1,37)	0,42 (0,00-1,07)

Las variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional para la edad de la madre han sido: peso del neonato, profesión de la madre, escolaridad de la madre, número de abortos previos, enfermedades en el embarazo, terminación del parto.

Tras el ajuste, aun manteniéndose el efecto protector de la edad sobre el riesgo de malformación del tracto genitourinario, no se alcanza la significación estadística.

Grupo sanguíneo y Rh: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles en función del grupo sanguíneo de la madre en el análisis de regresión logística no condicional.

Grupo sanguíneo	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Rh				
Positivo	33 (30,0)	77 (70,0)	0,332	1
Negativo	2 (16,7)	10 (83,3)		0.85 (0,44-10,32)

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación del grupo sanguíneo en Rh positivo y Rh negativo.

Grupo sanguíneo	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Rh					
Positivo	32 (30,2)	74 (69,8)	0,346	1	1
Negativo	2 (16,7)	10 (83,3)		0,45 (0,00 – 2,16)	0,47 (0,00 – 2,28)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Índice de masa corporal (IMC): La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles en función del IMC de la madre en el análisis de regresión logística no condicional.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
IMC (kg/m²)				
≤ 23	19 (25,3)	56 (74,7)	0,113	1
> 23	28 (37,3)	47 (62,7)		1,57 (0,28-1,14)

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación del índice de masa corporal en ≤ 23 kg/m² y > 23 kg/m², valor de la mediana en la distribución del IMC.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
IMC (kg/m²)					
≤ 23	17 (24,3)	53 (75,7)	0,126	1	1
> 23	25 (36,2)	44 (63,8)		1,84 (0,84 – 4,06)	1,89 (0,84 – 4,26)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Cambio de peso en el embarazo: La tabla siguiente muestra la estimación del riesgo en el análisis de regresión logística no condicional para el cambio de peso de la madre en el embarazo clasificado en mayor o menor de 12 kg.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Peso ganado (kg)				
< 12	24 (39,3)	37 (60,7)	0,074	1
≥ 12	23 (25,6)	67 (74,4)		0,53 (0,26-1,06)

Como puede observarse el incremento de peso durante el embarazo superior a 12 kg ejerce un efecto protector sobre el riesgo de criptorquidia/hipospadias.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación del peso ganado durante el embarazo en <12 kg y \geq 12kg, valor de la mediana.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Peso ganado (kg)					
< 12	26 (36,6)	45 (63,4)	0,113	1	1
\geq 12	16 (22,9)	54 (77,1)		0,53 (0,00 – 1,11)	0,53 (0,00 – 1,16)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

La tabla siguiente muestra los resultados de la aplicación del test de comparación de medias a los valores de incremento de peso de las madres durante el embarazo.

Variable	Casos n =47 Media (\pm DE)	Cotroles n =104 Media (\pm DE)	Valor p
Peso ganado (kg)	11,33 (4,78)	13,95 (5,52)	0,007

Como puede observarse, hay un mayor aumento del peso durante el embarazo en el grupo de madres de niños con malformación que en el grupo de controles, resultando esta diferencia estadísticamente significativa.

B) Variables sociodemográficas y de exposición química

Las tablas siguientes muestran la distribución de casos y controles en función de las características sociodemográficas de la madre y el padre. En primer lugar se considera el lugar de residencia de la unidad familiar.

Lugar de residencia: La tabla siguiente muestra la estimación del riesgo en el análisis de regresión logística no condicional para el lugar de residencia clasificado en urbano y rural.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Lugar de residencia				
Urbana	9 (29,9)	22 (71,0)	0,75	1
Rural	39 (32,0)	87 (68,0)		0,91 (0,48-2,72)

La tabla siguiente muestra las ORs crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la residencia de la unidad familiar.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Lugar de residencia					
Urbana	9 (29,0)	22 (71,0)	0,73	1	1
Rural	34 (30,4)	78 (69,6)		0,86 (0,00 – 2,18)	0,85 (0,00 – 2,18)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato, escolaridad de la madre, trabajo del padre, terminación del parto.

El carácter rural o urbano del municipio de residencia no parece ejercer ningún efecto sobre la presentación de malformación.

Nivel de escolaridad: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para el nivel de estudios de la madre, estratificada en las tres categorías referidas en el apartado anterior.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Escolaridad					
Diplomatura / Licenciatura	6 (25,0)	18 (75,0)	0,85	1	1
Medios / FP	11 (29,7)	26 (70,3)		1,12 (0,00-3,74)	2,51 (0,52-12,06)
Sin estudios / Primarios	25 (30,9)	56 (69,1)		0,96 (0,00-2,77)	1,60 (0,41-5,99)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato, lugar de residencia, escolaridad de la madre, abortos previos, enfermedades en el embarazo.

Actividad laboral actual: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para la dedicación de la madre a actividades agrícolas.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Profesión de la madre				
Otros	37 (26,1)	105 (73,9)	0,011	1
Agricultura	11 (55,0)	9 (45,0)		3,47(1,33-9,03)

La tabla siguiente muestra las ORs crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la profesión de la madre.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Profesión de la madre					
Otros	34 (26,8)	93 (73,2)	0,356	1	1
Agricultura	8 (57,1)	6 (47,9)		1,86 (0,58-5,99)	1,15 (0,01-4,01)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato, lugar de residencia, escolaridad de la madre, abortos previos, enfermedades en el embarazo.

A pesar de que no se alcance la significación estadística, el OR estimado tras el ajuste sugiere un efecto importante de la dedicación de la madre a la agricultura sobre el riesgo de malformación.

Percepción de la exposición profesional: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para exposición profesional de la madre a productos químicos.

Exposición profesional de la madre	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Exposición baja	11 (30,6)	25 (69,4)	0,19	1
Exposición media	20 (25,6)	58 (74,4)		0,78 (0,328-1,875)
Exposición alta	16 (42,1)	22 (57,9)		1,6 (0,634-4,308)

Prueba Chi cuadrado de Pearson

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la exposición profesional de la madre deducida a partir de la clasificación de las profesiones.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Exposición profesional de la madre					
Exposición baja	10 (28,6)	25 (71,4)	0,274	1	1
Exposición media	18 (24,3)	56 (75,7)		0,76 (0,00-1,97)	0,73 (0,00-2,25)
Exposición alta	14 (42,4)	19 (57,6)		1,27 (0,44-3,71)	1,34 (0,00-4,90)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato, lugar de residencia, escolaridad de la madre, abortos previos, enfermedades en el embarazo.

Tras el ajuste parece no encontrarse una asociación estadísticamente significativa entre exposición profesional de la madre y malformación.

Edad del padre: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para la edad del padre con punto de corte establecido en mayor o menor de 31 años (valor de la media).

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Edad del padre				
≤ 31 años	29 (35,8)	52 (64,2)	0,182	1
> 31 años	18 (25,7)	52 (74,3)		1,61 (0,79-3,25)

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la edad del padre en ≤ 31 años y > 31 años.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Edad del padre					
≤ 31 años	24 (32,4)	50 (67,6)	0,55	1	1
> 31 años	18 (26,9)	49 (73,1)		0,55 (0,00 – 1,23)	0,73 (0,00 – 2,08)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Tras el ajuste parece no existir una asociación estadísticamente significativa entre la edad del padre y el riesgo de malformación.

Cuando se comparó la edad del padre del grupo de niños control con respecto a la totalidad de niños incluidos en la cohorte de seguimiento se observan diferencias significativas ($p= 0,010$) entre la edad media de los padres de la cohorte ($33,6 \pm 5,70$) y los del grupo control ($31,8 \pm 5,26$).

Actividad laboral actual del padre: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para la dedicación del padre a actividades agrícolas.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Profesión del padre				
Otros	40 (28,0)	103 (72,0)	0,21	1
Agricultura	8 (42,1)	11 (57,9)		1,87 (0,70-5,00)

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la profesión del padre en otros y agricultura.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Profesión del padre					
Otros	37 (28,9)	91 (71,1)	0,67	1	1
Agricultura	5 (35,7)	9 (64,3)		0,73 (0,00-3,03)	1,01 (0,01-6,07)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Exposición profesional: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para exposición profesional del padre a productos químicos.

Exposición profesional de la padre	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Exposición baja	7 (20,6)	27 (79,4)	0,03	1
Exposición media	15 (25,4)	44 (74,6)		0,76 (0,47-3,64)
Exposición alta	24 (43,6)	31 (56,4)		2,98 (1,11-8,01)

Prueba Chi cuadrado de Pearson

Como puede observarse parece haber una asociación significativa entre la exposición del padre y el riesgo de malformación.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la exposición profesional del padre deducida a partir de la clasificación de las profesiones.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Exposición profesional del padre					
Exposición baja	7 (21,2)	26 (78,8)	0,179	1	1
Exposición media	14 (24,1)	44 (75,9)		0,96 (0,00 – 3,06)	0,95 (0,00 – 3,35)
Exposición alta	20 (42,6)	27 (57,4)		2,44 (0,74 – 8,00)	2,54 (0,65 – 9,87)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Percepción de la exposición a productos químicos: La tabla siguiente muestra la estimación del OR cuando la exposición a compuestos químicos se evalúa según la percepción de las propias madres.

Percepción de la exposición a químicos	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Madre				
No	96 (69,6)	42 (30,4)	0,684	1
Sí	9 (64,3)	5 (35,7)		1,26 (0,401-4,016)

Prueba de Chi cuadrado de Pearson

La tabla siguiente muestra la estimación del OR cuando la exposición del padre a compuestos químicos se evalúa según la percepción de las madres.

Percepción de la exposición a químicos	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Padre				
No	38 (31,1)	84 (68,9)	0,991	1
Sí	9 (31,0)	20 (69,0)		0,99 (0,414-2,38)

Prueba de Chi cuadrado de Pearson.

Percepción de la exposición al tabaco: La tabla siguiente muestra la estimación del OR cuando la exposición al humo del tabaco durante el embarazo se evalúa según la percepción de las propias madres.

Percepción de la exposición a tabaco	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
No	36 (34,0)	70 (66,0)	0,22	1
Sí	11 (23,9)	35 (76,1)		0,611 (0,28-1,34)

Prueba Chi cuadrado de Pearson.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la percepción que tienen las madres de haber estado expuestas al humo del tabaco durante el embarazo.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Percepción de la exposición al tabaco *					
No	33 (33,0)	67 (67,0)	0,112	1	1
Si	9 (21,4)	33 (78,6)		0,53 (0,71-4,62)	2,33 (0,82-6,62)

* Percepción que tiene la madre de haber estado expuesta al humo del tabaco durante el embarazo
Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Uso de cosméticos durante el embarazo: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles en función de las variables: uso de cosméticos y tratamiento en el pelo durante el embarazo.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Uso de cosméticos				
No	42 (32,1)	89 (67,9)	0,448	1
Sí	5 (23,8)	16 (76,2)		1,51 (0,518-4,405)
Tratamiento en el pelo durante el embarazo				
No	30 (29,9)	69 (70,1)	0,608	1
Sí	18 (34,0)	35 (66,0)		1,206 (0,589-2,469)

Prueba Chi cuadrado de Pearson

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la percepción que tienen las madres de haber estado expuestas al humo del tabaco durante el embarazo.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Uso de cosméticos					
No	38 (31,1)	84 (68,8)	0,397	1	1
Si	4 (20,0)	16 (80,0)		0,02 (0,01)	0,03(0,02-1,03)
Tratamiento del pelo					
No	15 (30,0)	35 (70,0)	0,599	1	1
Si	27 (30,0)	63 (70,0)		1,07 (0,51-2,28)	1,26(0,56-2,80)

* Percepción que tiene la madre de haber estado expuesta al humo del tabaco durante el embarazo
Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

C) Variables reproductivas de la madre, embarazo y parto.

Abortos previos: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para la existencia de abortos previos a este embarazo.

Abortos previos	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
No	31 (26,3)	87 (73,7)	0,024	1
Sí	6 (60,0)	4 (40,0)		4,20 (1,11-16,66)

Prueba Chi cuadrado de Pearson

Como puede observarse la existencia de abortos previos al embarazo actual parece ser un factor de riesgo en la presentación de malformación.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la existencia de abortos previos al embarazo.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Abortos previos					
No	31 (27,0)	84 (73,0)	0,558	1	1
Si	4 (50,0)	4 (50,0)		2,75 (0,42 – 17,99)	1,78 (0,00 – 12,06)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Paridad: Otra variable a tener en cuenta como posible factor de riesgo en la frecuencia de cirptorquida y/o hipospadias es la paridad. De esta manera, en la tabla siguiente se muestra la distribución de casos y controles para la variables paridad.

Paridad	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Múltipara	18 (29,5)	43 (70,5)	0,758	1
Primípara	29 (31,9)	62 (68,1)		1,117 (0,557-2,262)

Prueba Chi cuadrado de Pearson.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la variable paridad.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Paridad					
Múltipara	17 (30,9)	38 (69,1)	0,506	1	1
Primípara	25 (28,7)	62 (71,3)		1,23 (0,00-8,41)	1,67 (0,00-13,87)

VARIABLES DE AJUSTE EN EL MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA CONDICIONAL: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Uso de anticonceptivos: La tablas siguiente muestra la estimación del riesgo en el análisis de regresión logística no condicional para el uso de anticonceptivos.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Uso de anticonceptivos				
No	31 (32,6)	64 (67,4)	0,56	1
Si	16 (28,1)	41 (71,9)		0,81 (0,36-1,65)

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la variable uso de anticonceptivos.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Uso de anticonceptivos					
No	28 (30,8)	63 (69,2)	0,541	1	1
Si	14 (27,5)	37 (72,5)		0,71 (0,00 – 1,59)	0,77 (0,00 – 1,80)

VARIABLES DE AJUSTE EN EL MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA CONDICIONAL: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Problemas durante el embarazo: En las tablas siguientes se muestra la distribución de casos y controles en función de las características del embarazo de la madre, analizándose la existencia de problemas durante el embarazo, y en el caso de haber existido, el efecto de la presentación de náuseas/vómitos y hemorragias.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Problemas en el embarazo					
No	23 (30,3)	53 (68,7)	0,827	1	1
Si	19 (28,8)	47 (71,2)		0,93 (0,46 – 1,89)	0,98 (0,46 – 2,05)
Nauseas/Vómitos					
No	19 (27,9)	49 (72,1)	0,638	1	1
Si	23 (31,1)	51 (68,9)		1,22 (0,58 – 2,59)	1,13 (0,52 – 2,48)
Hemorragias					
No	7 (35,0)	13 (65,0)	0,969	1	1
Si	35 (28,7)	87 (71,3)		1,21 (0,54 – 2,70)	1,02 (0,00 – 2,89)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Para ninguna de las situaciones analizadas se encontró una asociación significativa.

Estación del año: En la tabla siguiente se muestra la distribución de casos y controles en función de la estación del año en la que ha nacido el niño, analizándose las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para esta variable.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Estación del año					
Primavera	11 (23,4)	36 (76,6)	0,08	1	1
Verano	6 (23,1)	20 (76,9)		1,12 (0,00 – 8,08)	1,41 (0,00 – 11,94)
Otoño	12 (30,8)	27 (69,2)		1,11 (0,98 – 3,41)	1,16 (0,72 – 2,68)
Invierno	14 (35,0)	26 (65,9)		1,28 (1,19 – 9,12)	5,42 (0,56 – 15,42)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Tipo de parto: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles para el tipo de parto.

Tipo de parto	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Espontáneo	22 (25,9)	63 (74,1)	0,140	1
Instrumental	2 (12,5)	14 (87,5)		0,508 (0,205-1,260)
Cesárea	11 (40,7)	16 (59,3)		2,44 (0,514-11,622)

Prueba Chi cuadrado de Pearson.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para el tipo de parto estratificado en espontáneo, instrumental y cesárea.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Tipo de parto					
Espontáneo	22 (26,5)	61 (73,5)	0,663	1	1
Instrumental	2 (13,3)	13 (86,7)		0,40 (0,00 – 2,05)	0,00 (0,00 – 3,46)
Cesárea	11 (40,7)	16 (59,3)		1,85 (0,77 – 4,44)	0,94 (0,00 – 18,17)

VARIABLES DE AJUSTE EN EL MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA CONDICIONAL: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Presentación fetal: En la tabla siguiente se muestra la distribución de casos y controles según la presentación fetal, estratificado en cefálica y nalgas/transversa.

Presentación fetal	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Cefálica	32 (27,8)	83 (72,2)	0,883	1
Nalgas/Transversa	3 (30,0)	7 (70,0)		0,90 (0,219-3,695)

Prueba Chi cuadrado de Pearson.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la presentación fetal estratificada en cefálica y nalgas/transversa.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Presentación fetal					
Cefálica	32 (28,6)	80 (71,4)	0,462	1	1
Nalgas/Transversa	3 (30,0)	7 (70,0)		0,66 (0,00-1,97)	0,56 (0,01-1,83)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

4.4.1.2. Características del neonato

Para definir correctamente el término prematuridad se debe tener en cuenta además de la semana de gestación el peso que el niño presenta en el nacimiento.

Peso y semana de gestación: En la tabla siguiente se estima la fuerza de asociación entre el factor de riesgo (prematuridad) y la frecuencia de criptorquidia y/o hipospadias.

	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Peso del niño				
≥ 2500 g	43 (28,3)	109 (71,7)	0,145	1
< 2500 g	5 (50,0)	5 (50,0)		2,54 (0,69-9,17)
Semana de gestación				
≥ 37 semanas	35 (26,7)	96 (73,3)	0,100	1
<37 semanas	13 (41,9)	18 (58,1)		1,98 (0,88-4,46)

Prueba Chi cuadrado de Pearson.

En la tabla siguiente se estima la fuerza de asociación entre el factor de riesgo (prematuridad) y la frecuencia de criptorquidia y/o hipospadias, mostrando las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación del peso del niño en $\geq 2500\text{g}$ y $< 2500\text{g}$, así como para la estratificación de la semana de gestación en ≥ 37 semanas y < 37 semanas.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Peso del niño (g)*					
≥ 2500	39 (27,5)	103 (72,6)	0,239	1	1
< 2500	4 (40,0)	6 (60,0)		3,09 (0,53-18,17)	2,94 (0,49-17,63)
Semanas de gestación**					
≥ 37	30 (24,6)	92 (75,5)	0,365	1	1
< 37	13 (43,3)	17 (56,7)		4,18 (0,75-23,34)	2,29 (0,38-13,74)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: *edad de la madre al parto; ** edad de la madre y peso del neonato.

En la tabla siguiente se muestra los resultados de la aplicación del test de comparación de medias a los valores de peso del niño y semanas de gestación.

Variable	Casos n =47	Cotroles n =104	Valor p
Peso del niño	3110,63 (614,67)	3304,39 (449,13)	0,030
Semanas de gestación	38,88 (2,24)	38,94 (1,66)	0,848

Como puede observarse la media de los recién nacidos es menor para los casos que para los controles ($p= 0,03$).

Cuando se comparó la duración del embarazo del grupo de niños control con respecto a la totalidad de niños incluidos en la cohorte de seguimiento se observan diferencias significativas ($p= 0,002$) entre los días de gestación de los niños de la cohorte ($276,6 \pm 9,23$) y el grupo control ($272,6 \pm 11,64$).

Longitud y perímetro cefálico: La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles en función de la longitud del recién nacido y su perímetro cefálico en el análisis de regresión logística no condicional.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Longitud (cm)				
< 51	28 (41,8)	39 (58,2)	0,048	1
≥ 51	15 (25,0)	45 (75,0)		0,46 (0,22-0,99)
Perímetro cefálico (cm)				
≤ 34,6	26 (36,1)	46 (63,9)	0,539	1
> 34,6	17 (30,9)	38 (69,1)		1,26 (0,59-2,66)

Como puede observarse la longitud del neonato superior a 51cm es un factor protector de malformación.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la longitud del neonato en < 51 cm y ≥ 51 cm, así como para la estratificación del perímetro cefálico (horizontal) en < 34,6 cm y ≥ 34,6 cm.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Longitud (cm)					
< 51	25 (41,0)	36 (59,0)	0,211	1	1
≥ 51	13 (23,2)	43 (76,8)		0,42(0,00-1,05)	0,68 (0,00-2,37)
Perímetro cefálico (cm)					
< 34,6	22 (33,8)	43 (66,2)	0,540	1	1
≥ 34,6	16 (30,8)	36 (69,2)		1,22 (0,49-3,06)	1,99 (0,68-5,87)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Incidencias en el tracto genito-urinario: En la tabla siguiente se muestra la distribución de casos y controles en relación a la existencia de alguna incidencia en el tracto genito-urinario que pudiera estar asociada a criptorquidia y/o hispadias.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Ninguna incidencia	21 (43,8)	34 (29,8)	0,087	1
Alguna incidencia	27 (56,3)	80 (70,2)		1,83 (0,91-3,67)

Dentro de las incidencias en el tracto genito-urinario se recogen: la fimosis, hidrocele, micropene, epispadia, malformación en el prepucio.

Como puede observarse la presentación de cualquier otra de las anomalías recogidas se asocia con el riesgo de presenta criptorquidia/hispadias.

4.4.1.3. Pesticidas organoclorados en las muestras de tejido placentario y riesgo de malformación urogenital

Las tablas siguientes muestran la distribución de casos y controles en cuanto a la presencia de un nivel detectable de residuo de cada uno de los pesticidas organoclorados evaluados en el tejido placentario.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Grupo DDT				
o,p'DDD				
No	17 (20,7)	65 (79,3)	1	
Si	19 (30,2)	44 (69,8)	0,193	1,651 (0,774-3,523)
p,p'DDE				
No	5 (22,7)	17 (77,3)	1	
Si	31 (25,2)	92 (74,8)	0,804	1,146 (0,390-3,363)
o,p' DDT				
No	13 (17,6)	61 (82,4)	1	
Si	23 (32,4)	48 (67,6)	0,039	2,248 (1,033-4,896)
p,p 'DDT				
No	18 (18,6)	79 (81,4)	1	
Si	18 (37,5)	30 (62,5)	0,013	2,633 (1,211-5,727)
Grupo Endosulfan				
Endosulfan eter				
No	16 (23,5)	52 (76,5)	0,734	1
Si	20 (26,0)	57 (74,0)		1,140 (0,535-2,432)
Endosulfan lactona				
No	21 (21,6)	76 (78,4)	0,208	1
Si	15 (31,3)	33 (68,8)		1,645 (0,755-3,583)
Endosulfandiol				
No	20 (27,0)	54 (73,0)	0,531	1
Si	16 (22,5)	55 (77,5)		0,785 (0,368-1,675)
Endosulfan I				
No	12 (17,4)	57 (82,6)	1	
Si	24 (31,6)	52 (68,4)	0,048	2,192 (0,997-4,822)
Endosulfan II				
No	14 (18,9)	60 (81,1)	1	
Si	22 (31,0)	49 (69,0)	0,093	1,924 (0,892-4,152)
Endosulfan sulfato				
No	10 (25,6)	29 (74,4)	1	
Si	26 (24,5)	80 (75,5)	0,891	0,943 (0,405-2,192)

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Grupo aldrin/dieldrin/endrin				
Aldrin				
No	18 (20,5)	70 (79,5)	0,130	1
Si	18 (31,6)	39 (68,4)		1,795 (0,838-3,845)
Dieldrin				
No	25 (21,7)	90 (78,3)		1
Si	11 (36,7)	19 (63,3)	0,090	2,084 (0,878-4,949)
Endrin				
No	14 (18,7)	61 (81,3)		1
Si	22 (31,4)	48 (68,6)	0,075	1,997 (0,925-4,311)
Otros pesticidas				
Lindano				
No	7 (12,5)	49 (87,5)		1
Si	29 (32,6)	60 (67,4)	0,006	3,383 (1,365-8,385)
Metoxicloro				
No	17 (19,5)	70 (80,5)		1
Si	19 (32,8)	39 (67,2)	0,071	2,006 (0,936-4,301)
Mirex				
No	23 (20,2)	91 (79,8)		1
Si	13 (41,9)	18 (58,1)	0,013	2,857 (1,224-6,668)
HCB				
No	14 (20,9)	53 (79,1)		1
Si	22 (28,6)	55 (71,4)	0,289	1,514 (0,702-3,267)

Prueba de Chi cuadrado de Pearson

La asociación entre la malformación del tracto genito-urinario y la presencia/ausencia de determinados pesticidas en las muestras de placenta analizadas resultó estadísticamente significativa para lindano, endosulfan I, o,p'-DDT, p,p'-DDT y mirex.

La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles en cuanto a la presencia de un nivel detectable de residuo de los pesticidas evaluados, que resultaron asociados significativamente con el riesgo de criptorquidia/hipospadias en el análisis de regresión logística no condicional.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
o,p'DDT					
No	12 (16,7)	60 (83,3)	0,047	1	1
Sí	23 (33,3)	46 (66,7)		2,24 (1,01-4,95)	2,17 (0,96-5,00)
p,p'DDT					
No	17 (18,1)	77(81,9)	0,017	1	1
Sí	18 (38,3)	29 (61,7)		2,77 (1,2 –6,36)	2,17 (0,95-5,00)
Endosulfan I					
No	11 (16,4)	56 (83,6)	0,025	1	1
Sí	24 (32,4)	50 (67,6)		2,60 (1,13-6,00)	2,49 (0,99-6,24)
Lindano					
No	6 (11,1)	48 (88,9)	0,002	1	1
Sí	29 (33,3)	58 (66,7)		5,64 (1,88-17,11)	9,48 (2,43-36,96)
Mirex					
No	23 (20,7)	88 (79,3)	0,023	1	1
Sí	12 (40,0)	18 (60,0)		2,48 (0,97-6,36)	3,42 (1,19-9,77)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parte, peso del neonato.

En el análisis de regresión logística condicional se confirma la asociación significativa entre la presencia de lindano, endosulfan I, o,p'-DDT, p,p'-DDT y mirex y el riesgo de criptorquidia/hipospadias.

Cuando en lugar de la presencia/ausencia de pesticida se consideró la concentración del residuo en tejido placentario, los resultados obtenidos en el análisis estadístico son los que se muestra en la tabla siguiente.

Variable	Casos n=35	Controles n=106	Valor de p
Grupo DDT			
o,p'DDD	15,52 (35,01)	26,93 (106,28)	0,557
p,p'DDE	9,60 (26,55)	7,48 (15,21)	0,967
o,p' DDT	2,35 (6,90)	2,50 (7,66)	0,988
p,p' DDT	1,03 (3,81)	2,57 (13,81)	0,376
Suma DDT *	28,60 (47,35)	39,70 (110,27)	0,510
Grupo Endosulfan			
Endosulfan eter	0,12 (0,19)	0,15 (0,23)	0,735
Endosulfan lactona	8,45 (14,9)	6,91 (16,28)	0,606
Endosulfandiolo	2,43 (3,95)	4,05 (8,05)	0,481
Endosulfan I	2,32 (5,29)	2,30 (5,18)	0,683
Endosulfan II	2,54 (8,39)	1,06 (2,13)	0,180
Endosulfan sulfato	4,13 (6,48)	2,69 (5,42)	0,406
Suma Endosulfan *	21,34 (25,12)	18,46 (29,39)	0,565
Grupo aldrin/dieldrin/endrin			
Aldrin	0,32 (0,35)	0,68 (4,39)	0,686
Dieldrin	1,19 (2,89)	0,33 (1,24)	0,052
Endrin	3,09 (4,53)	3,30 (8,79)	0,714
Otros pesticidas			
Lindano	0,72 (0,82)	0,36 (0,83)	0,007
Metoxicloro	0,65 (1,00)	0,82 (3,87)	0,187
Mirex	0,46 (0,88)	0,63 (2,05)	0,469
Hexaclorobenzeno	4,23 (9,78)	4,44 (9,42)	0,865

Regresión logística. Las unidades de los valores medios son ng/g tejido placentario; * Σ DDT: esta variable se ha calculado sumando los valores de DDT y sus metabolitos. Σ Endosulfanes: esta variable se ha calculado sumando los valores de todos los endosulfanes.

Como puede observarse en la tabla la concentración media de dieldrin y lindano fue significativamente mayor para las placentas de los individuos-casos que para los controles apareados.

La tabla siguiente muestra la distribución de casos y controles en función del número de residuos determinados por placenta.

Variable	Casos n=35	Controles n=106	Valor de p
Número de pesticidas	9,34 (3,19)	6,97 (3,93)	0,002

La aplicación del test estadístico indica un mayor número de residuos cuantificados en los casos respecto a los controles.

4.4.1.4. Análisis biológico de los extractos de las muestras de tejido placentario y riesgo de malformación urogenital

Las tablas siguientes muestran la distribución de casos y controles en función de la positividad y negatividad del resultado de la estimación de la carga estrogénica total efectiva para las fracciones alfa y beta, en el análisis de regresión logística no condicional y condicional.

	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Fracción alfa				
< L.D*	10 (17,2)	48 (82,8)	0,054	1
≥ L.D.	26 (31,7)	56 (68,3)		2,22 (0,98-5,00)
Fracción beta				
< L.D.	11 (18,6)	48 (81,4)	0,102	1
≥ L.D.	25 (30,9)	56 (69,1)		1,96 (0,87-4,35)

Prueba de Chi cuadrado de Pearson. * L.D. Límite de detección.

Como puede observarse la frecuencia de placentas con carga estrogénica detectable fue significativamente mayor en el grupo de partos correspondientes a niños con malformaciones del tracto genito-urinario.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) de las fracciones alfa y beta por debajo o por encima del límite de detección.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Fracción alfa					
< L.D.	10 (18,2)	45 (81,8)	0,031	1	1
≥ L.D.	25 (30,9)	56 (69,1)		2,02 (0,84-4,80)	2,82 (1,10-7,24)
Fracción beta					
< L.D.	11 (19,6)	45 (80,4)	0,069	1	1
≥ L.D.	24 (30,0)	56 (70,0)		1,75 (0,75-1,00)	2,31 (0,94-5,70)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato.

Tanto el análisis de regresión logística no condicional como condicional pone de manifiesto el valor de la estimación de la carga estrogénica total efectiva de la fracción cromatográfica alfa para la estimación del riesgo de malformación urogenital, al asociar significativamente valores detectables de estrogenicidad con mayor frecuencia de enfermedad.

La carga estrogénica se estratificó en valores superiores o inferiores a las medianas de los controles 0,12 pM estradiol/g placenta y 0,24 pM estradiol/g placenta para las fracciones alfa y beta, mostrándose los resultados del análisis en la tabla siguiente.

	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	Riesgo
Fracción alfa*				
≤ 0,12	18 (25,7)	52 (74,3)	0,96	1
> 0,12	18 (26,1)	51 (73,9)		0,98 (0,46-2,09)
Fracción beta*				
≤ 0,24	14 (21,2)	52 (78,8)	0,275	1
> 0,24	20 (29,4)	48 (70,6)		0,65 (0,29-1,42)

Prueba de Chi cuadrado de Pearson. * Eeq pM/g placenta.

La tabla siguiente muestra las OR crudas y ajustadas en el modelo de regresión logística condicional para la estratificación de la carga estrogénica (Eeq pM/g placenta) en $\leq 0,12$ y $> 0,12$ en el caso de la fracción alfa y en $\leq 0,24$ y $> 0,24$ para la fracción beta.

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p	ORc (IC 95%)	ORa* (IC 95%)
Fracción alfa*					
$\leq 0,12$	18 (26,1)	51 (73,9)	0,902	1	1
$> 0,12$	17 (25,8)	49 (74,2)		0,96 (0,42-2,18)	1,02 (0,42-2,44)
Fracción beta*					
$\leq 0,24$	14 (21,2)	52 (78,8)	0,307	1	1
$> 0,24$	20 (30,8)	45 (69,2)		0,60 (0,66-3,67)	1,49 (0,58-3,85)

Variables de ajuste en el modelo de regresión logística condicional: edad de la madre al parto, peso del neonato. *Eeq pM/g placenta.

Por último, la tabla siguiente muestra los valores medios de carga estrogénica total efectiva de los casos y los controles, y el resultado de la aplicación del test de comparación de medias .

Variable	Casos n=35 Media (\pm DE)	Controles n=106 Media (\pm DE)	Valor p
Alfa (Eeq/g de placenta)	3,92 (9,12)	2,08 (7,19)	0,92
Beta (Eeq/g de placenta)	2,93 (6,63)	2,62 (7,80)	0,77

5. Discusión

A finales de 1999, Ana García del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Valencia publicaba en el *American Journal of Epidemiology* un excelente trabajo en que se analizaba la exposición laboral a pesticidas, fundamentalmente la relacionada con actividades agrícolas, y la prevalencia de malformaciones congénitas en el recién nacido. El trabajo era oportuno porque llamaba la atención sobre un problema largamente denunciado que, sin embargo, no había merecido la atención suficiente: La necesidad de prestar una mayor atención al trabajo de la madre en actividades agrícolas y, en general, a la exposición de los progenitores, padre y madre, a los pesticidas de uso agrícola. De hecho, el análisis estadístico de los datos presentados por García y colaboradores mostraba una asociación entre la actividad agrícola de la madre durante las semanas previas a la concepción y primeros meses de gestación y el riesgo de malformación en los recién nacidos. En un momento en que la atención de los programas de investigación de la Unión Europea se quiere centrar en medioambiente y salud infantil (SCALE, 2004), este trabajo de García y otros trabajos similares se han convertido en una referencia obligada para la planificación de nuevas estrategias de trabajo.

Los defectos congénitos pueden ser consecuencia de un daño genético previo a la concepción o de la acción directa de cualquier agente sobre el embrión o el feto. Ambos procesos pueden, a su vez, estar relacionados con la exposición de la madre o el padre con anterioridad a la concepción o durante el embarazo. Por esta razón es crítico en el planteamiento de cualquier trabajo que intente explorar la validez de la hipótesis, definir *a priori* que tipo de exposición y en que momento debería ser evaluada, de acuerdo siempre con el mecanismo patogénico propuesto para la malformación de interés. Así por ejemplo, la exposición materna a teratógenos ocurrida durante la organogénesis general se reconoce como la causa mejor caracterizada de los defectos del niño observados al nacimiento. Igualmente, otras formas y tiempos de exposición ligadas al padre pudieran ser igualmente importantes ya que la transferencia seminal de compuestos químicos, la contaminación del hogar por compuestos químicos aportados por el padre o el daño genético o epigenético de las células germinales del padre han sido sugeridas, en más de una ocasión, como factores de riesgo en la definición de defecto congénito. Por el contrario, rara vez se ha atribuido al daño sobre células germinales maternas una responsabilidad en la transmisión del efecto, aunque hay cierta posibilidad de que así ocurra durante la compleción de la ovogénesis antes de la fecundación.

Es importante tener en cuenta que la exposición particular de la madre y el padre puede haber ocurrido en cualquier momento con anterioridad a aquel en que se ha producido la expresión del daño en el hijo, ya que la lesión sobre células germinales puede haber ocurrido con anterioridad a la concepción, y los agentes tóxicos responsables del daño pueden haberse acumulado en el organismo con anterioridad a la gestación. Por esta razón, cualquier estudio que se plantee con objeto de evaluar el daño reproductivo tiene que considerar tanto los modelos de exposición durante la gestación, como con anterioridad a que ésta tenga lugar.

Queda por recordar en este preámbulo de discusión, que se ha enunciado una hipótesis de trabajo, reconocida *a priori* y establecida como fundamento del estudio, que se refiere al mecanismo de patogénesis de la enfermedad identificada como centro de estudio. Criptorquidia e hipospadias consideran, entre otras alternativas de causalidad, como un factor de riesgo la exposición, en momentos críticos del desarrollo embrionario, a una actividad hormonal estrogénica no balanceada. Según la hipótesis patogénica, la especial sensibilidad de las células germinales a factores hormonales y al desequilibrio andrógenos/estrógenos, conduciría a una diferenciación inadecuada de las células de Sertoli y Leydig que, a la larga, determinaría una pobre calidad seminal y la mayor probabilidad del desarrollo de cáncer de testículo (via función celular Sertoli), o bien a una insuficiencia androgénica (via función celular de

Leydig), que se manifestaría en el nacimiento como un defecto en el tracto genitourinario de mayor o menor relevancia clínica (Skakkebaek *et al* 2001). El síndrome de disgenesia testicular es, por tanto, un buen marco conceptual para encajar exposición estrogénica y malformación congénita y parece un excelente punto de partida para estudiar el efecto de los disruptores endocrinos sobre la salud humana.

Creemos, por tanto, que como se proponía en la sección introductoria de este trabajo, criptorquidia e hipospadias son patologías idóneas para estudiar la asociación entre la exposición a disruptores endocrinos y sus consecuencias en salud humana, siempre y cuando se puedan resolver satisfactoriamente los dos graves inconvenientes planteados sobre la mala clasificación de los pacientes afectados de criptorquidia y la dificultad de estimar exposición, y muy especialmente la que concierne al conjunto de disruptores endocrinos. Como es lógico, el diseño del estudio está condicionado por la patología seleccionada. La elección de la hipospadia como patología de estudio se realizó considerando, por una parte, la fácil identificación de los casos y, por otra, su corto período de inducción desde el momento de la exposición a sustancias disruptoras endocrinas, en las etapas pre y perinatal, hasta la aparición de dicha patología, en el mismo momento del nacimiento. Otras patologías hormono-dependientes como el cáncer de mama, endometrio, próstata o testículo, que también servirían de modelo para estudiar la hipótesis de relación entre exposición y enfermedad y podrían haber sido investigadas, presentan un largo período de latencia hasta su expresión clínica y diagnóstico, lo que dificulta el establecimiento de asociaciones causales con exposiciones que acontecieron años atrás. Así, adquiere aún mayor interés el estudio de la criptorquidia e hipospadias para clarificar la posible etiología común de estas patologías. La inclusión en un mismo grupo de criptorquidia e hipospadias se decidió atendiendo a dos razones: por una parte, una revisión de la bibliografía nos hizo ver que las teorías etiopatogénicas barajadas podían ser similares, los factores de riesgo identificados coincidían en la mayoría de los casos y ambas enfermedades se presentan frecuentemente asociadas (Depue *et al.*, 1984, Calzolari *et al.*, 1986, Hjertkvist *et al.*, 1989, Berkowitz *et al.*, 1995, Weidner *et al.*, 1998, Weidner *et al.*, 1999, Akre *et al.*, 1999). Por otra parte, puesto que hipospadias es una patología rara, el unir su estudio al de criptorquidia suponía incrementar considerablemente el número de casos y, con ello, la potencia del estudio.

La elección de un diseño epidemiológico de casos y controles anidado en un estudio de cohortes tiene una razón clara: la colección efectiva en el momento del alumbramiento de todos los casos prevalentes en el hospital de referencia. Es cierto que criptorquidia e hipospadias son patologías poco frecuentes por lo que la colección de un número suficiente de individuos para el análisis estadístico es arriesgada si el

periodo de reclutamiento es corto. En nuestro caso este periodo fue de 20 meses, tiempo durante el cual se produjeron 4455 alumbramientos de varones y ocurrieron 29 casos de criptorquida, lo que significa una prevalencia del 0,6% a los tres meses de edad. Por otra parte, la cohorte de 668 individuos reclutados representa el 15% de los varones nacidos, número que nos pareció suficiente para identificar las características de los varones alumbrados en ese periodo y establecer si los 114 controles apareados representan a la población de referencia o existía algún tipo de selección inadvertida.

Recuérdese que un estudio de casos y controles utiliza la información procedente de los casos apareados en la población en estudio durante un período de observación definido y selecciona una muestra representativa de la población estudio, los controles, de tal manera que éstos reflejen la distribución de la exposición en esa población (Ahlbom, 1992). A este respecto, el análisis de los resultados presentados en este trabajo confirma la no existencia de diferencias importantes entre el subgrupo de controles y el grupo de individuos de la cohorte. La comparación de las características de ambas series puso de manifiesto su similitud en lo que respecta a edad de la madre, ocupación del padre y la madre, y tipo de parto. Tan solo para edad del padre, de los controles del estudio de casos y controles respecto a la cohorte general y los días de gestación ($272,6 \pm 11,64$ frente a $276,6 \pm 9,23$, $p = 0.002$) se mostraron diferencias con significación estadística.

Por otra parte, el diseño casos y controles es especialmente útil en los estadios preliminares de una investigación cuando no existe un importante cuerpo de conocimientos; en nuestro estudio, se consideró una hipótesis novedosa –la posible asociación entre exposición a disruptores endocrinos y riesgo de presentación de criptorquidia e hipospadias, analizada muy someramente en investigaciones previas (García *et al* 1999; López Navarrete, 2000) y sobre la que, en definitiva, existe poca información. Finalmente, este tipo de diseño permite el análisis de la multicausalidad en relación al efecto considerado, por lo que resultó de sumo interés en el estudio de una enfermedad de etiología desconocida como es el caso de la criptorquidia/hipospadias, en la que participan muy diversos factores de riesgo.

En cualquier caso, la validez del diseño seleccionado se sustenta en una hipótesis que nuestro trabajo puede verificar de forma muy aproximada: los niveles de xenoestrógenos medidos en la placenta en el momento del alumbramiento son un buen correlato de los niveles de xenoestrógenos a los que el feto ha estado expuesto durante los períodos críticos del desarrollo urogenital durante las primeras semanas del embarazo (Sharpe 1993(b)). De hecho, en este estudio se ha utilizado el tejido placentario obtenido en el alumbramiento en lugar del tejido adiposo obtenido en el

momento de la intervención quirúrgica por orquidopexia, como ocurrió en planteamientos anteriores de nuestro grupo (López Navarrete, 2000). Bien es cierto que el tejido placentario nos ha sorprendido por su bajo contenido en grasa (<2%), por lo que la determinación química del residuo resulta en valores mas próximos a los niveles séricos que a los de tejido adiposo, pero la proximidad entre alumbramiento y génesis de la enfermedad bien justifica este sustrato tisular para la investigación de la exposición. En una valoración *a priori* se planteó la posible escasez de potencia del estudio debido al bajo tamaño muestral que se estaba considerando. Posteriormente, los resultados obtenidos han confirmado, en algunas situaciones un número escaso de individuos, pero en este sentido, es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones: i) este trabajo se planteó como un estudio piloto, pues la información existente que permitiera delimitar el tamaño muestral *a priori* era muy escasa, al menos en lo que respecta a la prevalencia de criptorquidia al nacimiento o la frecuencia y extensión de la exposición medida en el curso de la gestación, y ii) los requisitos del diseño del estudio obligaban a la obtención de una muestra de placenta lo que redujo enormemente la factibilidad para disponer de un tamaño muestral suficiente, por razones obvias. Es evidente que si se hubieran manejado tan solo las variables de la historia clínica como los principales factores de riesgo objeto de investigación, el tamaño de muestra podría haber sido mucho mayor, pero no fue nuestro caso.

Un aspecto discutible en este estudio sería la definición coherente de criptorquidia, es decir de los individuos casos, dada la dificultad de diagnóstico clínico establecido en el momento del nacimiento y la participación de varios exploradores con criterios diagnósticos dispares. Para evitar confusiones a este respecto, se hizo un esfuerzo particular en el establecimiento de criterios comunes de diagnóstico, incluido el estudio comparativo de los diagnósticos de los médicos exploradores ante individuos problema y el entrenamiento común. La participación de varios observadores para cada caso diagnosticado, la discusión permanente de criterios que pudieran afectar a casos límite, y el seguimiento establecido en el curso de la evolución de la patología con revisiones de los niños a los tres y doce meses, permitieron alcanzar cierta confianza en el diagnóstico de certeza de esta patología. En el caso de hipospadias las dificultades diagnósticas son menores y se presume un mecanismo etiopatogénico común con criptorquidia (Depue *et al.*, 1984, Calzolari *et al.*, 1986, Hjertkvist *et al.*, 1989, Berkowitz *et al.*, 1995, Weidner *et al.*, 1998, Weidner *et al.*, 1999, Akre *et al.*, 1999).

La elección de los controles se hizo siguiendo los criterios de apareamiento definidos en el inicio del estudio; estos son: i) semana de gestación, ii) fecha de

nacimiento y iii) paridad de la madre. Estos criterios se han mantenido incluso en el análisis estadístico de tal manera que se ha optado por presentar los resultados conjuntamente de la regresión logística y de la regresión logística condicionada, en la cual los criterios de apareamiento de los controles se mantienen en el propio análisis matemático a la hora de estimar los ORs.

Como se ha indicado previamente, nuestro grupo de trabajo había abordado con anterioridad la hipótesis de una posible asociación entre disruptores endocrinos y criptorquidia, ya fuera de forma indirecta a través de estudios epidemiológicos de tipo ecológico ([García Rodríguez et al., 1996](#)) en los que se investigaba el uso de pesticidas en áreas agrícolas y se consideraba la superficie cultivada, ya fuera mediante estudios casos y controles con reclutamiento de individuos al tiempo de la orquidopexia ([López Navarrete, 2000](#)). Los resultados de esos trabajos nos permitieron, en primer lugar, poner de manifiesto que la mayor frecuencia de orquidopexias ocurre para niños provenientes de determinados municipios, fundamentalmente aquellos próximos a la costa granadina, coincidentes con el uso de técnicas de agricultura intensiva que incluye la práctica, a veces abusiva del empleo de fitosanitarios. El segundo de los trabajos, si bien no pudo confirmar una asociación entre exposición a pesticidas y riesgo de criptorquidia, si que vino a demostrar la importante exposición de la población infantil, ya que, como se indicaba en las conclusiones de ese trabajo, no había un solo individuo libre de residuo químico en su tejido adiposo, con una media de cuatro compuestos detectables por individuo. Además sirvió para confirmar el mayor riesgo relacionado con el municipio de procedencia de los niños, ya que se asoció un mayor riesgo de criptorquidia con el área geográfica de localización próxima a la costa, donde la agricultura intensiva se ha desarrollado en los últimos años.

Estos trabajos nos animaron a plantear un nuevo estudio en el que se recogieron los casos prevalentes de criptorquidia e hipospadias en el Hospital Universitario San Cecilio y se prestara especial atención, como ya se ha indicado, a la estricta clasificación de los casos y la correcta expresión de la exposición. Atendiendo a este segundo requerimiento, a la medida individualizada de determinados pesticidas organoclorados en tejido placentario se une la expresión de la exposición a través de la estimación de la carga estrogénica total efectiva. El análisis pormenorizado de los resultados nos ha permitido identificar aquellos factores que parecen contribuir a la presentación de la malformación en el momento del nacimiento, ya se trate de factores en los que se advierte claramente la exposición hormonal, o se trate de situaciones que se acompañan de una mayor frecuencia de enfermedad sin que sea sencillo establecer un mecanismo de patogénesis evidente.

De entrada, es clásico el estudio del efecto del mes de nacimiento del niño en la aparición de criptorquidia, describiéndose dos picos de incidencia de esta enfermedad: uno en los meses de septiembre, octubre y noviembre, y un segundo en marzo, abril y mayo (Berkowitz *et al.*, 1995). Se ha querido explicar en función de las variaciones en la duración de la luz del día según los meses del año, que afectarían a la hipófisis y a la producción hormonal de testosterona, cuya oleada es necesaria para el descenso del testículo; en nuestro caso se ha observado cierta estacionalidad en la presentación de los casos de tal manera que tomado como referencia la primavera, el riesgo es superior para los meses de invierno acercándose a la significación estadística (OR = 1,28, IC95% 1,19-9,12), y mostrando idéntica tendencia cuando se ajusta en la regresión logística condicional por la edad de la madre al parto y el peso del neonato (OR = 5,42, IC95% 0,56-15,42).

En cuanto a la gravidez materna en la mayoría de los estudios se ha encontrado una asociación entre la baja paridad y la aparición de criptorquidia en niños, presentando mayor riesgo las madres primigrávidas (Swerdlow *et al.*, 1983, Berkowitz *et al.*, 1995, Akre *et al.*, *et al.*, 1999), aunque otros autores no encuentran asociación alguna (Swerdlow *et al.*, 1983, Depue *et al.*, 1984, Berkowitz *et al.*, 1995). En este estudio no pudo encontrarse asociación significativa entre paridad, multiparidad y el riesgo de criptorquidia, si bien la situación de primípara parece conducir a un mayor riesgo de malformación en el neonato una vez que en el análisis de regresión logística condicionada se ajusta por la edad de la madre y el peso del recién nacido. Ahondando en el factor gravidez y a pesar de la dificultad de interpretación, la existencia de abortos previos se presenta en este estudio como un factor de riesgo que alcanza la significación estadística en el análisis de regresión logística (OR = 4,20, IC95% 1,11-16,66). Parecería paradójico este efecto si se considera a la luz del efecto protector que ejerce la multiparidad, pero podría tener una explicación coherente si se dispusiera de más información de las características del feto objeto de aborto, en el que podrían haber acontecido defectos de desarrollo compatibles con la hipótesis de trabajo. De hecho en este trabajo se ha encontrado una importante asociación entre la presentación de incidencias diversas en el tracto genito-urinario que van desde fimosis congénita a hidrocele, y el mayor riesgo de criptorquidia/hipospadias (OR=1,83; IC 95% 0,91-3,67). A este respecto, Berkowitz (Berkowitz *et al.*, 1995) encontró que las madres con antecedentes de abortos espontáneos presentaban más riesgo de tener un hijo con criptorquidia, y en relación a la presencia de recién nacidos muertos previos al embarazo, Depue no encontró ninguna asociación con el riesgo de criptorquidia (Depue *et al.*, 1984), pero algunos autores sí han encontrado un mayor riesgo de hipospadias si existe este antecedente (Weidner 1999).

Se encontró asociación entre el peso al nacer del niño y un mayor riesgo de presentación de criptorquidia e hipospadias, de tal manera que el peso medio de los niños diagnosticados de criptorquidia e hipospadias ($3110,63 \pm 614,67$ g) fue significativamente inferior al de los sujetos control ($3304,39 \pm 449,13$ g). El peso al nacer es un factor de riesgo bien documentado (López Navarrete 2000), con un efecto más pronunciado en niños con peso inferior a 2500 g y asociado con las dos patologías, en especial con la criptorquidia; el bajo peso es una manifestación de retraso en el crecimiento y desarrollo fetales, motivo por el cual no se produce el descenso de los testículos durante el tercer trimestre y tampoco la fusión de los pliegues uretrales y la canulación del glande del pene, lo que desemboca en la aparición de criptorquidia e hipospadias, respectivamente.

En relación a la variable edad gestacional, otro de los factores de riesgo clásicos para la patología de estudio, no se observó asociación entre el número de semanas de gestación y el riesgo de criptorquidia e hipospadias, de tal manera que el valor medio fue similar para ambas series de individuos. No obstante, en la estratificación de la edad gestacional en grupos de menor o igual a 37 semanas o superior a este periodo de tiempo, se observó que la frecuencia de niños con criptorquidia era relativamente mayor en el grupo de menor duración de la gestación, tal y como había ocurrido en series previas (Swerdlow *et al.*, 1983, Depue *et al.*, 1984, Morley *et al.*, 1987, Hjertkvist *et al.*, 1989, Berkowitz *et al.*, 1995, Czeizel *et al.*, 1995, Møller *et al.*, 1998, Akre *et al.*, 1999, Møller *et al.*, 1999, Weidner *et al.*, 1999) incluida la nuestra (López Navarrete, 2000), aunque no se ha alcanzado la significación estadística (OR= 1,88; IC 95% 0,88-4,46; p= 0,100; OR cruda 4.18 y OR ajustada 2.29). La utilización de la edad gestacional de la serie completa de la cohorte, en lugar de restringirla a los controles apareados, acerca estas diferencias a la significación estadística.

En estudios previos habíamos descrito que la edad materna inferior a 25 años se comportaba como factor protector significativo del riesgo de presentación de patología (López Navarrete, 2000), coincidente con el hecho de que otras investigaciones habían observado mayor riesgo para las edades avanzadas (Berkowitz *et al.*, 1995, Paulozzi *et al.*, 1997, Møller *et al.*, 1999, Akre *et al.*, 1999), aunque también para las madres más jóvenes (Swerdlow *et al.*, 1983, Depue *et al.*, 1984, Hjertkvist *et al.*, 1989). No obstante, en muchos otros casos no se ha encontrado asociación entre esta variable y la aparición de criptorquidia e hipospadias (Stoll *et al.*, 1990, Weidner *et al.*, 1999) por lo que los resultados no son concluyentes. En nuestra serie, los datos son igualmente de difícil interpretación ya que en la regresión logística la edad de la madre mayor de 30 años es un factor claramente protector (p = 0.09), que en el

análisis condicional, pierde la significación, aunque se mantiene en valores de OR= 0,62.

Clásicamente se han relacionado con el riesgo de aparición de criptorquidia algunas patologías padecidas por la madre en el curso de la gestación, como la hiperemesis y la preeclampsia, asociadas con una elevada concentración de estrógenos, para las que algunos estudios han mostrado un exceso de riesgo de criptorquidia (Depue *et al.*, 1984, Jones *et al.*, 1998) y de hipospadias (Akre *et al.*, 1999), pero no otros (Swerdlow *et al.*, 1983, Calzolari *et al.*, 1986, Hjertkvist *et al.*, 1989), por lo que los resultados son inconsistentes. En nuestro estudio, el padecimiento de enfermedades durante el embarazo se centró en la hiperemesis y la hemorragia y de forma mas inespecífica en cualquier tipo de problema. Aunque los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos, los valores de las razones de odds se situaron por encima de la unidad, siendo algo mayor el riesgo para el caso de las nauseas/vómitos.

En cuanto al grupo sanguíneo de la madre, no se obtuvieron resultados significativos, aunque las estimaciones de las OR, tanto crudas como estratificadas, fueron en la dirección descrita por Depue (1984), que encuentra mayor riesgo de criptorquidia para el grupo sanguíneo B. Swerdlow, sin embargo, describió este grupo como factor protector de criptorquidia (Swerdlow *et al.*, 1983). Por otra parte, nuestros resultados no mostraron asociación entre el Rh de la madre y una mayor frecuencia de aparición de la patología estudiada en los hijos.

De acuerdo con lo publicado por otros investigadores y coincidente con nuestra experiencia previa (López Navarrete, 2000), nuestros resultados mostraron un exceso de riesgo de criptorquidia e hipospadias para la terminación del parto mediante cesárea coincidente con observaciones previas (Hjertkvist *et al.*, 1989, Berkowitz *et al.*, 1995) que sin embargo desapareció una vez que se ajustó por edad madre en el parto y peso neonato; en cuanto a la presentación fetal de nalgas, que ha sido descrita como factor de riesgo de criptorquidia (Swerdlow *et al.*, 1983, Depue *et al.*, 1984), no se encontró ninguna asociación; en los partos de nalgas se produce un daño mecánico de los testículos y un compromiso de la circulación escrotal y además son más comunes entre los niños con bajo peso al nacer o corta edad gestacional.

La información epidemiológica disponible sobre la asociación entre exposición a sustancias químicas, contaminantes medioambientales capaces de alterar el balance hormonal y su efecto sobre salud humana, no es muy abundante y rara vez emana de trabajos desarrollados con este objetivo concreto. En muchas ocasiones se trata de derivaciones y aproximaciones a través de las cuales los estudios son planteados para dar respuesta a la contribución de uno o unos pocos contaminantes

medioambientales, generalmente pesticidas de uso agrícola, o actividades profesionales ligadas a una presumible mayor exposición química, sobre el riesgo de enfermedad. Una de las grandes dificultades de este tipo de trabajos es la caracterización de la exposición, que se ha hecho de formas muy variadas que van desde la cuantificación de algún residuo particular en una muestra biológica, a la encuesta epidemiológica y el cuestionario orientado en el que se trata de tipificar exposición y momento en que ha ocurrido.

En el caso particular de la exposición a estrógenos ambientales el debate se ha convertido, en la última década, en un problema que ha llegado a la esfera clínica. Según Richard Sharpe y Niels Skakkebaek ([Sharpe 1993\(b\)](#)) las vías de exposición estrogénica en la especie humana se han modificado sustancialmente en el último medio siglo: por una parte, los estrógenos endógenos se han incrementado a través del aumento de grasa corporal y por el consumo de una dieta baja en fibra -que estimula la reabsorción enterohepática de los estrógenos endógenos excretados por la bilis- y rica en grasas -especialmente animales, proteínas y carbohidratos refinados, que también alteran la excreción y metabolismo de los estrógenos endógenos-; además, también se ha incrementado en los últimos años el consumo de fitoestrógenos; por otra parte, se han introducido estrógenos sintéticos -como los anabolizantes del ganado, oralmente activos y resistentes a la degradación-, así como ACO -cuyo empleo ha aumentado en los últimos 20-40 años e incluso se han detectado en agua de bebida, compuestos con una alta potencia si son ingeridos- y, finalmente, contamos con todo un conjunto de sustancias químicas medioambientales estrogénicas, entre las que se encuentran los pesticidas, muy potentes en el feto y neonato, resistentes a la degradación y que están presentes en nuestra cadena alimenticia y se acumulan en nuestros organismos ([Olea et al., 2001](#); [Olea et al., 2003](#)).

En el presente trabajo se ha hecho un esfuerzo importante para caracterizar la exposición del neonato, atendiendo tanto a las variables que condicionan la exposición de la madre como del padre y haciendo un énfasis especial a la exposición efectiva durante la gestación. Por esta razón, la obtención de medidas objetivas de cuantificación química y de actividades hormonales en placenta es un pilar fundamental del diseño del trabajo. Sin embargo no se ha desdeñado el estudio del papel de la exposición durante la vida de la madre y el padre antes de la concepción del individuo motivo de este trabajo, abordando el rol de exposición con una doble aproximación: la encuesta epidemiológica con un amplio cuestionario y la medida de exposición a un grupo selecto de compuestos químicos de carácter lipofílico y acumulable.

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 limitarle, en definitiva, las posibilidades de obtención de información (Burnum, 1989). En este trabajo se ha hecho especial hincapié en que estos problemas no ocurrieran. Una vez que las encuestas fueron revisadas y traducidas a cuestionarios en inglés, están siendo tratadas de forma conjunta en el marco del estudio epidemiológico europeo que ampara este trabajo. En lo que respecta a la información recogida en la historia clínica referente a las variables consideradas en nuestro estudio, factores asociados a criptorquidia e hipospadias como el peso al nacer, la edad gestacional, el orden de nacimiento, la existencia de parto múltiple o el parto por cesárea, los registros fueron más que aceptables ya que los médicos encargados de la exploración clínica eran partícipes en el estudio. Lo mismo ocurrió para otras variables de interés en esta investigación como la ganancia ponderal de la madre durante la gestación, el consumo de fármacos durante el embarazo (específicamente tipo y duración de cada uno de ellos) que fue recogida cuidadosamente por los encuestadores y los pediatras.

De las variables mencionadas, relativas a las características de la madre, se consideró el índice de masa corporal (IMC) para valorar su repercusión en la aparición de criptorquidia (índices elevados se corresponderían con niveles de estrógenos también elevados y por lo tanto con mayor riesgo de esta patología), encontrándose que efectivamente situaciones de una relación peso/talla superiores al valor medio pudieran significar un mayor riesgo de enfermedad en el neonato (OR= 1.84, IC95% 0.84-4.06). Pero más interesante ha resultado el valor de la variación ponderal de las madres durante el embarazo ya que cuando el incremento de peso es inferior a los 12kg se observa un riesgo mayor de criptorquidia/hipospadias (OR= 0,53; IC 95% 0,26-1,06) que se confirma cuando se compara los valores medios de incremento en madres que han tenido hijos con malformación (11,33kg) y madres de individuos del grupo control (13,95kg).

El consumo de anticonceptivos previos al embarazo o inadvertidamente en los primeros meses del mismo, ha sido relativamente poco evaluado en relación al riesgo de presentación de criptorquidia e hipospadias. Depue y colaboradores no encontraron incremento del riesgo de criptorquidia en las madres que tomaron ACO en los primeros dos meses del embarazo (Depue *et al.*,1984). En nuestro estudio la asociación no fue significativa, no encontrándose mayor riesgo en aquellas madres que los habían consumido, situación que no llegó a alcanzar la significación estadística

a diferencia de los indicios de significación de trabajos previos ([López Navarrete, 2000](#)).

El carácter rural o urbano de la zona de residencia de la madre antes del parto fue una de las variables que se analizó con mayor interés en el estudio: dado que la exposición a pesticidas sería mucho mayor en los municipios rurales, en los que se desarrolla una importante actividad agrícola, debería existir, por tanto, una asociación con la frecuencia de presentación de criptorquidias e hipospadias. Los resultados de este trabajo no han podido confirmar esta hipótesis. Lo cierto es que la asignación del carácter de rural o urbano a un municipio tan solo considerando el número de sus habitantes puede ser tan ingenua como imprecisa. Por esta razón, se ha prestado mayor atención a la profesión de los padres, a la exposición laboral y a la exposición percibida.

En cuanto al trabajo de la madre y/o padre del correspondiente caso o control en la agricultura, García y colaboradores ([García et al., 1999](#)) asociaron, como ya se ha comentado, la exposición agrícola de las madres durante el mes previo a la concepción y los tres primeros meses de embarazo con un mayor riesgo de malformaciones congénitas en los recién nacidos. Por otra parte, Weidner y colaboradores ([Weidner et al., 1998](#)) describieron un mayor riesgo de criptorquidia en hijos de madres que trabajaban en tareas agrícolas y jardinería, incluido el trabajo en invernaderos, pero estas ocupaciones no presentaban efecto en el riesgo de hipospadias. De manera similar, Kristensen y colaboradores también observaron un exceso de riesgo de aparición de malformaciones congénitas, entre las que se incluían la criptorquidia y el hipospadias, en hijos de padres profesionalmente expuestos a pesticidas en labores agrícolas ([Kristensen et al., 1997](#)). En nuestro estudio la dedicación de la madre a la actividad agrícola se comportó como un factor de riesgo (OR= 3,47; IC 95% 1,33-9,03; p= 0,011) aunque en el análisis de regresión logístico condicional no se alcanzó la significación estadística (OR cruda = 1,86, IC95%0,58-5,99). Esta situación se confirmó al investigar la actividad laboral del padre, ya que en el análisis de la exposición en función de la actividad profesional, la estratificación en baja, media y alta exposición química demostró que el riesgo de malformación es mayor cuanto mayor es la exposición profesional de los padres (OR 2.98, IC95% 1.11-8.01).

La sospecha de una asociación entre actividad laboral, exposición química y trabajos con uso de compuestos químicos nos obliga a estudiar en profundidad la exposición prenatal del niño a pesticidas a través de la placenta, ya sea procedentes de los que la madre ha acumulado durante su vida, ya sea por exposición directa en el curso del embarazo. En este trabajo se tuvo ocasión de cuantificar la exposición a un

grupo importante de pesticidas organoclorados de uso actual, de uso prohibido o restringido, caracterizados entre otras cualidades comunes, por bioacumularse en el tejido adiposo. Se estableció *a priori* una lista de compuestos químicos cuya actividad hormonal había sido probada tanto en modelos animales como en ensayos *in vitro*. No se disponía, no obstante, en el momento de planteamiento del trabajo, de información sobre exposición, absorción, excreción y acumulación de algunos de los productos reseñados. Si bien la bibliografía podía orientar sobre la biodisponibilidad de DDT y sus metabolitos, no era este el caso del endosulfán, congéneres y sus derivados, que tan solo ahora empieza a conocerse (Cerrillo *et al.*, 2004). Por otra parte, se eligió estudiar la exposición mediante la cuantificación de los pesticidas organoclorados en tejido placentario bajo la premisa conceptual de que este tejido es indicativo de los niveles circulantes en la madre y por tanto puede proporcionar información sobre la exposición del feto. Además, se utilizó el tejido placentario, por ser este un tejido muestral abundante y de fácil recolección. Tras un estudio piloto previo se definieron las condiciones óptimas de muestreo entre las que se incluyen la toma de tejido de las caras materna y fetal de la placenta y de los extremos y la zona central.

Nuestros resultados mostraron un exceso significativo en el riesgo de aparición de criptorquidia y otra patología relacionada en niños, en relación con la presencia de cinco de los pesticidas cuantificados en su tejido placentario. Tanto el o,p' DDT como el p,p' DDT fueron, dentro del grupo de los DDTs, mas frecuentemente encontrados en las placentas de niños criptorquídicos (64% y 50%, respectivamente) que en las placentas de los niños sanos (44 y 27%, respectivamente). Lo mismo ocurrió para la frecuencia de presentación de endosulfán alfa, lindano y mirex. Los ORs alcanzaron valores llamativamente importantes, situándose por encima de dos, en todos los casos y llegando al 9.48 (IC95% 2,43-36,96) en el caso del lindano en la regresión logística condicional. Este compuesto se encontró por encima de los límites de detección en 81% de los casos y en 50% de los controles.

Cuando en lugar de la frecuencia, el análisis de los datos se centró en las concentraciones alcanzadas por cada pesticida en los niños afectados de la malformación y en sus controles apareados, se observó que para muchos de los pesticidas las concentraciones medias eran superiores en las placentas de los individuos considerados casos (DDE, endosulfán lactona, endosulfán beta, endosulfán sulfato, suma de endosulfanes, dieldrín y lindano) que en las placentas colectadas en los controles. No obstante la significación estadística se alcanzó tan solo en el caso de estos dos últimos, dieldrín y lindano, con concentraciones medias de dieldrín de 1,19 y 0,33 ng/g de placenta para casos y controles, respectivamente y con concentraciones de lindano de 0,72 y 0,36 ng/g de placenta para casos y controles respectivamente.

Además, cuando se consideró conjuntamente la exposición a cualquier tipo de pesticida, se apreció una diferencia estadísticamente significativa entre el número de residuos cuantificados en las placentas de los individuos con criptorquidia e hipospadias y aquellos sin la malformación congénita, de tal manera que frente a una media de 6.97 residuos en las placentas control, se alcanza una media de 9.34 en las placentas de los niños con criptorquidia. Estos resultados son llamativos y vienen a confirmar observaciones previas de nuestro grupo que si bien no encontraron asociaciones significativas entre exposición estimada en el tejido adiposo de los niños en el momento de la orquidopexia, si que supieron identificar el riesgo de la mayor frecuencia de exposición cuando se consideró el número de residuos encontrados en casa individuo (López Navarrete, 2000).

No existen otros estudios publicados en la literatura científica que hayan analizado esta asociación mediante la cuantificación de pesticidas en muestras de tejido placentario, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados. No obstante, estos datos sugieren que la hipótesis endocrina que establece un mayor riesgo de alteraciones del aparato génito-urinario del varón como consecuencia de la exposición a pesticidas disruptores endocrinos durante etapas tempranas del desarrollo es biológicamente plausible, y se ajusta con cierto grado de presunción a las observaciones experimentales.

Los pesticidas organoclorados seleccionados para estudio están clasificados como agonistas estrogénicos totales, caso del o-p' DDT, o agonistas estrogénicos parciales en el resto de los casos, con una eficacia estrogénica con respecto a estradiol muy variable. Así por ejemplo, el lindano presenta un valor de eficacia estrogénica que apenas si alcanza al 30% de la atribuida al estrógeno natural, mientras que la eficacia del endosulfán supera el 65%. La potencia proliferativa en los ensayos *in vitro*, ha servido también para ordenarlos en función de la concentración mínima a la que desencadenan un efecto estrogénico. Siguiendo esta metodología son o,p'-DDD, p,p'-DDT, metoxicloro y endosulfán los pesticidas organoclorados más potentes. Sólo mirex, endosulfán sulfato y endosulfán lactona son inactivos en los ensayos de estrogenicidad, aunque el primero se ha encontrado asociado a una mayor frecuencia de enfermedades de carácter hormonal (Moysich *et al.*, 1998). Además del efecto agonista estrogénico, se hace necesario recordar que ha sido igualmente descrita la interferencia con el sistema androgénico para algunos de los pesticidas considerados aquí, como es el caso del p,p'-DDE (Kelce *et al.*, 1995), que, junto al fungicida vinclozolina y al herbicida linurón, engrosan actualmente la lista de los antagonistas androgénicos.

Además, muchos de los compuestos incluidos en el presente trabajo, aun estando regulados en su uso, como es el caso del DDT o del dieldrín, están presentes en el medio en que se desenvuelve el embrión-feto-niño. Otros compuestos tienen un uso restringido, por lo que difícilmente van a acceder al niño a través de productos de consumo diario. Tal es el caso de metoxicloro o lindano. Desgraciadamente, el empleo de estos compuestos en otras aplicaciones distintas a las agrícolas, como los preparados farmacológicos o su uso autorizado para el tratamiento de plantas ornamentales en parques y jardines urbanos, determina que la exposición infantil sea un hecho factible (Olea *et al.*, 1999; Sala *et al.*, 2001). Por último, aun otro grupo de organoclorados bioacumulables ha sido incluidos en el presente trabajo por su empleo, autorizado y frecuente, en las prácticas agrícolas actuales. Este lugar lo ocupa el endosulfán, número uno en ventas en Andalucía y pesticida organoclorado de importante empleo en la agricultura intensiva (Cerrillo *et al.*, 2004).

Tan solo en unas pocas ocasiones se ha abordado el tema de exposición ambiental de forma global, considerando no solo factores concurrentes que pueden condicionarla si no también aproximaciones novedosas en las que la exposición es cuantificada a través de marcadores de carga total de compuestos que actuando a través de mecanismos comunes resultan en un efecto biológico final, consecuencia de la mezcla de elementos y la competencia que se establece entre si y con los compuestos endógenos de similar vía de actuación (Fernández *et al.*, 2004). Los antecedentes de éxito con esta aproximación en cuadros tan complejos como es la etiología de cáncer de mama (Ibarluzea *et al.*, 2004), nos animaron a trasladar esa misma aproximación conceptual a este trabajo en el que exposición medioambiental de los progenitores y su influencia sobre el desarrollo embrionario y fetal es evaluada a través de la frecuencia de malformaciones del tracto genitourinario, visibles en el momento del nacimiento como defectos en el desarrollo peneano y la localización testicular. Debido a que el momento de observación de la patología seleccionada para estudio es el nacimiento y tan solo se ha establecido un seguimiento temprano en este trabajo que lleva hasta los tres meses de vida de los individuos, no es objetivo prioritario la descripción de otras desviaciones de la normalidad de carácter orgánico o funcional que pudieran compartir la misma patogenia o tener un origen causal similar.

Como se ha indicado a lo largo de esta discusión, la medida de exposición ha sido abordada con un interés particular en este trabajo y se ha prestado especial atención a cubrir tanto aspectos generales en los que actividad laboral y momento de la exposición es importante, como aspectos particulares de la exposición que se refieren a compuestos químicos en particular o grupos de sustancias con actividades biológicas comunes. A este respecto el desarrollo por nuestro grupo de las técnicas

cromatográficas preparativas y analíticas que conducen a la estimación de la carga hormonal total efectiva ha sido de gran ayuda (Sonneschein *et al.*,1995; Pazos *et al.*,1998; Rivas *et al.*,2001; Fernández *et al.*,2004;). En este bioensayo se estima de forma cuantitativa la actividad estrogénica y androgénica del conjunto de compuestos químicos bioacumulados en el organismo y se diferencia la estrogénicidad y androgénicidad atribuida al conjunto de contaminantes de aquella actividad hormonal ligada a hormonas esteroideas endógenas. Entre los candidatos elegibles para justificar la actividad hormonal definida en el bioensayo destacan los pesticidas organoclorados que tienen una significación especial por varias razones, entre las que se encuentran el que muchos de ellos —al menos todos los incluidos en este trabajo, son disruptores endocrinos—se trata de compuestos persistentes, lipofílicos y por tanto potencialmente bioacumulables en los tejidos, y han sido en algunos casos, descritos como posibles mutagénicos en determinados modelos por lo que no se descarta un efecto genético particular.

La aplicación del test E-Screen y la estimación de la carga estrogénica total efectiva ha servido para poner de manifiesto como tanto en el análisis de regresión logística condicional ajustado (OR = 2,82 IC95% 1,10-7,24) como no condicional (OR = 2,22 IC95% 0,98-5,00) la estrogénicidad de la fracción cromatográfica correspondiente a los contaminantes medioambientales acumulados en el tejido placentario es un factor de riesgo para criptorquidia e hipospadias. De esta manera, frente a un 71% de estrogénicidad detectable en los extractos de placentas en los casos, se presentan tan solo un 55% de placentas de los controles con niveles detectables de estrogénicidad.

No ocurre lo mismo para la estrogénicidad de la fracción beta, aquella en la que se recogen junto a los estrógenos endógenos algunos xenoestrógenos más polares. A pesar de que los valores medios son ligeramente diferentes en casos y en controles (2,93 y 2,62 pM Ee/g de placenta, respectivamente) no se alcanza la significación estadística en el estudio cuantitativo ni cualitativo.

Hasta la fecha, ningún estudio epidemiológico había analizado la asociación entre exposición a pesticidas y riesgo de criptorquidia e hipospadias, utilizando como indicador de dicha exposición la medida de la actividad biológica (estrogénicidad). Los estudios que han intentado probar la asociación entre la exposición a pesticidas organoclorados y otras patologías hormonodependientes, como el cáncer de mama, se habían ceñido a estudiar sólo algunos compuestos organoclorados. Los resultados han sido conflictivos, con unos trabajos apoyando la hipótesis según la cual existe una relación significativa entre la presencia de pesticidas organoclorados en tejido adiposo, suero o leche y el riesgo de presentación de cáncer de mama (Hoyer *et al.*,1998;

Blackwood *et al.*,1998; Ibarluzea *et al.*, 2004) y otros que no pudieron demostrarla (López-Carrillo *et al.*,1997, Dorgan *et al.*,1999, Zheng *et al.*,1999). No obstante, las conclusiones de estos trabajos han resaltado la alta exposición existente entre la población general, con individuos que alcanzan niveles de pesticidas considerables y un número de residuos nada despreciable. Esos trabajos y estudios como el que aquí se presenta orienta sobre la necesidad de cambiar la forma de medida de exposición y sugieren que el empleo de biomarcadores de exposición y efecto como la estimación de la carga estrogénica total efectiva, podría arrojar más luz sobre la hipótesis de estudio y ayudaría a entender mejor la etiología de estas enfermedades.

6. Conclusiones

Este trabajo describe un estudio epidemiológico de base hospitalaria de casos incidentes de criptorquidia y/o hipospadias y controles con objeto de investigar la relación entre los factores de exposición química ambiental y el desarrollo de la malformación del tracto genitourinario. A la luz de los datos obtenidos, de la discusión de los mismos y de la bibliografía consultada, se han derivado las siguientes conclusiones:

1. La totalidad de la población de estudio presentó niveles detectables de algún pesticida organoclorado en el tejido placentario. Los pesticidas más frecuentemente identificados fueron los derivados del DDT y del endosulfán, seguidos del grupo aldrin/endrin/dieldrin, hexaclorobenceno y lindano. El bajo contenido graso de la placenta recomienda expresar los resultados de concentración del residuo de pesticida por gramo de tejido placentario y efectuar las correlaciones necesarias para aquellos residuos más lipofílicos.

2. Ocho de cada diez placentas analizadas en cuanto a la actividad estrogénica del extracto tisular, estimada en el bioensayo de células de cáncer de mama E-Screen, resultaron dar una señal proliferativa que se situó en torno a un valor medio de 1,82 y 2,04 pM equivalentes de estradiol/g de tejido (medianas 0,12 y 0,24pM Eeq/g de tejido) para las fracciones cromatográficas que contienen organohalogenados medioambientales y estrógenos endógenos, respectivamente.
3. Los factores asociados con la frecuencia de aparición de criptorquidias y/o hipospadias pueden resumirse de la siguiente manera:
 - 3.1. Con respecto a las características demográficas, la mayor edad materna en el momento del parto es un factor protector frente al riesgo de presentación de las patologías consideradas.
 - 3.2. En relación con los factores relacionados con el embarazo, parto y periodo posnatal, los resultados del presente estudio confirman la asociación existente entre las patologías investigadas y la menor ganancia de peso durante el embarazo, los antecedentes de abortos previos a la gestación de estudio, una menor edad gestacional, un bajo peso al nacer y la menor talla y, por último, la coexistencia de otras patologías asociadas al niño.
 - 3.3. La actividad laboral agrícola de la madre y la exposición profesional paterna a sustancias químicas se asocian a una mayor frecuencia de presentación de la misma en los niños estudiados.
 - 3.4. La exposición embrionaria o fetal a compuestos organoclorados estimada mediante la medida de residuo químico en la placenta se asocia con un mayor riesgo de padecer la enfermedad de estudio para la presentación de un mayor número de residuos químicos identificados y se atribuye a la presencia de los pesticidas o,p' DDT, p,p' DDT, endosulfán I, lindano y mirex. No obstante esta asociación tan solo mantiene su significación estadística para el lindano cuando se comparan los valores medios en caso y controles.

- 3.5. En el presente estudio se evidencia, además, un exceso significativo en el riesgo de aparición de criptorquidia y/o hipospadias, en relación con la positividad del bioensayo E-Screen en la estimación de la carga estrogénica total efectiva de la fracción cromatográfica en la que eluyen los organohalogenados, entre los que se encuentran los pesticidas organoclorados previamente mencionados.

4. La exposición química ambiental estimada ya sea a través de la actividad profesional de la madre y el padre, el residuo placentario de pesticidas organoclorados xenoestrogénicos, o la actividad hormonal de carácter xenoestrogénico del extracto placentario, es un factor de riesgo para el desarrollo de malformaciones del tracto genitourinario que cuentan entre las hipótesis de causalidad la exposición intrauterina a los estrógenos. De confirmarse estos hallazgos en futuros estudios, se hace necesario implantar medidas de protección de las madres durante el embarazo que disminuyan la exposición xenoestrogénica del niño. A este respecto TEXB se presenta como un excelente instrumento para la monitorización de la exposición en los recién nacidos.

7. Bibliografía

- Adami IM, Burkhardt E, Möhner M. Testicular cancer in nine northern European countries. *Int. J. Cancer*, 1994; 59: 33-338.
- Ahlborg UG, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, Hsieh CC, Hanberg A, Baron J, Trichopoulos D, Adami HO. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol*. 25: 463-531 (1995).
- Ahlbom A, Norell S. *Fundamentos de Epidemiología*. 3ª ed. Madrid: Siglo veintiuno; 1992
- Akre O, Lipworth L, Cnattingius S, Sparen P, Ekborn A. Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 1999; 10 (4):364-369.
- Alarcón Rodríguez Raquel. *Criptorquidias y xenoestrogenicidad por pesticidas en la provincia de Almería*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. (2004).
- Almstrup K, Fernandez MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebaek NE, Leffers H. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 (8): 743-748.
- Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF. Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environ Health Perspect* 107: 89-108 (1999).
- Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*, 2000; 15: 366-372.

- Aschim EL; Haugen TB, Tretli S, Daltveit AK, Grotmol T. Risk factors for hypospadias in Norwegian boys-association with testicular dysgenesis syndrome?. *Int. J. Androl.* 2004; 27: 213 – 221.
- Auger Ag, Kunstmann JM, Cziglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 year. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 281-285.
- Barakat AO. Assessment of persistent toxic substances in the environment of Egypt. *Environment International*, 2004; 30: 309-322.
- Berkowitz GS, Lapinski RH, Dolgin SE, Gazella JG, Bodian CA, Holzman IR. Prevalence and natural history of cryptorchidism. *Pediatrics* 1993; 44-49.
- Berkowitz GS, Lapinski RH, Godbold JH, Dolgin SE, Holzman IR. Maternal and neonatal risk factors por cryptorchidism. *Epidemiology* 1995; 6 (2): 127-131.
- Biggs ML, Baer A, Critchlow CW. Maternal, Delivery, and prenatal characteristics associated with cryptorchidism: a population- base case-control study among births in Washington state. *Epidemiology.* 2002; 13: 197 – 204.
- Blackwood A, Wolff M, Rundle A, Estabrook A, Schnabel F, Mooney LA et al. Organochlorine compounds (DDE and PCBs) in plasma and breast cyst fluid of women with benign breast disease” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7 (7): 579-583.
- Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek NE, Toppari J. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic conuntries. *The Lancet*, 2004; 363: 1264-1269.
- Botella Orts, B. Pesticidas organoclorados en mujeres afectas de cáncer de mama: Evaluación del efecto estrogénico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1999).
- Botella B, Crespo J, Rivas A, Cerrillo I, Olea-Serrano F, Olea N. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environmental Research.* 2004; 96: 34-40.
- Brotons Oliver, J.A. Análisis químico y biológico (E-Screen) de contaminantes con actividad estrogénica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1995).
- Brucker-Davis F, Pointis G, Chevallier D, Fenichel P. Undate on cryptorchidism: endocrine, environmental and therapeutic aspects. *J. Endocrinol. Invest.* 2003; 26: 575-587.
- Bulger, W.H.; Muccitelli, R.M.; Kupfer, K. Studies on the *in vivo* and *in vitro* estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation. *Biochem. Pharmacol.* 1978; 27: 2417-2423.
- Burnum JF. The misinformation era: the fall on the medical record. *Ann Int Med* 1989; 110: 482-484.

- Calzolari E, Contiero MR, Roncarati E, Mattiuz PL, Volpato S. Aetiological factors in hypospadias. *J Med Genet* 1986; 23 (4): 333-337.
- Campbell DM, Webb JA, Hargreave TB. Cryptorchidism in Scotland. *Br Med J* 1987; 295: 1237-1238.
- Campoy C, Jimenez M, Olea-Serrano MF, Moreno-Frias M, Canabate F, Olea N, Bayes R, Molina-Font JA. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum Dev.* 2001; 65: 183-190.
- Campoy C, Olea-Serrano F, Jimenez M, Bayés R, Cañabate F, Rosales MJ, Blanca M, Olea N. Diet and organochlorine contaminants in women of reproductive age under 40 years old. *Early Human Development.* 2001; 65: 173-182. (b)
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidenciefor decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. MED. J.* 1992; 305: 609-613.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ Health Perspect* 1995; 103 (Suppl 7): 137-139.
- Carson R. *Silent Spring.* Houghton Mifflin Company (1962).
- Cerrillo García I. Exposición de la mujer a compuestos tóxicos persistentes y bioacumulables en el sureste peninsular. Universidad de Granada. Tesis Doctoral. (2003).
- Cerrillo I, Granada A, López MJ, Olmos B, Jiménez M, Caño A, Olea N, Olea-Serrano MF. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environmental Research.* In press.
- Chilvers C, Pike MC, Forman D, Fogelman K, Wadsworth MEJ. Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81. *Lancet* 1984; 2 (8398): 330-332.
- Chilvers C, Dudley EN, Gough MH, Jackson MB, Pike MC. Undescended testis: the effect of treatment on subsequent risk of subfertility an malignancy. *J Pediatr Surg* 1986; 21 (8): 691-699
- Cocco, Pierluigi. On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad. Saúde Pública.* 2002; 18: 379-402.
- Colborn T, Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemical in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101; 378-384.
- COM706. Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. 1999.
- Cortada X, Kousseff BG. Cryptorchidism in mental retardation. *J Urol* 1984; 131: 674-676.

- Cortes D, Thorup J, Frisch M, Moller H, Jacobsen GK; Beck BL. Examination for intratubular germ cell neoplasia at operation for undescended testis in boys. *J Urol* 1994; 151: 722-725.
- Crespo J. Análisis de pesticidas organoclorados en mujeres de Granada y Almería. Evaluación del efecto estrogénico. Universidad de Granada (2001).
- Cummings AM. Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Crit Rev Toxicol.* 27(4):367-79 (1997).
- Czeizel AE. Maternal risk factors for cryptorchidism [letter]. *Epidemiology* 1995; 6 (6):638.
- Depue RH. Maternal and gestational factors affecting the risk of cryptorchidism and inguinal hernia. *Int J Epidemiol* 1984; 311-318.
- Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami HO. Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control.* 8(3):420-43 (1997).
- Dick IP, Blain PG, Williams FM. The percutaneous absorption and skin distribution of lindane in man II. In vitro studies Human Exp. Toxicol. 1997; 16:652-657.
- Dorgan JF, Brock JW, Rothman N, Needham LL, Miller R, Stephenson HE Jr, Schussler N, Taylor PR. Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA). *Cancer Causes Control.* 1999;10: 1-11.
- Falcon M, Oliva j, Osuna E, Barba A, Luna A. HCH and DDT residues in human placentas in Murcia (Spain). *Toxicology*, 2004. 195: 203-208.
- Fernandez-Alba AR, Aguera A, Contreras M, Penuela G, Ferrer I, Barcelo D. Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters. *J Chromatogr.* 1998; 823: 35-47.
- Ferrández L. Enfermedades de la vejiga y la uretra. En: *Tratado de Patología y Clínica Quirúrgicas.* 1ª ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; 1983. 2229-2263.
- Fernandez Cabrera M.F. Significado biológico y análisis de la carga total efectiva. Universidad de Granada. Tesis Doctoral. (2001)
- Fernández, M.F.; Pedraza, V.; Olea, N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer J.* 11: 11-17 (1998).
- Fernández MF, Rivas A, Olea-SerranoF, Cerrillo I, Molina-Molina JM, Araque P, Martínez-Vidal JL, Olea N. Assessment of total effective xenoestrogen burden

- in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal Bioanal. Chem.* 2004; 379: 163-170.
- Fisch H, Goluboff ET, Olson JH. Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996; 65: 1009-1014.
 - Flores-Luévano S, Farías P, Hernandez M, Romano-Riquer P, Weber JP, Dewailly E, Cuevas-Alpuche J, Romieu I. Concentraciones de DDT/DDE y riesgo de hipospadias. Un estudio piloto de casos y controles. *Salud pública de México*, 2003; 45: 431-438.
 - Gammon MD, Neugut AI, Santella RM, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Eng SM, Wolff MS, Stellman SD, Kabat GC, Levin B, Bradlow HL, Hatch M, Beyea J, Camann D, Trent M, Senie RT, Garbowski GC, Maffeo C, Montalvan P, Berkowitz GS, Kemeny M, Citron M, Schnabe F, Schuss A, Hajdu S, Vinciguerra V, Collman GW, Oubram GI. The Long Island Breast Cancer Study Project: description of a multi-institutional collaboration to identify environmental risk factors for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;74: 235-54.
 - Garat JM. Malformaciones del aparato urogenital. Malformaciones uretrales. En: *Urología Pediátrica*. N° edic. Barcelona: Salvat; 1987. p. 313-341.
 - Garat JM. Malformaciones del aparato urogenital. Malformaciones genitales. En: *Urología Pediátrica*. N° edic. Barcelona: Salvat; 1987(b). p. 380-396.
 - García AM, Fletcher T, Benavides FG, Orts E. Parental agricultural work and selected congenital malformations. *Am J Epidemiol* 1999; 149 (1): 64-74.
 - García-Rodríguez J, García-Martín M, Noguerras-Ocaña M, Luna-del-Castillo JD, Espigares M, Lardelli P. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 1996; 104(10): 1090-1095.
 - García AM, Fletcher T, Benavides FG, Orts E. Parental agricultural work and selected congenital malformations. *American Journal of Epidemiology.* 1999; 149: 64-73.
 - Garrido Frenich A, Martínez Vidal J.L., Moreno Frias M, Olea-Serrano F, Olea N. Quantitative determination of endocrine-disrupting polychlorinated pesticides in human serum using gas chromatography with electron-capture detection and tandem mass spectrometry. *J. Mass spectrometry.* 2000; 35: 967-975.
 - Gill B, Kogan S. Cryptorchidism. Current concepts. *Pediatr Clin North Am* 1997; 44 (5): 1211-1227.
 - Giwercman A, Grindsted J, Hansen B, Jensen OM, Skakkebaek NE. Testicular cancer risk in boys with maldescended testis: a cohort study. *J Urol* 1987; 138: 1214-1216.

- Gorski J, Hou Q. Embryonic estrogen receptors: do they have a physiological function? *Environ Health Perspect* 1995; 103 (Suppl 7): 69-72.
- Grasso M, Buonaguidi A, Lania C, Bergamaschi F, Castelli M, Rigatti. Postpuberal cryptorchidism: review and evaluation of the fertility. *Eur Urol* 1991; 20: 126-128.
- Hadziselimovic F. *Cryptorchidism: management and implications*. Berlin. Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1983.
- Harris CA, Woolridge MW, Hay AWM. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticide residues to breastmilk. *Chemosphere*, 2001; 43: 243-256.
- Hernández F, Serrano R, Miralles MC, Font N. Gas liquid chromatography and enzyme-linked immune sorbent assay in pesticide monitoring of surface water from the Western Mediterranean (Comunidad Valenciana, Sapin) *Cromatographia* 42:151-158 (1996).
- Hernandez F, Pitarch E, Sarrano R, Gaspar JV, Olea N. Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatographic cleanup and gas chromatographic análisis. *J. Anal Toxicol.* 2002; 26: 94- 103.
- Hirvonen-Santti SJ, Rannikko A, Santti H, Savolainen S, Nyberg M, Janne OA, Palvimo JJ. Down-regulation of estrogen receptor beta and transcriptional coregulator SNURF/RNF4 in testicular germ cell cancer. *Eur Urol.* 2003; 44: 742-747.
- Hjertkvist M, Damber JE, Bergh A. Cryptorchidism: a registry based study in Sweden on some factors of possible aetiological importance. *J Epidemiol Community Health* 1989; 43: 324-329.
- Horwitz, K.B.; Koseki, Y.; McGuire, W.L. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer : role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinol.* 103: 1742-1751 (1978).
- Hoyer, AP; Grandjean, P; Jorgensen, T; Brock, JW; Hartving, HB. Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 352: 1816-1820 (1998).
- Hoyer AP, Jorgensen T, Grandjean P. Breast cancer and dieldrin. *Lancet.* 2000 (a); 356:1852-3.
- Hoyer AP, Jorgensen T, Brock JW, Grandjean P. Organochlorine exposure and breast cancer survival. *J Clin Epidemiol.* 2000 (b); 53:323-30.
- Hoyer AP, Jorgensen T, Rank F, Grandjean P. Organochlorine exposures influence on breast cancer risk and survival according to estrogen receptor status: a Danish cohort-nested case-control study. *BMC Cancer.*1:8 (2001).

- Husmann DA, Levy JB. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995; 46: 267-276.
- Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns C. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 1997; 18 (2): 259-280.
- Ibarluzea Jm J, Fernandez MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, Exposito J, Lorenzo M, Torne P, Villalobos M, Pedraza V, Sasco AJ, Olea N. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control*. 2004; 15: 591-600.
- Irvine S, Cawood E, Richardson D. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom : birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Br. Med. J.* 1996 ; 312 : 467- 471.
- Jensen TK, Toppari J, Keiding N, Skakkebaek NE. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem* 1995; 41(12): 1896-1901.
- Jin L, Tran DQ, Ide CF, McLachlan JA, Arnold SF. Several synthetic chemicals inhibit progesterone receptor-mediated transactivation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 139-146 (1997).
- John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Study Group. Cryptorchidism: a prospective study of 7500 consecutive male births, 1984-8. *Arch. Dis. Child*. 1992; 67: 892-899.
- Jones ME, Swerdlow AJ, Griffith M, Goldacre MJ. Prenatal risk factors for cryptorchidism: a record linkage study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1998; 12 (4): 383-396.
- Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod*. 2001;16:1012-9.
- Kaplan GW. Nomenclature of cryptorchidism. *Eur J Pediatr* 1993; 152 (S2): S17-S19.
- Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375(6532):581-5 (1995).
- Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N. Breast cancer and serum organochlorines: A prospective study among white, black and Asian women. *J Natl Cancer Inst* 86: 589-599 (1994).
- Kristensen P, Irgens LM, Andersen A, Bye AS, Sundheim L. Birth defects among offspring of Norwegian farmers. *Epidemiology* 1997; 8 (5): 537-544.

- Kurahashi N, Kishi R. A review of epidemiological studies about the incidence and etiological factors of cryptorchidism-relevance to endocrine-disrupting chemicals. *Nippon Eiseigaku Zasshi*. 2003; 57: 636-644.
- Lazaro R, Herrera A, Conchello MP, Arino AA, Bayarri S, Yague C, Peiro JM. Levels of selected polychlorinated biphenyl congeners in total diet samples from Aragon, Spain. *J Food Prot*. 62:1054-8 (1999).
- Lippman, M.E.; Huff, K.K.; Jakesz, R.; *et al*. Estrogens regulate production of specific growth factors in hormone-dependent human breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 464: 11-16 (1986).
- Long GL, Winefordner JD. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 55: 712-724 (1983).
- Longnecker MP, Rogan WJ, Lucier G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (Polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu Rev Public Health* 1997; 18: 211-244.
- Longnecker, M.P.; Klebanoff, M.A.; Gladen, B.C.; Berendes, H.W. Serial levels of serum organochlorines during pregnancy and postpartum. *Arch. Environ. Health*, 1999; 54(2): 110-114.
- Longnecker P, Klebanoff MA, Zhou H, Brock J. Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *The Lancet*. 2001; 358: 110-114.
- Longnecker M, Klebanoff M, Brock J, Zhou H, Gray K, Needham L, Wilcox A. Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias and polythelia among male offspring. *American Journal of Epidemiology*. 2002; 155: 313-322.
- López Navarrete, E. Exposición a xenobióticos estrogénicos y alteraciones congénitas de la anatomía del aparato genital masculino. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. (2000).
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11162-11166.
- MacDougall D, Amore FJ, Cox GV, Crosby DG. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem* 52: 2242-2249 (1980).
- Mamoulakis Ch, Antypas S, Stamatiadou A, Demetriadis D, Kanakas N, Loutradis D, Miyagawa I, Yannakis D, Kaponis A, Tzonou A, Giannakopoulos X, Sofikitis N. Cryptorchidism: seasonal variations in Greece do not support the theory of light. *Andrologia*. 2002;34: 194-203.

- Martinetti M, Maghnie M, Salvaneschi L, Di Ninno N, Daielli C, Palladini G, Cuccia M. Immunogenetic and hormonal study of cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 39-42.
- Martinez Vidal JL, Moreno Frías M, Garrido Frenich A, Olea-Serrano F, Olea N. Trace determination of α - and β -endosulfan and three metabolites in human serum by gas chromatography electron capture detection and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; 14: 939-946.
- Mau G. Progestins during pregnancy and hypospadias. *Teratology.* 1981;24:285.
- Miller, W.R.; Sharpe, R.M. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related cancer* 5:69-96 (1998).
- Molina Carrasco C. Residuos de insecticidas organoclorados en tejidos grasos de la población no expuesta de la región de Murcia. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. (1994).
- Molina Molina JM. Actividad biológica de contaminantes ambientales y separación de componentes hormonalmente activos en mezclas complejas. Universidad de Granada. Tesis Doctoral. (2003)
- Moller H. Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected?. *APMIS*, 1998; 106: 232-239.
- Møller H, Weidner IS. Epidemiology of cryptorchidism and hypospadias. (Editorial). *Epidemiology* 1999; 10 (4): 352-354.
- Moreno Frias M, Garrido Frenich A, Martinez Vidal JL, Mateu Sánchez M, Olea F, Olea N. Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatography B.* 2001; 760: 1-15.
- Moreno Frias M, Jimenez Torres M, Garrido Frenich A, Martinez Vidal JL, Olea-Serrano F, Olea N. Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.* 2004; 18: 102- 111.
- Morgan DP, Roan CC. Absorption, storage, and metabolic conversion of ingested DDT and DDT metabolites in man. *Arch Environ Health.* 1971; 22: 301-8.
- Morley R, Lucas A. Undescended testes in low birthweight infants. *Br Med J* 1987; 295: 753.
- Moysich KB, Ambrosone CB, Vena JE, Shield PG, Mendola P, Kostyniak P et al. Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7 (3): 181-188.
- Nef S and Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. *Nat. Genet.* 2000; 22: 295-299.

- Newbold RR, McLachlan JA. Diethylstilbestrol associated defects in murine genital tract development. In McLachlan JA (ed), Estrogens in the Environment, II: Influences on Development. Elsevier, New York. 228-313. 1985.
- Newbold RR. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. Toxicology and Applied pharmacology, 2004; 199: 142-150.
- Okond`Ahoka O, Lavaur E, Le Sech J, Phu Lich N, Le Moan G. Etude de l'impregnation humaine par les pesticides organo-halogeneus au Zaire. Ann Fals Exp Chim 77 :531-540 (1984).
- Olea N, Olea-Serrano MF. Oestrogens and the environment. Eur J Cancer Prevention 1996; 5: 491-496.
- Olea N.; Pazos P.; Expósito, J. Inadvertent exposure to xenoestrogens. Eur. J. Cancer Preven, 1998; 7: 17-23.
- Olea N, Olea-Serrano F, Lardelli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. Toxicol Ind Health 1999; 15: 151-158.
- Olea, N.; Pazos, P.; Fernández M.F.; Rivas, A.; Olea-Serrano, M.F.; Pedraza, V. Phyto and mycoestrogens (Xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. Med. Biol. Environ. Int. J, 1999; 27(1): 55-60.
- Olea N, Zuluaga A. Exposición infantil a disruptores endocrinos. An. Esp. Pediat. 2001; 54: 58-62.
- Olea N, Fernández MF, Araque P, Olea-Serrano F. Perspectivas en disrupción endocrina. Gaceta Sanitaria. 2002; 16: 250-256.
- Olea N, Fernandez MF, Rivas A, Olea-Serrano F. Estrogenicity of surfactants. Análisis and fate of surfactants in the acuatic environment. 2003. 887- 911.
- Ousterhout J, Struck RF, Nelson JA. Estrogenic activities on methoxychlor metabolites. Biochem Pharmacol. 1981; 30:2869-2871.
- Palmer J. The undescended testicle. Endocrinol Clin North Am 1991; 20: 231-240.
- Parron T, Hernandez AF, Pla A, Villanueva E. Clinical and biochemical changes in greenhouse sprayers chronically exposed to pesticides. Hum Exp Toxicol. 15:957-63 (1996).
- Paulozzi L, Erickson JD, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. Pediatrics, 1997; 100: 831-834.
- Paulozzi L. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. Environ Health Perspect 1999; 107 (4): 297-302.

- Paulozzi LJ, Erickson D, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 1997; 100(5): 831-834.
- Pazos, P.; Olea-Serrano, M.F.; Zuluaga, A.; Olea, N. Endocrine Disrupting Chemicals: Xenoestrogens. *Med. Biol. Environ Int. J.* 1998; 26: 41-47.
- Penuela GA, Barcelo D. Application of C18 disks followed by gas chromatography techniques to degradation kinetics, stability and monitoring of endosulfan in water. *J Chromatogr A.* 1998;795:93-104.
- Pérez Gómez, P. Identificación y caracterización de productos químicos con actividad estrogénica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1996).
- Pérez, P.; Pulgar, R.; Olea-Serrano, M.F.; Villalobos M.; Rivas, A.; Metzler, M.; Pedraza V.; Olea, N. The estrogenicity of bisphenol-A related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect*, 1998; 106: 167-174.
- Pinczowski D, McLaughlin JK, Läckgren G, Adami HO, Persson I. Occurrence of testicular cancer in patients operated for cryptorchidism and inguinal hernia. *J Urol* 1991; 146: 1291-1294.
- Polder A, Odland JO, Tkachev A, Foreid S, Savinova TN, Skaare JU. Geographic variation of chlorinated pesticides, toxaphenes and PCBs in human milk from sub-arctic and arctic locations in Russia. *The Science of the total Environment*, 2003; 306:179-195.
- Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, Sunyer J, Ribas-Fitó N. Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población española: el rompecabezas sin piezas y la protección de la salud pública. *Gaceta Sanitaria.* 2002; 16: 257-266.
- Pulgar, R.; Olea-Serrano, M.F.; Novillo-Fertrell, A.; Rivas, A.; Pérez, P.; Olea, N. Determination of bisphenol-A and oligomers in dental epoxy resins by high performance liquid chromatography. *Environ. Health Perspect*, 2000; 108(1): 21-27.
- Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. Testicular tumors with endocrine manifestations. In De Groot, L.J. and Jamenson J.L. (eds). *Endocrinology*, 4th edn. Saunders, Philadelphia, chapter 175. 2000.
- Revert L. Enfermedades de las vías urinarias. E: *Medicina Interna*. 11ª ed. Barcelona: Ediciones Doyma; 1988. p. 936-941.
- Rivas A, Olea N, Olea-Serrano MF: Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *TRAC* 1997; 16: 613-619.
- Rivas, A.; Olea, N.; Olea-Serrano, M.F. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *Trends Analytical. Res.* 1997; 16: 613-619.

- Rivas A. Análisis de sustancias estrogénicas en tejido adiposo: Marcadores de exposición en cáncer de mama. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1999).
- Rivas, A.; Fernández M.F.; Cerrillo, I.; Ibarluzea, J.; Olea-Serrano, M.F.; Pedraza, V.; Olea, N. Human exposure to endocrine disrupters: Standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS*, 2001; 109:1-13.
- Rivas-Fitó N, Cardo E, Sala M, De Muga E, Mazón C, Verdú A, Kogevinas M, Grimalt JO, Sunyer J. Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics*. 2003; 111: 580-585.
- Rueda-Domingo MT, Lopez Navarrete E, Nogueras-Ocaña M, Lardelli-Claret P. Factores de riesgo de criptorquidia. *Gaceta Sanitaria*. 2001 ; 15 : 398 – 405.
- Sala M, Ribas-Fitó N, Cardo E, De Muga ME, Marco E, Mazón C, Verdú A, Grimalt JO, Sunyer J. Levels of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds in cord blood: exposure across placenta. *Chemosphere*. 2001; 43: 895 – 901.
- Scorer CG. The descent of the testis. *Arch Dis Childh* 1964; 39: 605-609.
- Seba DB, Snedaker SC. Frequency of occurrence of organochlorine pesticides in sea surface slicks in Atlantic and Pacific coastal water. 1995; 4: 27-32.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993(b); 341: 1392-1395.
- Sharpe RM. Declining sperm counts in men – is there an endocrine cause? *J Endocrinol* 1993;136: 357-360.
- Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspec*. 1995; 103:1136-43.
- Siddiqui MKL, Srivastava S, Srivastava SP ; Mhrotra PK, Mathur N, Tandon I. Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation : a possible association. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 2003 ; 76 : 75-80.
- Silver RI, Rodriguez R, Chang TS, Gearhart JP. In vitro fertilization is associated with increased risk of hypospadias. *J Urol* 1999 Jun; 161 (6): 1954-1957.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 2001; 5:972.-978.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takanashi H, Cohen RM, Specker B et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331: 1056-1061.

- Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Fernández, M.F.; Olea, N.; Olea-Serrano, M.F.; Ruiz-López, M.D. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin. Chem.* 41: 1888-1895 (1995).
- Soto, A.M.; Lin, T.M.; Justicia, H.; Silvia, R.M.; Sonnenschein, C. An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection* (Colborn T, Clement CR, eds). Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, pp 295-309 (1992).
- Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen sensitive cells. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 380-383.
- Soto A, Sonnenschein C. Environmental sex hormones mimics and antagonists. *Comments Toxicol* 1996; 5 (4-5): 329-346.
- Soto, A.M.; Sonnenschein, C.; Chung, K.L.; Fernández, M.F.; Olea, N.; Olea Serrano, M.F. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect*, 1995; 103(Suppl 3): 113-122.
- Stellman, S.D.; Djordjevic, M.V.; Muscat, J.E.; Gong, L.; Bernstein, D.; Citron, M.L.; White, A.; Kemeny, M.; Busch, E.; Nafziger, A.N. Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998; 7: 489-496.
- Stoll C, Alembik Y, Roth MP, Dott B. Genetic and environmental factors in hypospadias. *J Med Genet* 1990; 27 (9): 559-63.
- Soule, H.D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M.J. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1400-1413 (1973).
- Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.* 1997; 105: 1228-1232.
- Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, Redmon JB, Wang C, Overstreet JW; Study For Future Families Research Group. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2003 Apr; 111(4):414-20
- Swerdlow AJ, Higgins CD, Pike MC. Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. *Br Med J* 1997; 314:1507.
- Swerdlow AJ, Wood KH, Smith PG. A case-control study of the aetiology of cryptorchidism. *J Epidemiol Commun Health* 1983; 37: 238-244.
- Thies ML, McBee K. Cross-placental transfer of organochlorine pesticides in Mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. *Environmental Contamination and Toxicology*, 1994; 27: 239-242.

- Thorup J, Cortes D. The incidence of maldescended testes in Denmark. *Pediatr Surg Int* 1990; 5: 2-5.
- Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitation of registry-based data. *Human Reproduction Update*. 2001; 7: 282-286.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Ministry of Environment and Energy. Danish Environmental protection Agency. Copenhagen, Denmark. Miljøprojekt nr. 290, pp 1-166. 1995.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104(Suppl. 4): 741-803.
- Tzvetkova P, Tzvetkov D. Etiopathogenesis of cryptorchidism and male infertility. *Arch androl* 1996; 37(2): 117-125.
- Valenzuela Torres, B. Determinación del efecto estrogénico de plaguicidas organoclorados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1996).
- Villalobos, M.; Olea, N.; Brotons, J.A.; Olea-Serrano, M.F.; Ruíz de Almodovar, J.M.; Pedraza, V. The E-Screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.* 103: 844-850 (1995).
- Virtanen HE, Kaleva M, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Main Km, Skakkebaek NE, Toppari J. The birth rate of hypospadias in the Turku area in Finland. *APMIS*. 2001; 109: 96-100.
- Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, Silva CS, Siliceo J. Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud pública de Mexico*, 2000; 42: 384-390.
- Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, Silva CS, Siliceo J. Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz, Mexico. *Environmental Contamination and Toxicology*, 2001; 40: 432-438.
- Wang J, Wang B. Study on risk factors of cryptorchidism. *Zhonghua Liu Xing Za Zhi*. 2002; 23: 190-193.
- Ward EM, Schulte P, Grajewski B, Andersen A, Patterson DG Jr, Turner W, Jellum E, Deddens JA, Friedland J, Roeleveld N, Waters M, Butler MA, DiPietro E, Needham LL. Serum organochlorine levels and breast cancer: a nested case-control study of Norwegian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9: 1357-67
- Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebaek N. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (12): 793-796.

-
- Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebaek N. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol* 1999 May; 161 (5): 1606-1609.
 - Withaker RH. Undescended testis. The need for a standard classification. *Br J Urol* 1992; 70: 1-6.
 - Woodruff, T.; Wolff, M.S.; Davis, D.L.; Hayward, D. Organochlorine exposure estimation in the study of cancer etiology. *Environ. Res*, 1994; 65: 132-144.
 - Zheng T, Holford T, Mayne S, Ward B, Carter D, Owens PH, et al. DDE and DDT in breast adipose tissue and risk of female breast cancer. *Am J Epidemiol* 1999; 150(5): 453-458.