

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A *BISFENOL-A* EN
POBLACIÓN INFANTIL DE LA PROVINCIA DE GRANADA, E
IDENTIFICACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía el Licenciado ANTONIO MIGUEL RUIZ MONTES**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Antonio Miguel Ruiz Montes
D.L.: GR 3075-2010
ISBN: 978-84-693-3286-3

***“Nacer no es solo
comenzar a morir”***

Théophile Gautier (1811-1872)
Poeta y novelista francés

***“La actual legislación en materia química no
protege a la infancia del “ataque” químico
que comienza desde el mismo momento
de la concepción”.***

Catherine N. Doney. Informe para GREENPEACE
(2004)

Diseño de cubiertas:
Gráficas Antonio Miguel

La imagen de portada ha sido tomada de <http://science.howstuffworks.com/bpa2.htm>



DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

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

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Tesis ha sido realizado por el licenciado en Medicina y Cirugía **D. ANTONIO MIGUEL RUIZ MONTES**, en el Laboratorio de Investigaciones Médicas del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina. Y para que conste y surta efectos donde proceda, firmo el presente certificado.

En Granada, Abril de 2010

D. Nicolás Olea Serano

Granada, Abril de 2010

MARIANA FÁTIMA FERNANDEZ CABRERA, Doctora en Ciencia Químicas, Investigadora Ramón y Cajal del Laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada

NICOLÁS OLEA SERRANO, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Medicina Física del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área del Hospital Clínico San Cecilio, y

RICARDO FERNÁNDEZ VALADÉS, Doctor en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada

CERTIFICAN:

Que el Ldo. **ANTONIO MIGUEL RUIZ MONTES** ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral: “EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A BISFENOL-A EN POBLACIÓN INFANTIL EN LA PROVINCIA DE GRANADA, E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS”, que presenta para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Revisada la misma, la encuentran conforme para ser juzgada por el tribunal designado por la Universidad de Granada. Y para que conste y surta efectos donde proceda, firmamos el presente certificado.

Mariana F. Fernández

Nicolás Olea

Ricardo Fernández

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título "EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A BISPHENOL-A EN POBLACIÓN INFANTIL EN LA PROVINCIA DE GRANADA, E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS", ha sido presentada por el **Ldo. ANTONIO MIGUEL RUIZ MONTES** para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, habiendo sido dirigida por **Dña. Mariana Fernández Cabrera**, de la Universidad de Granada, por **D. Nicolás Olea Serrano**, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, y por **D. Ricardo Fernández Valadés**, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" de Granada.

Fdo. ANTONIO MIGUEL RUIZ MONTES

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias a la **Red de Excelencia del VI Programa Marco de la Unión Europea CASCADE: Chemicals as contaminants in the food chain: an NoE for research, risk assessment and education**, nº FOOD-CT-2003-506319; al Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública **CIBERESP** nº: CB/06/02/0049; al **Proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias** que lleva por título: Efecto de la exposición materno-infantil vía placentaria a compuestos químicos que interfieren en la actividad desyodasa sobre el desarrollo neuroconductual, **FIS** nº PI070252, y al **Proyecto de la Conserjería de Salud de la Junta de Andalucía nº 202/04**, que lleva por título "EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A XENOESTRÓGENOS EN POBLACIÓN INFANTIL DE LA PROVINCIA DE GRANADA, E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN".

Se agradece, igualmente, la ayuda recibida de la Fundación Hospital Granada.

A Piedad, mi mujer

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

A **Nicolás Olea**, que dirige todo el proyecto, cuya dedicación a la investigación sobre contaminantes ambientales, y el entusiasmo que transmite cuando habla de ello, te enganchan para la causa. Mi aplauso incondicional para la labor que él, y todo su grupo, están realizando.

A **Marieta Fernández**, cuya preparación y capacidad de trabajo admiro, por su ayuda imprescindible y decisiva, y por soportar, de la forma que lo ha hecho, el peso que supone un doctorando añoso. Nunca tuvo hacia mí otra expresión que no fuera la sonrisa. Nadie lo habría hecho mejor.

A ambos, gracias también por su cercanía.

A **Ricardo Fernández**, que me animó a realizar la tesis. Otros lo intentaron, él lo consiguió. Agradezco mucho su ayuda y su apoyo, pero agradezco mucho más su amistad.

A **Juan Pedro Arrebola**, porque aparte del trabajo realizado con las encuestas y la estadística, me ha ayudado más de lo que él se cree.

A **los padres** que dieron su consentimiento para extracción de muestras a sus hijos. No es fácil para ellos, aunque se les explique bien.

A **las enfermeras y auxiliares de la planta y el quirófano del Servicio de Cirugía Pediátrica**, que echaron una mano con la recogida y el procesado inicial de las muestras. Se lo prometí. Incluida Pilar, que nos dejó.

Mi agradecimiento sincero para todos.

INDICE



INDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. Disruptores endocrinos	5
I.1.1. Aproximación histórica. Definición	5
I.1.2. Censo de disruptores endocrinos	10
I.1.3. Biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto	13
I.1.4. Grupos de susceptibilidad específica: la infancia	18
I.2. El Bifenol-A	20
I.3. El Bisfenol A como estrógeno sintético (xenoestrógeno)	22
I.3.1. Identificación de las rutas de exposición a BPA	26
I.3.1.1. Exposición humana a BPA en aire y polvo	29
I.3.1.2. Exposición a BPA desde filtrado de vertederos, aguas superficiales y lixiviación de aguas residuales	29
I.3.1.3. Exposición a BPA procedente del plástico y del papel	31
I.3.1.4. Exposición a BPA desde latas y envases de comida	33
I.3.1.5. Exposición a BPA procedente de productos dentales	35
I.3.2. Estudios sobre exposición humana. Epidemiología	36
I.3.2.1. Población ocupacionalmente expuesta	37
I.3.2.2. Población general	37
I.3.2.3. Población infantil	39
I.3.3. Metabolismo del BPA. Modelos animales	41
I.3.3.1. Digestión y excreción	41
I.4. Medida de la exposición a BPA. Revisión bibliográfica de la literatura reciente	45
I.4.1. Niveles de BPA en tejidos y fluidos humanos	46
I.4.1.1. Suero, sangre y fluidos asociados al embarazo	46
I.4.1.2. Leche materna	51

I.4.1.3. Orina	51
I.4.1.4. Semen y líquido folicular	54
I.4.2. Factores asociados a la exposición a BPA	55
I.4.3 Asociación entre exposición a BPA y enfermedad en humanos.....	56
I.5. Sumario.....	58
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
II.1. Hipótesis.....	66
II.2 Objetivos	67
II.2.1. Objetivo general	67
II.2.2. Objetivos específicos	67
III. MATERIAL Y MÉTODOS	71
III.1. Diseño del estudio epidemiológico	71
III.1.1. Tipo de estudio	71
III.1.2. Población de referencia	71
III.1.3. Población de estudio	72
III.1.4. Tamaño muestral	72
III.1.5. Procedimiento de muestreo	73
III.1.6. Variables de estudio	73
III.1.6.1. Variable dependiente	73
III.1.6.2. Variables independientes	74
III.2 Metodología químico-analítica	76
III.2.1. Obtención y codificación de las muestras de tejido adiposo ...	76
III.2.2 Obtención y codificación de las muestras de sangre	77
III.2.3 Preparación, extracción y derivatización química de las muestras de tejido adiposo	77
III.2.4 Preparación, extracción y derivatización química de las muestras de suero	79
III.2.4.1 Extracción líquido-líquido	79
III.2.4.2 Extracción en fase sólida (SPE)	79
III.2.5 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) para muestras de tejido adiposo	80
III.2.5.1 Método cromatográfico	81
III.2.5.2 Método del patrón interno	82

III.2.5.3 Calibración.....	82
III.2.5.4 Validación del método.....	83
III.2.5.5 Límites de detección y cuantificación.....	83
III.2.5.6 Cuantificación química en muestras de tejido adiposo.....	85
III.2.6 Cromatografía de líquido-espectrometría de masas (LC-MS/MS) para muestras de suero.....	85
III.2.6.1 Método cromatográfico.....	85
III.2.6.2 Calibración.....	87
III.2.6.3 Validación del método.....	88
III.2.6.4 Límites de detección y cuantificación.....	88
III.3 Análisis estadístico de los resultados.....	89
III.3.1 Variables referentes a las características sociodemográficas...	90
III.3.2 Variables referentes a las características antropométricas.....	91
III.3.3 Variables referentes a la historia reproductiva de la madre.....	92
III.3.4 Variables referentes al estilo de vida de los padres.....	92
III.3.5 Variables del análisis químico	93
IV. RESULTADOS	97
IV.1 Participación, características de la población	97
IV.1.1 Participación	97
IV.1.2 Características físicas y demográficas	99
IV.1.2.1. Edad en el momento de la inclusión.....	99
IV.1.2.2 Sexo	100
IV.1.2.3 Índice de masa corporal (IMC).....	101
IV.1.2.4 Localización de la muestra de grasa.....	102
IV.1.2.5 Área de residencia	103
IV.1.3. Características relacionadas con la salud	104
IV.1.3.1. Motivo de la intervención quirúrgica.....	104
IV.1.3.2. Patología previa.....	105
IV.1.3.3 Antecedentes odontológicos.....	106
IV.1.3.4. Consumo de medicamentos	107
IV.1.4. Características de los progenitores	108
IV.1.4.1. Nivel de estudios de los progenitores	108
IV.1.4.2. Actividad laboral de los padres durante el embarazo.....	109
IV.1.4.3. Hábito tabáquico de los progenitores	110

IV.1.4.4. Consumo de alcohol por los progenitores	110
IV.1.4.5. Historia reproductiva de la madre	111
IV.1.5. Características relacionada con la dieta	114
IV.1.5.1. Consumo de agua	115
IV.1.5.2. Consumo de pescado	115
IV.1.5.3. Consumo de carne.....	116
IV.1.5.4. Consumo de fiambres y embutidos	117
IV.1.5.5. Consumo de grasas	118
IV.1.5.6. Consumo de lácteos	119
IV.1.5.7. Consumo de legumbres.....	121
IV.1.5.8. Consumo de verduras	122
IV.1.5.9. Consumo de fruta	123
IV.1.5.10. Consumo de huevos	123
IV.1.5.11. Consumo de cereales.....	124
IV.1.5.12. Consumo de comida enlatada	125
IV.2. Estimación de la exposición a BPA y	
derivados clorados	126
IV.2.1. Estimación de la exposición a BPA y	
derivados clorados en muestras de grasa	126
IV.2.2. Estimación de la exposición a BPA y	
derivados clorados en muestras de suero	128
IV.3 Concentraciones de BPA y relación con	
las variables predictoras de exposición.....	131
IV.3.1 Edad	131
IV.3.2 Género.....	132
IV.3.3 Índice de masa corporal (IMC)	133
IV.3.4 Localización de la muestra de grasa	134
IV.3.5 Área de residencia	135
IV.3.6 Permanencia en la residencia actual	135
IV.3.7 Residencia habitual cercana a industria	136
IV.3.8 Motivo de intervención	136
IV.3.9 Condiciones de salud previas.....	137
IV.3.10 Antecedentes odontológicos: empastes dentales	
y composites.....	139

IV.3.11 Consumo de medicamentos.....	140
IV.3.12 Nivel de estudios de los progenitores.....	141
IV.3.13 Actividad laboral de los progenitores.....	142
IV.3.14 Hábito tabáquico de los progenitores.....	144
IV.3.15 Consumo de alcohol por los progenitores.....	145
IV.3.16 Condición de primogénito del sujeto de estudio.....	146
IV.3.17 Número de embarazos y de hijos.....	147
IV.2.18 Hijos con problemas de salud al nacer	148
IV.3.18.1 Prematuridad (entre los sujetos de estudio).....	149
IV.3.18.2 Abortos previos de la madre del sujeto.....	149
IV.3.18.3 Lactancia materna.....	150
IV.3.19 Tipo de agua consumida de forma habitual	151
IV.3.20 Consumo de pescado	151
IV.3.21 Consumo de carne	153
IV.3.22 Consumo de fiambres o embutidos	153
IV.3.23 Consumo de grasas.....	155
IV.3.24 Consumo de leche	156
IV.3.25 Consumo de queso	157
IV.3.26 Frecuencia de consumo de legumbres.....	158
IV.3.27 Frecuencia de consumo de verduras.....	159
IV.3.28 Frecuencia de consumo de fruta	160
IV.3.29 Frecuencia de consumo de huevos	160
IV.3.30 Frecuencia de consumo de pan	161
IV.3.31 Frecuencia de consumo de pasta	162
IV.3.32 Consumo habitual de comida enlatada	162
IV.3.33 Concentraciones de BPA en tejido adiposo y variables predictoras. Análisis multivariante.....	163
IV.3.34 Concentraciones de BPA en suero y variables predictoras. Análisis multivariante.....	164
IV.4 Concentraciones de derivados clorados de BPA y relación con las variables predictoras de exposición.....	165
IV.4.1 Concentraciones de de BPA monoclorado (BPACI) y variables predictoras. Estudio bivariante.....	166
V.4.1.1 Padecimiento de alteraciones del tracto urinario.....	166

IV.4.1.2 Hábito tabáquico de los progenitores.....	167
IV.4.1.3 Concentraciones de BPA monoclorado (BPACl) en tejido adiposo y variables predictoras. Análisis multivariante.....	168
IV.4.1.4 Concentraciones de Bisfenol-A monoclorado (BPACl) en suero y variables predictoras. Análisis multivariante.....	169
IV.4.2 Concentraciones de BPA diclorado (BPACl ₂) y variables predictoras. Estudio bivariante.....	169
IV.4.2.1 Alteraciones del tracto urinario.....	169
IV.4.2.2 Padecimiento de estreñimiento.....	170
IV.4.2.3 Consumo de alcohol por la madre.....	171
IV.4.2.4 Concentraciones de BPA diclorado (BPACl ₂) en tejido adiposo y variables predictoras. Análisis multivariante.....	171
IV.4.2.5 Concentraciones de BPA diclorado (BPACl ₂) en suero y variables predictoras. Análisis multivariante.....	172
IV.4.3 Concentraciones de BPA triclorado (BPACl ₃) y variables predictoras. Estudio bivariante.....	173
IV.4.3.1 Padecimiento de alteraciones del tracto urinario.....	173
IV.4.3.2 Hábito tabáquico del padre.....	173
IV.4.3.3 Tipo de pescado consumido con más frecuencia.....	174
V. DISCUSIÓN.....	179
VI. CONCLUSIONES.....	205
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	211
VIII. ANEXO.....	247

I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

El problema de la exposición humana a contaminantes ambientales y sus consecuencias sobre la salud, deben ser abordados desde muy diferentes perspectivas. La realización de estudios clínico-epidemiológicos que contribuyan a la evaluación del grado de exposición a estas sustancias, así como la definición de instrumentos para la medida de la exposición y de las variables que permitan clasificar a los pacientes de acuerdo con su grado de impregnación, serían dos vías de aproximación para lograr este objetivo. Según se recoge en uno de los primeros Informes sobre Exposición de la Población General a Sustancias Químicas, elaborado por el Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2001), en Estados Unidos, la monitorización de los niveles de exposición en la población es un requisito imprescindible para la evaluación del riesgo sobre la salud humana. La Unión Europea se ha responsabilizado de esta tarea, estableciendo programas específicos de investigación dentro del 5º, 6º y 7º programa marco de investigación, en los que nuestro grupo de trabajo ha participado y participa activamente. Dentro de este contexto, los trabajos de estimación de la exposición en grupos de población con susceptibilidad particular, ocupan un lugar preferente. No obstante, aún está lejos el acuerdo para establecer un programa europeo de biomonitorización humana similar al programa americano.

Actualmente, prácticamente la totalidad de la población europea presenta concentraciones detectables de algunos compuestos contaminantes ambientales (Porta *et al.*, 2008). La información sobre exposición humana es relativamente reciente, y demuestra que ésta es muy variable en su magnitud, con implicaciones clínicas, sanitarias, ambientales y sociales conocidas sólo

parcialmente (Porta *et al.*, 2002). Estos argumentos, por sí mismos, justifican la implicación de los profesionales, tanto Sanitarios como de la Salud Pública, en su estudio.

La exposición de las personas, los demás organismos vivos y el medio ambiente, se viene produciendo de un modo especialmente claro desde hace unos 60 años, con oscilaciones de gran interés. Tras los aumentos en las concentraciones particulares, observados en muchas poblaciones entre los años cincuenta y setenta, algunos compuestos han tenido descensos importantes en ambas décadas; paradigma de esta situación el caso del plaguicida diclorodifeniltricloroetileno (DDT), y más recientemente, el del plomo. No obstante, existen asimismo compuestos de aparición más reciente, como los polibromodifenil éteres (PBDE), los polibromobifenilos (PBB), o el bisfenol-A, empleados en múltiples bienes de consumo, cuyas concentraciones están aumentando, a juzgar por los programas de biomonitorización establecidos en algunos países (CDC, 2005; Porta *et al.*, 2008).

El elevado número de compuestos químicos, la variedad de sus posibles efectos adversos y la incertidumbre sobre sus consecuencias clínicas, han generado una preocupación razonable en científicos, médicos y ambientalistas, entre otros profesionales, así como en una parte no desdeñable del resto de la sociedad (Porta *et al.*, 2002; Weinhold, 2003; Stokstad, 2004; Porta *et al.*, 2006). En España, la carencia de estudios representativos, en zonas geográficas amplias y bien definidas, que valoren la exposición humana a compuestos químicos ambientales, donde se integren datos de análisis químico junto con datos clínicos, epidemiológicos y ambientales, indujo a nuestro grupo a desarrollar una línea de investigación a este respecto, que ha dado lugar a la publicación de numerosos trabajos y a la realización de un número importante de tesis doctorales. El trabajo que ahora se presenta, se encuadra en este marco de actuación y aborda la exposición a un grupo de estos compuestos, disruptores endocrinos, en un grupo de población de especial susceptibilidad y riesgo: la infancia.

I.1. DISRUPTORES ENDOCRINOS

I.1.1. Aproximación histórica. Definición

El avance iniciado con la Revolución Industrial proporcionó al hombre occidental el desarrollo teórico y los medios tecnológicos necesarios para la fabricación de multitud de compuestos químicos de síntesis, cuya expansión invadió todos los aspectos de su vida cotidiana. En los años 40 se inició la producción masiva de sustancias químicas y consecuentemente su liberación al medio ambiente. En la actualidad se estiman en más de 100.000 las sustancias químicas diferentes registradas en Europa para su uso comercial, y se registran cientos de sustancias nuevas cada año (Goldman, 2002). En 2001, las principales industrias estadounidenses asumieron haber liberado al aire, al agua y en vertederos, cerca de 2.795 millones de kilogramos de sustancias químicas (EPA (USA), 2005), aunque esta cifra probablemente es sólo una parte de lo que realmente se elimina.

El aire, el agua, el suelo y la comida, en definitiva el hombre y su entorno, quedan expuestos a estas sustancias, en todas las etapas de su producción y uso, desde el momento de su fabricación hasta los procesos de distribución, utilización y degradación final. Además, la exposición se produce tanto de forma conocida y programada, como de forma no intencionada, accidental o simplemente inadvertida (Olea *et al.*, 1998).

Ya a comienzos de los años 60, Rachel Carson (Carson, 1962) advertía de la difusión a todo el planeta de algunos compuestos químicos de síntesis, utilizados fundamentalmente como plaguicidas, y del gran impacto de esa exposición sobre el equilibrio de las especies.

Las alteraciones sobre la salud de distintas especies animales (peces, reptiles, pájaros, mamíferos) e incluso del hombre, que han sido evidenciadas tras la exposición a cierto grupo de contaminantes ambientales, incluyen, junto a otras, enfermedades hormono-dependientes entre las que se encuentran:

disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, desmasculinización, feminización y alteraciones del sistema inmune, e incluso aumento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Colborn *et al.*, 1993).

La hipótesis patogénica subyacente explica que algunas de estas sustancias químicas se comportan como hormonas, alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas, a través de mecanismos de acción diversos (Miller y Sharpe, 1998). Aunque cualquier sistema hormonal es susceptible de ser dañado, lo cierto es que los primeros compuestos químicos exógenos o xenobióticos identificados, se comportaban como estrógenos, es decir, interferían con la hormona femenina estradiol, imitando o bloqueando su acción natural. De ahí que la información existente relativa a los xenoestrógenos sea, cualitativa y cuantitativamente, más importante.

En la conferencia "*Estrogens in the Environment I*", celebrada en el Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente americano (NIEHS) en 1979, se verificó la presencia medioambiental de sustancias que se comportaban como hormonas. Se estableció, así mismo, un mecanismo sencillo mediante el cual estos compuestos imitarían a la hormona uniéndose a su receptor, provocando el mismo espectro de efectos biológicos que la hormona natural, o bien antagonizarían el efecto hormonal bloqueando el receptor correspondiente. En ambos casos, el resultado final favorecería una alteración del sistema hormonal con consecuencias difícilmente predecibles. En 1979 no se disponía aún de mucha información acerca de los efectos de estas sustancias sobre la salud humana, por lo que gran parte de las conclusiones fueron puramente especulativas. No fue hasta la siguiente conferencia "*Estrogens in the Environment II*" (NIEHS), celebrada en 1985, cuando se presentaron datos que revelaban el efecto de los xenoestrógenos sobre el desarrollo humano. Se demostró, así mismo, la ubicuidad de estas sustancias en el medio ambiente y

se presentó información sobre la variabilidad de su potencial como hormonas exógenas, tanto agonistas o como antagonistas hormonales (McLachlan, 1993).

En el verano de 1991, un grupo de 21 científicos, representando más de una docena de disciplinas, evaluaron la evidencia hasta entonces existente, sobre la forma en que distintos compuestos químicos podían estar afectando a la reproducción y al desarrollo de los animales, y a la salud humana. Esta conferencia, celebrada en Wingspread (Wisconsin, USA) y organizada por la Dra. Theo Colborn, de la Fundación "World Wildlife", concluyó que *un gran número de sustancias químicas, sintetizadas por el hombre y liberadas al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen efecto sobre el sistema endocrino del hombre y de los animales. Se trata de compuestos persistentes, organohalogenados y bioacumulables, que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), además de compuestos de síntesis y algunos metales.* Incluso se acuñó un nombre para este tipo de compuestos químicos, que son conocidos desde entonces como **disruptores endocrinos** (Colborn y Clement, 1992). En España, este nombre fue aceptado por consenso en la primera Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos celebrada en Granada en 1996.

Con posterioridad a la Conferencia de Wingspread, otras reuniones científicas, como las celebradas en Weybridge (UK) en 1996 y de nuevo en Wingspread en 1997, sirvieron para sentar las bases conceptuales de la disrupción endocrina, definir la forma de aproximación científica más apropiada y concretar la correcta evaluación de la importancia de los disruptores hormonales en la salud humana y de las especies animales.

El término **disruptor endocrino** (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. Además, muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen las características óptimas para haber sido, y ser, empleados en grandes cantidades y con gran libertad, sin especial protección medioambiental.

En los años transcurridos desde la conferencia de Wingspread, la comunidad científica ha comprendido que el problema generado por los disruptores endocrinos sobrepasa nuestra capacidad de prevención. Estos productos químicos se utilizan en preparaciones complejas, es decir, que contienen muchas impurezas, isómeros y congéneres, lo que hace muy difícil el estudio de su metabolismo y seguimiento a través de los ecosistemas. No sólo se ha detectado actividad hormonal en los productos considerados activos (p. ej., los pesticidas), sino también en los productos «inertes», como los agentes dispersantes (p. ej., los etoxilatos de alquilfenoles).

La investigación de los efectos de los disruptores endocrinos ha resultado mucho más compleja de lo que era previsible, y ha desvelado determinados aspectos de la biología del desarrollo hasta ahora desconocidos. Por ejemplo, que estos compuestos son capaces de intervenir, tanto en la morfogénesis mamaria, cuando la mama está aparentemente inactiva, como durante la formación del aparato genital masculino y femenino. En precisamente durante el período en el que ocurre este desarrollo crítico, cuando la exposición a xenohormonas ambientales puede determinar la aparición de efectos irreversibles, generalmente no manifiestados hasta la edad adulta. Aunque sutiles, estos efectos pueden derivar en graves consecuencias para el individuo y para la población general.

Se ha sugerido que los disruptores endocrinos presentan características particulares que los hacen distintos a otros tóxicos medioambientales, y que condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad buscada entre

exposición y enfermedad (Colborn *et al.*, 1993; Ohi, 1999). Esta forma especial de toxicidad (Fernández *et al.*, 1998), podría deberse a que:

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, como los estadios tempranos de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen lesiones irreversibles.
2. Los efectos pueden no aparecer en el momento de la exposición. No necesariamente presentes en el nacimiento, pueden permanecer latentes durante años y evidenciarse en la madurez del individuo, o hacerse patentes en la descendencia en vez de en los individuos expuestos.
3. No existe un umbral de concentración preciso para el desarrollo del efecto toxicológico, y desde luego, 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.

Algunos de los compuestos disruptores endocrinos son bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los contaminantes orgánicos persistentes (COPs), sobre los que sí se han establecido medidas de control adecuadas. Otros parecen no acumularse, pero su presencia como contaminantes en el entorno (agua, aire, alimentos, utensilios) es tan frecuente que la exposición diaria está asegurada. Los disruptores endocrinos alcanzan el organismo humano fundamentalmente a través de una exposición ambiental «de fondo», y posiblemente en dosis bajas en la mayor parte de los casos (Hansen, 1998), aunque a menudo las concentraciones de los agentes químicos son similares a las de las hormonas endógenas. La principal vía de entrada es la dieta, no sólo por el consumo de

productos vegetales contaminados, sobre todo con pesticidas y fitosanitarios, sino por la ingesta de productos de origen animal (concretamente de las partes más grasas de estos alimentos para el caso de los contaminantes liposolubles), y por el agua de bebida, vehículo de multitud de contaminantes. Pero existen otras fuentes que incluyen la cosmética, la farmacología, la detergencia y el campo de los plásticos y las resinas sintéticas. Esta diversidad de fuentes, junto a la gran variedad de compuestos químicos, dificulta extraordinariamente la aplicación de medidas de prevención.

I.1.2. Censo de disruptores endocrinos

Al menos se conocen 13 listas de disruptores endocrinos, realizadas por diferentes administraciones y organizaciones. La lista alemana, junto a la sueca, inglesa, americana, noruega y japonesa, compiten con las producidas por diversas organizaciones no gubernamentales. La Comisión Europea, a demanda de su Parlamento (SACO 100EN, 1998), contrajo el compromiso de elaborar un censo de compuestos químicos disruptores endocrinos. El encargo de la Dirección General de Medioambiente (DG ENV) pasó a las consultoras internacionales BKH y TNO que, finalmente, presentaron en Mayo de 1999 una lista con aproximadamente 560 compuestos químicos para los que se había establecido en publicaciones de carácter científico, su interferencia con algún sistema hormonal en particular. Una vez recibida la aprobación del Comité de Expertos de la DG ENV, la lista fue reajustada tras la aportación, por parte de la industria, de nueva información en dos campos muy particulares: volumen de producción y persistencia medio ambiental. De esta manera, el censo inicial de 560 compuestos químicos quedó reducido a 29, que junto a algunos de sus congéneres, hacen un total de sesenta sustancias. La lista recoge, fundamentalmente plaguicidas organoclorados (DDT, DDE, endosulfán, aldrín, endrín, dieldrín, toxafeno, metoxicloro); PCBs y PBBs empleados ampliamente hasta épocas recientes como aislantes eléctricos y estabilizantes de pinturas y plastificantes; bisfenol-A y sus derivados, presentes en empastes dentales y en el recubrimiento plástico de las latas de conservas; alquiflenoles y ftalatos, utilizados en la fabricación de plásticos, incluido el PVC, entre otros (Soto *et al.*,

1995; Olea *et al.*, 1996). Junto a éstos, los derivados del tributil estaño completan el censo (*Tabla I.1*).

Tabla I.1 *Disruptores endocrinos*

COMPUESTOS	USOS Y VÍAS DE EXPOSICIÓN
DDT y sus metabolitos: <i>o,p'</i> -DDT <i>p,p'</i> -DDT <i>o,p'</i> -DDD <i>p,p'</i> -DDD <i>p,p'</i> -DDE Metoxicloro e hidroximetabolitos	Plaguicidas: DDT fue prohibido en 1972 pero este producto, así como sus metabolitos, aparecen aún hoy en día en sangre y tejidos humanos
Dieldrín	Plaguicida prohibido en U.S.A. en 1974
Clordecona (Kepona)	Plaguicida prohibido en U.S.A. en 1977
Endosulfán y compuestos relacionados: α -Endosulfán β -Endosulfán Endosulfán éter Endosulfán-diol Endosulfán-lactona Endosulfán-sulfato	Plaguicidas actualmente en uso
Toxafeno	Plaguicida prohibido en U.S.A. en 1982
Alquilfenol polietoxilatos ($n < 2$) Alquilfenoles ($R > 4$ carbonos): <i>p</i> -nonilfenol <i>p</i> -octilfenol	Surfactantes industriales presentes en detergentes; componentes de plásticos con propiedades antioxidantes y/o maleables
Ftalatos: <i>n</i> -butil ftalato Benzilbutilftalato	Ablandadores del plástico en chupetes y mordedores Plastificantes del PVC y cosméticos
Bisfenol A y compuestos relacionados Bisfenol F Bisfenol AF	Precusores del plástico policarbonato y de las resinas epoxi; subproductos de plásticos tras digestión microbiana
Butilhidroxianisol (BHA)	Antioxidante

PCBs	Transformadores eléctricos, prohibidos en 1970
Fenilfenol	Limpiadores, desinfectantes
Acido amsónico	Blanqueadores
Bifenilos polibromados (PBBs, PBDEs)	Retardadores de la llama Usados en textil y plásticos
Perfluorados (PFOS, PFOA)	Recubrimientos en sartenes y utensilios de cocina Aislantes textiles
Parabenos	Conservantes empleados en cosmética
Benzofenonas Canfenos Cinamatos	Filtros UV empleados en cosmética

Es realmente llamativo comprobar que algunas de la listas de sustancias químicas clasificadas como disruptores endocrinos y, más específicamente, como xenobióticos estrogénicos, incluyen pesticidas y productos químicos de empleo en agricultura junto a fitoestrógenos y micoestrógenos, productos naturales contenidos en algunos organismos vegetales, y a productos farmacéuticos empleados en el tratamiento hormonal de enfermedades muy diversas, tanto en medicina como en veterinaria. Incluso, en algunos casos, esas listas también contienen hormonas naturales y sus productos de degradación, que, de manera natural, se encuentran en la excreción urinaria de los individuos normales. Este hecho puede confundir al consumidor, al mostrar productos industriales como una parte más del censo de productos naturales y farmacológicos. Sin embargo, mientras que los productos naturales han estado en contacto con la especie humana durante años, y los productos farmacológicos está bajo una estricta regulación, los disruptores endocrinos de origen industrial tan solo han empezado a regularse, y siempre bajo la aplicación del principio de precaución.

I.1.3. Biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto

Durante las últimas décadas, el interés de la comunidad científica por los compuestos químicos disruptores endocrinos ha experimentado un crecimiento espectacular, ya que estas sustancias parecen jugar, de manera inequívoca, un papel importante en la génesis de enfermedades relacionadas con el desarrollo y la funcionalidad del sistema reproductor, y con la aparición de tumores en órganos dependientes de las hormonas (Miller & Sharpe, 1998).

La relación causal entre exposición a disruptores endocrinos y efecto en humanos es relevante y plausible, y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES) (Swan, 2000), o las alteraciones observadas en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenoestrógenos (Soto *et al.*, 1995). Desgraciadamente, la asociación entre exposición de la población general a compuestos químicos, contaminantes ambientales, y riesgo de enfermedades dependientes de hormonas, ha sido escasamente explorada y con protocolos de trabajo no siempre bien orientados. La información epidemiológica disponible sobre la asociación entre exposición a sustancias químicas contaminantes medioambientales capaces de alterar el balance hormonal, y su efecto sobre la salud humana, no es muy abundante y rara vez emana de trabajos desarrollados con este objetivo concreto. En la mayoría de los casos se trata de estudios planteados para dar respuesta a la contribución a la patogenia de la enfermedad de uno o unos pocos contaminantes medioambientales, generalmente pesticidas de uso agrícola, o de exposiciones químicas importantes ligadas a actividades profesionales concretas, olvidando que es el efecto combinado del conjunto de compuestos químicos disruptores endocrinos, y su interacción con las hormonas endógenas, lo que, en última instancia, define el riesgo de enfermedad.

Miller y Sharpe (1998) enunciaron algunos de los factores que estarían contribuyendo a la dificultad de establecer asociaciones de causalidad entre disruptores endocrinos y enfermedad. Las razones son:

i) La baja potencia hormonal de la mayoría de los compuestos químicos identificados como disruptores endocrinos.

ii) La variedad en cuanto a su naturaleza y estructura química, lo que dificulta, tanto su identificación como la asignación a cada uno de ellos, de un papel de forma aislada.

iii) La posibilidad de que los efectos combinados puedan ser críticos para ejercer un efecto hormonal.

iv) La incertidumbre que rodea al efecto de estos compuestos, que varía dependiendo del órgano diana y de las circunstancias de la exposición.

Por otro lado, la mayor parte de los trabajos en este campo estiman la exposición de manera indirecta, utilizando datos derivados de cuestionarios epidemiológicos, orientados a tipificar la exposición, incluido el momento en que ésta ha ocurrido, información sobre el lugar de residencia, ocupación, hábitos de vida, entre otros. Pero la utilización exclusiva del cuestionario epidemiológico puede introducir sesgos importantes, ya que el investigador queda, en muchos casos, a merced de la calidad y la validez de las preguntas y le enfrenta en ocasiones a problemas de legibilidad o ausencia de anotaciones, limitando, en definitiva, las posibilidades de obtención de información de forma fidedigna, y concluyendo en una clasificación inadecuada de la exposición (Dolk & Vrijheid, 2003; Kurahashi *et al.*, 2005; Vidaeff & Sever, 2005).

Por otra parte, la medida de la exposición crea grandes problemas de clasificación en los diseños epidemiológicos, cuando se intentan categorizar los factores de riesgo relevantes. La necesidad de seleccionar uno o varios test de disrupción endocrina es una de las cuestiones más debatidas dentro de las organizaciones gubernamentales implicadas en el estudio de dichas sustancias y encargadas de proponer medidas de regulación. Una clasificación incorrecta limita la posibilidad de establecer una relación causa-efecto por la exposición a compuestos químicos con actividad disruptora endocrina. La separación temporal entre exposición y presentación de la enfermedad, acentúa las dificultades.

Nuestro grupo de trabajo, de carácter multidisciplinar, no ha sido ajeno a estas preocupaciones y ha venido desarrollando, de forma interrumpida, trabajos de investigación, tanto identificando compuestos con actividad hormonal, como estableciendo métodos de estimación de la exposición que van más allá de la cuantificación aislada de uno o unos pocos compuestos. Estos trabajos han permitido avanzar considerablemente en el conocimiento sobre la importancia de los disruptores endocrinos en el desarrollo de enfermedades hormono dependientes, sopesar de forma objetiva la extensión e importancia de la exposición humana a compuestos químicos con actividad hormonal y disponer de marcadores de exposición/efecto de aplicación rutinaria en estudios epidemiológicos.

La caracterización de disruptores endocrinos con actividad hormonal y la identificación de las vías de exposición, han sido y son labores concienzudas y persistentes que nos han llevado a expandir considerablemente el censo de disruptores endocrinos, de manera especial en tres grupos de compuestos químicos:

i) Pesticidas organoclorados (Botella *et al.*, 2004; Cerrillo *et al.*, 2005; Carreño *et al.*, 2007; López-Espinosa *et al.*, 2007 y 2008; Porta *et al.*, 2008)

ii) Bisfenoles, alquifenoles y bifenilos policlorados (Olea *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1998, Rivas *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2007a; López-Espinosa *et al.*, 2009).

iii) Dioxinas y furanos (López-Espinosa *et al.*, 2008b).

Además, se ha podido probar de forma clara la existencia de fuentes de exposición, en muchos casos inadvertida. De especial significación es la exposición de poblaciones de mayor susceptibilidad, como gestantes y niños. Algunos ejemplos, relacionados con el trabajo de tesis doctoral que aquí se presenta, son los siguientes: bisfenoles en envases alimentarios y biberones (Brotons *et al.*, 1995), selladores dentales (Olea *et al.*, 1996; Olea, 2000; Pulgar *et al.*, 2000), bioacúmulo de bisfenoles en grasa de niños y de adultos (Olea *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2008).

La Agencia Americana para la Protección del Medio Ambiente y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), han tratado de establecer una batería de ensayos *in vitro* para el pre-cribado de sustancias químicas con potencial estrogénico. Algunos de los ensayos empleados para evaluar la disrupción endocrina son:

- 1) el test uterotrófico en ratas inmaduras
- 2) el bioensayo de Herberger de próstata
- 3) el protocolo 407 ampliado para efectos transgeneracionales
- 4) el bioensayo E-Screen
- 5) Levaduras (bioensayo YES) o líneas celulares, transfectadas de manera permanente con receptores específicos.

Además, y con objeto de dar una solución al problema de la estimación de la exposición conjunta a varios xenoestrógenos, se ha sugerido la cuantificación en muestras biológicas y medioambientales del mayor número posible de compuestos químicos, el estudio de las interacciones existentes entre ellos, y el desarrollo de biomarcadores de exposición y efecto para los compuestos hormonalmente activos.

El diseño de estudios encaminados a investigar la relación existente entre la exposición a disruptores endocrinos y el desarrollo último de enfermedad, basados en el análisis de muestras humanas, debe considerar la hipótesis a ser testada, los compuestos químicos que van a ser medidos y la actividad biológica que vaya a ser analizada. Sin embargo, estas consideraciones no suelen ser tenidas en cuenta de manera sistemática. Por ejemplo:

- i) muchos estudios han incluido compuestos químicos que no son hormonalmente activos
- ii) otros estudios sólo han medido y tenido en cuenta un único compuesto
- iii) la mayoría de los estudios no han considerado los efectos acumulativos y las interacciones entre compuestos químicos

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar marcadores de exposición estrogénica, androgénica, tiroidea, etc., que vayan más allá de la cuantificación de disruptores endocrinos aislados.

Dentro de este contexto, hace más de una década, Soto y colaboradores propusieron que, además de medir los niveles de exposición a determinados disruptores endocrinos, sería más útil evaluar el efecto de los mismos mediante la medida de la actividad biológica resultante de la exposición a xenobióticos (Sonnenschein *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 1997). Nuestro grupo de investigación desarrolló una metodología de extracción de estrógenos en muestras biológicas humanas, y al mismo tiempo adoptó y desarrolló un sistema para estimar la carga estrogénica de xenobióticos presentes en muestras biológicas, empleando el test conocido como “E-Screen” (Soto *et al.*, 1992). Este bioensayo compara la proliferación de las células de la línea MCF-7 de cáncer de mama tratadas con estradiol, con aquellas tratadas con diferentes concentraciones de xenobióticos sospechosos de ser estrogénicos (Soto *et al.*, 1992; Villalobos *et al.*, 1995).

Para ello se requiere la separación previa de las hormonas sexuales endógenas contenidas en las muestras biológicas como paso obligado para poder demostrar que el efecto mostrado en el ensayo E-Screen es debido solo a los xenobióticos acumulados. De esta forma, el ensayo biológico de estrogenicidad E-Screen, utilizado para la medida de la carga estrogénica total efectiva (TEXB: Total Effective Xenoestrogen Burden), asigna un valor de estrogenicidad a las muestras biológicas analizadas (tejido adiposo, sangre, leche materna, placenta) y convierte un marcador de exposición, tipo dosis interna, en un marcador de equivalencia biológica, y por tanto de efecto biológico (Pazos *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2008). Este marcador ha sido aplicado con éxito en estudios epidemiológicos de muy diferente índole, en los que la exposición a disruptores endocrinos estrogénicos se cuantifica mediante la medida individual de residuos químicos y la estimación de la actividad estrogénica del extracto tisular (Ibarluzea *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2007b).

La medida de TEXB en muestras biológicas va más allá del concepto de biomarcador de exposición, puesto que, con su expresión no se limita a indicar exposición, sino que establece un vínculo con el efecto biológico producido. La medida de TEXB en muestras biológicas es, por tanto, un marcador de exposición y un marcador subrogado de efecto, al mismo tiempo. Este biomarcador, junto con las técnicas de análisis químico que permiten hoy día detectar y cuantificar sustancias a concentraciones pico y nanomolares, junto con la inclusión de nuevos disruptores endocrinos, hace que el campo objeto de estudio responda de pleno a las recomendaciones de la Unión Europea. Con esta memoria se pretende aportar algo más de conocimiento al problema descrito.

I.1.4. Grupos de susceptibilidad específica: la infancia

Desde el momento de la concepción del ser humano, la exposición a contaminantes químicos medioambientales puede afectar el desarrollo fetal y determinar la estructuración de los sistemas y su función. Las consecuencias de la exposición no terminan con el nacimiento, ya que el efecto disruptor parece hacerse evidente no sólo en los sistemas no estructurados al nacer, como el neurológico, el inmunitario o el sexual, sino también en órganos y aparatos cuya función y maduración pueden verse modificados por las exposiciones ambientales, como es el caso de la función respiratoria (Ramon *et al.*, 2005). La disrupción hormonal constituye una de las vías patogénicas a través de las cuales el medio ambiente interfiere en estos procesos.

En este marco, la dieta, tanto de la madre durante la gestación y la lactancia, como la del niño durante la primera infancia, constituyen uno de las vías fundamentales a través de las cuales el medio ambiente puede influir en el desarrollo fetal e infantil desde una doble vertiente: ingesta de alimentos y agua como portadores de tóxicos ambientales y alérgenos, y dieta como vehículo de agentes protectores frente a los insultos ambientales, como ocurre en el caso de los nutrientes antioxidantes.

En la declaración de Bangkok, en marzo de 2002, la OMS sugería la prioridad de estudiar, de forma multicéntrica y en centros de excelencia, los efectos de la exposición a dosis bajas de contaminantes en el desarrollo de los niños desde la etapa prenatal a la adolescencia (WHO: The Bangkok Statement). En 2003, la Unión Europea, en el VI Programa Marco de Investigación, planteó como área prioritaria (1.1.5 Food Quality and Safety) (Community Research & Development Information System) la investigación de la influencia de los alimentos y factores ambientales en la salud de grupos específicos, como los niños, mediante el estudio de las interacciones complejas entre las exposiciones ambientales, la ingesta de alimentos y factores metabólicos, inmunitarios y genéticos. En junio de 2004, los ministros de Salud y Medio Ambiente de la Región Europea de la OMS firmaron un Plan de Acción de Salud Infantil y Medio Ambiente (ESCALE), en el que se marcaron los objetivos para la reducción de la mortalidad y la morbilidad por enfermedades relacionadas con la contaminación ambiental, con especial atención al embarazo, la infancia y la adolescencia (WHO: Regional Office for Europe). En dicho plan se reconoce la necesidad de colaboración internacional y de investigación. También en 2004, la Unión Europea puso en marcha una estrategia para reducir las enfermedades relacionadas con factores ambientales, con especial atención a los grupos más vulnerables de la sociedad, en particular a la infancia (EU, European Environment Health Strategy).

Esta nueva estrategia de medio ambiente y salud incorpora un planteamiento a largo plazo, ya que su objetivo global es reducir las enfermedades causadas por los factores medioambientales en Europa. Para lograr dicho objetivo se reconoce la necesidad de ampliar los conocimientos sobre los problemas sanitarios vinculados con la degradación del medio ambiente, con el fin de prevenir las nuevas amenazas a la salud derivadas de la contaminación ambiental. La estrategia recibe la denominación de SCALE (acrónimo en inglés de los cinco elementos clave en los que descansa: Science, Children, Awareness, Legal instrument, Evaluation). La estrategia se aplicará en varios ciclos. El primero, correspondiente al período 2004-2010, se ha centrado en cuatro efectos sobre la salud:

- a) Las enfermedades respiratorias infantiles, el asma, las alergias
- b) Los trastornos del desarrollo neurológico
- c) El cáncer infantil
- d) Los efectos de disrupción endocrina.

La exposición pre y posnatal a contaminantes ambientales tiene consecuencias tanto al nacimiento (retardo de crecimiento intrauterino, prematuridad, alteraciones del desarrollo neurológico), como sobre la salud en etapas posteriores de la vida, incluyendo morbilidad en la edad adulta por cáncer, asma y alergia, enfermedades cardiovasculares, alteraciones cognitivas, etc. De la misma forma, la dieta y la nutrición durante la etapa fetal y primera infancia es fundamental para el correcto desarrollo infantil, así como para la salud posterior. Es lo que se conoce como el origen fetal de las enfermedades (Barker, 1990; Kogevinas *et al.*, 2004). La asociación entre alteraciones de la maduración genital masculina (criptorquidia e hipospadias) con alteraciones de la función testicular (calidad del semen) y cáncer de testículo, o la relación de menarquia precoz con el cáncer de mama, son un buen ejemplo de la hipótesis de exposición temprana con consecuencias posteriores en la vida del individuo (García-Rodríguez *et al.*, 1996; Olea *et al.*, 2002; Ibarluzea *et al.*, 2004).

I.2. EL BISFENOL-A

Bisfenol- A (BPA) fue sintetizado por primera vez en 1891 por A.P. Dianin, pero no fue hasta 1936 cuando Dodds & Lawson describieron su actividad uterotrónica en la rata, lo que permitió su inclusión en el censo de estrogénos de síntesis, acompañando a su homólogo Dietilstilbestrol (DES) (Dodds & Lawson, 1936).

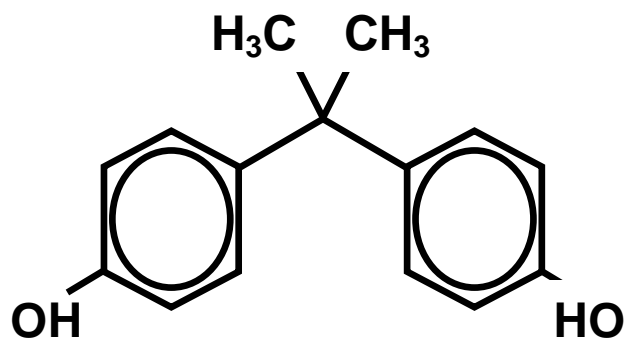


Figura I.1 Estructura química del bisfenol A

En la actualidad, BPA es uno de los compuestos químicos de mayor producción mundial, con un incremento de la demanda anual del 6 al 10%. En 2005, la producción mundial de BPA fue de 3.200.000 Tm (EPA, 2005). En Europa, cuatro compañías producen un total de 1.400.000 Tm/año en 6 factorías, una de ellas en el sur de España, (Cartagena, Murcia), que produce más de 250.000 Tm/año (NC LEXAN, 2005). BPA es el monómero empleado para la síntesis del policarbonato, plástico utilizado en multitud de aplicaciones gracias a su dureza y resistencia térmica. Se usa también como intermedio de reacción en la fabricación de resinas epoxi, fenoxi, polisulfona y determinadas resinas de poliéster, además de como aditivo en retardantes de llama ó en el caucho.

El polímero de BPA, policarbonato, pesa poco, es duro y claro, y resiste muy bien el calor y la electricidad. Se usa, por tanto, en una gran variedad de productos como soportes digitales (CDs y DVDs), equipamientos eléctricos y electrónicos, automóviles, contenedores reutilizables para comida y bebidas, equipos médicos y muchas otras aplicaciones. Por su parte, las resinas epoxi se utilizan en laminados eléctricos para placas de circuito impreso, pinturas y adhesivos compuestos, y en una gran variedad de recubrimientos de protección (como láminas protectoras en latas de metal para mantener la calidad de los alimentos y bebidas que contienen), en tapones de botellas y en tuberías de suministro de agua. BPA se usa, además, como aditivo en otros plásticos, formando parte de la composición de productos tales como materiales ignífugos, líquido de frenos o papel térmico, y de numerosos

productos plásticos de utilización diaria, como juguetes o lentes oculares. Algunas resinas epoxi se usan como selladores en tratamientos dentales.

El consumo de BPA crece anualmente debido a la fuerte demanda para la fabricación de policarbonato (71%) (Chemical study of BPA, 2006; Evaluation of..., 2004). Las aplicaciones de este compuesto en la industria del automóvil suman alrededor del 20% del consumo total del mismo, donde se usa en sustitución de materiales tradicionales como metal o vidrio. En forma de planchas, más del 20% del consumo se dirige a la construcción y el transporte, mientras que la fabricación de discos compactos en todos sus formatos, emplea una proporción anualmente creciente (actualmente 15-20%) (WWF, 2000).

La producción masiva y el uso tan extendido de Bisfenol-A implica emisión continua de BPA durante la fabricación y utilización de los productos que lo contienen (WWF, 2000; Chemical study of BPA, 2006; European Union, 2008). Las emisiones durante la fabricación se han estimado en alrededor de 2 Tm/año a aguas de superficie y en 1 Tm/año al aire. Las emisiones más importantes resultan de su uso en la fabricación de resinas fenólicas proyectadas (43 Tm al agua en Europa), papel térmico (151 Tm al agua en Europa) y PVC (25 Tm al agua en Europa) (Chemical study of BPA, 2006). La contaminación ambiental derivada de su empleo, aunque conocida, no está cuantificada en este momento.

I.3. EL BISFENOL-A, COMO ESTRÓGENO SINTÉTICO (xenoestrógeno)

Dada la magnitud de su utilización, la exposición al BPA es universal y continua a través de los alimentos, el agua de consumo, a través de la piel y por la inhalación del polvo ambiental, entre otros medios. Diversos estudios han investigado y cuantificado los niveles de BPA en distintas matrices biológicas humanas, como por ejemplo, suero, orina, líquido amniótico, líquido folicular, tejido placentario o sangre de cordón umbilical. Los niveles de BPA

encontrados en estos fluidos son, en muchas ocasiones, superiores a las concentraciones necesarias para conseguir respuestas positivas en ensayos *in vitro* (cultivos celulares), e incluso superiores a las concentraciones de BPA necesarias para desencadenar una respuesta en modelos experimentales *in vivo*, empleando animales.

Distintos ensayos han investigado el mecanismo por el cual BPA ejerce su acción. En primer lugar, BPA se une tanto a la forma alfa de los receptores estrogénicos (ER α), como a la forma beta (ER β), con aproximadamente 10 veces mayor afinidad por el receptor ER β (Pennie *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1998; Kuiper *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 2005). No obstante, la afinidad de BPA por los receptores estrogénicos, es decir, su potencia, es baja cuando se compara con Estradiol, situándose en un orden de 10,000 a 100,000 veces menos potente. Esta característica ha propiciado que BPA fuera considerado como un débil estrógeno ambiental. Sin embargo, estudios recientes sobre los mecanismos de acción de BPA a bajas concentraciones, han revelado que BPA puede desencadenar toda una batería de respuestas estrogénicas celulares de igual o mayor eficacia y potencia que el propio estradiol (Welshons *et al.*, 2003, 2006). Se han propuesto varias explicaciones ante esta aparente paradoja:

a) BPA se une de manera específica dentro del dominio de unión tanto del receptor estrogénico alfa como beta, movilizando co-reguladores determinados (Safe *et al.*, 2002)

b) BPA desencadena respuestas rápidas mediante su unión a receptores estrogénicos específicos de membrana, aun por identificar (Alonso-Magdalená *et al.*, 2005; Thomas & Dong, 2006), y

c) BPA se une a otros receptores relacionados con los receptores estrogénicos (ER γ), pero a los cuales no se uniría el estradiol (Ariazi and Jordan, 2006; Okada *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2009).

Así mismo, otros hallazgos recientes muestran que, en una variedad de tejidos distintos al tejido mamario o uterino, BPA puede ser tan eficaz y potente como el estradiol, produciendo cambios en determinadas funciones celulares que

empiezan a observarse a dosis tan bajas como 1 pM (0,23 pg/mL de medio de cultivo) (Welshons *et al.*, 2006).

La dosis de referencia toxicológica para un compuesto químico de síntesis se calcula, normalmente, a partir de la concentración del compuesto que, aplicado a un animal de experimentación, no produce ningún efecto adverso asociado: NOAEL (No Observed Adverse Effects Level). Por otro lado, se define LOAEL (Lowest Observable Adverse Effect Level) como la concentración más baja de un compuesto químico que produce un efecto adverso. Para algunos compuestos es imposible calcular el nivel NOAEL, y en estos casos, para el cálculo de la dosis de referencia, se utiliza el LOAEL. Tal es el caso del Bisfenol-A, ya que, para este compuesto, se han observado algunas respuestas adversas incluso a dosis por debajo de la menor concentración asociada al LOAEL. La dosis de referencia toxicológica para BPA es de 50 mg/kg/día (Welshons *et al.*, 2003).

Los estudios toxicológicos de residuos o compuestos químicos de síntesis, se basan también en la determinación de la ingesta diaria admisible (ADI), definida como la máxima cantidad diaria del compuesto que la especie experimental puede ingerir sin ningún tipo de manifestación toxicológica. Estudios toxicológicos han determinado que la dosis máxima tolerada para BPA en el hombre es de 1000 mg/kg/día. Sobre esta cantidad se aplican tres factores 10 de seguridad: el primero, al tener en cuenta que los estudios toxicológicos se realizan en animales de experimentación, un segundo factor al considerar la variabilidad entre y dentro de las poblaciones humanas, y un tercer factor de 10 cuando se extrapolan exposiciones subcrónicas a crónicas (factor de seguridad total 1000) (Welshons *et al.*, 2003).

De acuerdo con la toxicología clásica, Bisfenol-A debería ser inocuo a las concentraciones a las que los humanos están expuestos. La mayoría de los estudios descritos concluyen que la exposición del hombre a BPA es extremadamente baja, siempre por debajo de cualquier límite legal establecido. Así, Kang y colaboradores han estimado que la dosis humana diaria de BPA está por debajo de 1 µg /kg de peso corporal/día teniendo en cuenta todas la

posibles vías de exposición (aire-agua-suelo-dieta) (Kang *et al.*, 2006). Alternativamente, la European Commission's Scientific Committee on Food (2002) estima que la exposición a BPA es de 0,48-1,6 µg/kg de peso corporal/día, aunque considera solamente las fuentes alimentarias.

Los estudios de toxicología clásica se basan en el principio de Paracelso, el famoso médico suizo, “nada es inocuo, todo es **veneno**; sólo **la dosis hace** la diferencia”, lo que implica que mayores dosis causarán mayores daños y, por tanto, que efectos que no hayan sido evidenciados a dosis altas no podrán aparecer a concentraciones inferiores. En contra de este dogma, múltiples estudios han demostrado que este modelo no es aplicable a las respuestas desencadenadas por las hormonas, o por sustancias químicas que se comporten como tales, donde una dosis-respuesta no monofásica ha sido observada en diferentes niveles de organización y para diferentes efectos (Sonnenschein *et al.*, 1989; Almstrup *et al.*, 2002; Welshons *et al.*, 2003; Vandenberg *et al.*, 2006; Hugo *et al.*, 2008).

Algunos grupos de investigación, como el de Vom Saal, y el de Soto y Sonnenschein, han evidenciado alteraciones importantes en la estructura y la función del sistema reproductivo y de la glándula mamaria, en fetos animales expuestos a dosis de BPA 4.000 veces menores que las dosis necesarias para producir efectos uterotrópicos en el animal adulto o pre-púber (vom Saal *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2001). Otros autores han evidenciado igualmente efectos muy diversos del BPA a dosis consideradas como seguras; por ejemplo: incremento del volumen de la glándula prostática y cáncer de próstata, alteración del desarrollo y de la organización tisular en la glándula mamaria y cáncer de mama, modificación de la diferenciación sexual en el cerebro, morfología vaginal alterada e inducción de ciclicidad menstrual, pubertad precoz, aumento de peso corporal, malformaciones genitales, etc. (Howdeshell *et al.*, 1999; Schonfelder *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2003; Timms *et al.*, 2005; vom Saal & Hughes, 2005; Rubin *et al.*, 2006; vom Saal & Welshons, 2006; Durando *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2007; Tyl *et al.*, 2008).

En resumen, la mayor parte de los estudios publicados sobre efectos de BPA en animales de experimentación, realizados tanto en el ámbito académico como de financiación gubernamental, confirman los efectos a bajas dosis (vom Saal *et al.*, 2007). Sin embargo, prácticamente el 100% de los estudios financiados por la industria no advierten de ningún tipo de efecto adverso. Esta extraordinaria disparidad, virtualmente imposible de atribuir a variaciones del azar, es un rasgo característico de la literatura sobre los efectos del BPA a los niveles de exposición humana actual, y aumenta la controversia en este campo del conocimiento.

Debido a su elevada disponibilidad en el entorno y su alta actividad estrogénica en respuestas específicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Colerangle & Roy 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1998; Markey *et al.*, 2001), los efectos adversos de BPA sobre la salud humana son verosímiles y esperados. De hecho, se ha sugerido que la exposición a BPA, junto a otros disruptores endocrinos, durante momentos críticos del desarrollo (por ejemplo la etapa fetal), puede ser la causa subyacente de la creciente incidencia de infertilidad, anomalías del tracto genitourinario o cáncer de mama observados en las poblaciones expuestas de Europa y Estados Unidos en los últimos 50 años (Sharpe and Skakkebaek 1993; Skakkebaek *et al.* 1998; Muñoz de Toro *et al.* 2005; Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2005; Chapin *et al.*, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2008; Wolff *et al.*, 2008).

I.3.1. Identificación de las rutas de exposición a BPA

Para la evaluación del riesgo de exposición a contaminantes ambientales, en el hombre y en los demás seres vivos, es fundamental la identificación de las fuentes de exposición, además del conocimiento de las rutas metabólicas empleadas para la eliminación por parte del organismo. En el caso de BPA, existen algunos estudios que investigaron el metabolismo y la degradación interna hasta la eliminación corporal. Todos ellos comparten las características siguientes:

- 1) Son estudios realizados sobre modelos experimentales con animales (por razones éticas obvias), y excepcionalmente con voluntarios.
- 2) Están basados en la cinética tras exposición a dosis únicas, generalmente elevadas, del compuesto químico a estudiar.

Sin embargo, la exposición humana a BPA no ha sido estudiada hasta épocas más recientes. Hoy sabemos que esta ocurre de manera continuada, y a dosis inferiores a las empleadas en estudios experimentales; procede, además de varias fuentes, y tiene lugar de manera simultánea con docenas de otros compuestos con actividad disruptora endocrina. Por consiguiente, los estudios en animales tras exposición simple, única y aguda, se muestran insuficientes de cara a determinar con precisión el análisis de la evaluación de riesgo a largo plazo en el hombre.

Las vías por las cuales el hombre y los animales se exponen a BPA, afectan a los niveles circulantes resultantes. Mientras algunos investigadores mantienen que la vía principal de exposición a BPA es la vía oral (alimentación) representando el 99% de la exposición total a BPA (European Commission's Scientific Committee on Food), y la única aplicable para la estimación del riesgo, otros señalan rutas distintas de exposición, como el agua, el aire o el suelo, que también deberían ser tenidas en cuenta. La mayoría de los estudios cuyo objetivo era la detección y cuantificación de BPA en el medio ambiente, se han centrado, por tanto, en la exposición potencial a este compuesto procedente de fuentes dietéticas. Así, un número significativo de estudios se han propuesto determinar niveles de BPA en alimentos, especialmente aquellos almacenados en latas con revestimiento de resinas epoxi (Biles *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2001; Goodson *et al.*, 2002; Thomson *et al.*, 2005; Braunrath *et al.*, 2005; Munguia-López *et al.*, 2005; Sajiki *et al.*, 2007; Yonekubo *et al.*, 2008) Como ha quedado referido, otras posibles fuentes potenciales de exposición a BPA, como agua de bebida, aire y polvo, han sido largamente desatendidas. De hecho, por ejemplo, BPA puede ser absorbido por exposición transdérmica mediante baño en aguas contaminadas por BPA, por vía inhalatoria en atmósferas contaminadas (Kang *et al.*, 2006) o durante

los procesos de manipulación de BPA y manufactura de sus derivados (European Union, 2008).

I.3.1.1. Exposición humana a BPA en aire y polvo

Se ha especulado mucho acerca de si la presencia de BPA en muestras medioambientales tales como agua, tierra, etc., pueda proceder de su vaporización, a pesar de su baja presión de vapor, lo que le permitiría ser absorbido por las partículas aerotransportadas (Matsumoto *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a las grandes cantidades de BPA producidas anualmente en todo el mundo, es más probable que la incorporación del BPA a partículas del aire, ocurra durante los procesos de producción en las plantas de fabricación de BPA.

Los niveles de BPA en aire y polvo pueden servir como indicadores de los niveles a los que está expuesto el hombre en sus hogares. En una inspección de 120 domicilios con el objetivo de identificar la presencia de compuestos químicos disruptores endocrinos, Rudel y cols. encontraron BPA en el 86% de las muestras de polvo recogidas, con concentraciones en un rango de 0,2-17,6 $\mu\text{g/g}$ (Rudel *et al.*, 2003). Otro estudio previo del mismo grupo (Rudel *et al.*, 2001) informa de la presencia de BPA en el 50% de las muestras de polvo recogidas en residencias y oficinas, con un rango de concentración de 0,25-0,48 $\mu\text{g/g}$ de polvo.

En un estudio realizado en aire de ambiente exterior urbano en Osaka (Japón), se detectaron niveles medios de BPA de 0,51 ng/m^3 de aire, con una ligera variación estacional en los niveles de BPA, crecientes de otoño a invierno y decrecientes de invierno a primavera (Matsumoto *et al.*, 2005). Los niveles de BPA detectados en ambiente exterior por Rudel y cols. en muestras de aire, fueron de 208 ng/m^3 (Rudel *et al.*, 2001).

I.3.1.2. Exposición a BPA desde filtraciones de vertederos, aguas superficiales y lixiviación de aguas residuales.

Varios estudios han identificado BPA en filtraciones de vertederos. Kawagoshi y cols., utilizando un sistema analítico doble que emplea un análisis químico mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) por una parte, y un ensayo híbrido con levaduras por otra, encontraron varios compuestos con actividad estrogénica y antiestrogénica en las aguas subterráneas procedentes de un vertedero localizado en el Puerto de Osaka, Japón (Kawagoshi *et al.*, 2003). BPA fue identificado como el contribuyente principal de la actividad estrogénica medida, con una contribución estimada del 84% y con niveles detectados de 740 ng/mL. En un estudio similar realizado en Alemania Occidental, la concentración medida de BPA, procedente de filtraciones sin depurar de un vertedero, fue de 3,61 mg/L (Coors *et al.*, 2003). Este grupo alemán comprobó que durante el tratamiento de filtrados sin depurar y utilizando métodos similares a los utilizados en otros vertederos de desperdicios en toda Europa, se elimina el 97% de la actividad estrogénica, pero permanecen trazas de BPA (Coors *et al.*, 2003). Los autores sugieren que los niveles encontrados proceden de la degradación de desperdicios plásticos enterrados en el vertedero. Las filtraciones de los vertederos, por tanto, pueden ser la fuente fundamental del BPA encontrado en el medio ambiente acuático.

Por otra parte, para comprobar la exposición potencial a BPA en el agua de bebida, se recogieron en Alemania muestras de agua procedentes del tratamiento (lixiviación) de aguas residuales, ríos, arroyos y depósitos de agua potable (Kuch & Ballschmiter, 2001). Los autores emplearon para el análisis de BPA y derivados, una reacción previa de extracción-derivatización, que convierte algunos de los contaminantes en sus ésteres de pentafluorobenzoato, seguida de análisis por CG-EM, lo que permite detectar BPA a concentraciones por debajo de 20 pg/L (Kuch & Ballschmiter, 2001). En este estudio alemán, se encontraron trazas de BPA en todas las muestras de río, en un rango de concentración de 500 pg/L a 16 ng/L. Los niveles de BPA en agua potable oscilaron entre 300 pg/L y 2 ng/L. También se detectó BPA en aguas superficiales de 38 diferentes localizaciones aleatoriamente distribuidas a

través de Holanda (Belfroid *et al.*, 2002). El 20% de las muestras recogidas mostraron niveles detectables de BPA (nivel de detección: 11 ng/L) y 9 de las localizaciones mostraron niveles superiores a 100 ng/L. Otro estudio encontró niveles detectables de BPA en el 41.2% de las muestras de agua procedentes de 139 arroyos estudiados en 30 estados norteamericanos (Kolpin *et al.*, 2002). En este caso, el nivel medio de concentración de BPA fue de 0,14 µg/L, con un valor máximo de 12 µg/L.

En España también se han realizado varios estudios, con el objetivo de comprobar la exposición potencial a BPA en muestras de agua procedentes de vertidos de tratamiento de aguas residuales, ríos y arroyos. Por ejemplo, en la comunidad de Madrid se investigó la actividad estrogénica del agua de los ríos principales de la comunidad, entre ellos Tajo, Guadarrama, Henares, Jarama y Lozoya, identificándose algunos de los compuestos químicos responsables de esta actividad, entre los cuales figuraba BPA. El rango de concentraciones medidas para BPA fue realmente alto, entre 900-5650 ng/L (Aguayo *et al.*, 2004).

La distribución de diferentes compuestos, disruptores endocrinos, a lo largo del curso del río Llobregat fue investigada por el equipo de Damiá Barceló (Céspedes *et al.*, 2005) mediante el análisis por CL-EM de 27 compuestos disruptores endocrinos; entre ellos alquifenoles (nonilfenol y octilfenol) y alquifenoles etoxiados, bisphenol A, y ftalatos. El trabajo incluyó, además, la medida de la actividad biológica resultante del efecto combinado de todos ellos, evaluada con un bioensayo con levaduras (RYA). Este ensayo se basa en la transcripción del gen del receptor de estrógenos humano a levaduras, que se activan con la presencia en el medio de compuestos capaces de unirse a este receptor. Las concentraciones de los compuestos analizados fueron incrementando a lo largo del curso del río, al igual que la estrogénicidad observada. Esta actividad (excluyendo del análisis la estrogénicidad asociada a los compuestos presentes en la fracción particulada) se debió fundamentalmente a la presencia de alquifenoles (Nonilfenol) y alquifenoles etoxiados (NPEO1), así como de BPA (aunque en menor medida).

I.3.1.3. Exposición a BPA procedente del plástico y del papel

En 1993, Krishnan y cols. encontraron que los medios de cultivo para el mantenimiento de líneas celulares y levaduras esterilizados en autoclave en frascos de cultivo de policarbonato, ocasionan la liberación de una sustancia que resultó tener propiedades estrogénicas (Krishnan *et al.*, 1993). Usando técnicas analíticas precisas (Resonancia Magnética Nuclear –RMN- y espectrometría de masas), determinaron que los frascos de cultivo construidos en policarbonato liberaban BPA cuando eran sometidos a autoclave para esterilización. A raíz de este hallazgo, Krishnan y colaboradores alertaron a la comunidad científica acerca del impacto de sus resultados en otros experimentos que usaran medios de cultivo autoclavables en frascos de policarbonato.

Estudios posteriores han examinado la liberación de BPA desde otros contenedores de policarbonato, como biberones de policarbonato, usando gran variedad de métodos analíticos, que incluyen cromatografía líquida de alta resolución –HPLC- y CG-EM. Además, se ha investigado el efecto que el lavado, el calentamiento o el cepillado de los mismos tendría sobre la liberación de BPA. De esta manera, Sun y colaboradores encontraron que se producía liberación de BPA desde frascos de policarbonato, sólo en su primera utilización (Sun *et al.*, 2000), ya que durante usos subsiguientes, las concentraciones de BPA estaban por debajo de los límites de detección. Alternativamente, Brede y colegas encontraron que el lavado repetido en el lavavajillas, el hervido en agua y el cepillado, ocasionaban liberación de mayores concentraciones de BPA en el agua (Brede *et al.*, 2003). Maragou y colaboradores reprodujeron, en un estudio reciente, las condiciones normales de uso de los biberones, encontrando resultados similares, lo que confirma que la temperatura es un factor crucial para la liberación del monómero desde el policarbonato (Maragou *et al.*, 2007). Varios estudios muy recientes han confirmado igualmente que la migración se ve favorecida a altas temperaturas (Le *et al.*, 2008; Cao & Corriveau 2008; Kubwabo *et al.*, 2009). Esta liberación de BPA ha sido observada para biberones de policarbonato fabricados en distintos países y por compañías diferentes (Wong *et al.*, 2005).

Estos datos han permitido estimar la exposición media a BPA procedente de la dieta, en los primeros meses de vida, desde el nacimiento hasta los 3 meses de edad, período en que los niños se alimentan exclusivamente de alimentos líquidos, estimándose que los recién nacidos están expuestos a los niveles más altos de BPA (0.024 mg/Kg de peso corporal/día), comparativamente con respecto a los adultos, debido a su menor peso. A partir de los 3 meses de edad, la exposición dietética estimada baja a 0.015 mg/kg de peso corporal/día.

Otros contenedores de policarbonato despiertan también interés por su potencial para liberar BPA durante su uso, como es el caso de los recipientes reutilizables de alimentos que, además, se exponen frecuentemente al calor. Muchos de estos contenedores se adquieren para ser usados en el microondas. A este respecto, Nerín y cols., estudiaron la composición de un recipiente de policarbonato para uso en microondas, encontrando en el plástico una concentración de BPA de 30 µg/g de plástico, con un nivel de migración potencial estimada de 6,5 µg/g de alimento (Nerín *et al.*, 2003). Otro estudio, con implicaciones potenciales sobre seguridad alimentaria, examinó los niveles de BPA en láminas de plástico estirado, de cloruro de polivinilo, usadas en paquetes de comida envasada (López-Cervantes & Paseiro-Losada, 2003). El estudio indicó la presencia de BPA en 4 de las 5 muestras investigadas, con un rango de 43-483 mg/kg de lámina. La migración de BPA desde estos productos fue probada en agua, ácido acético (3%) y aceite de oliva. En total, 3 de cada 5 láminas mostraron liberación en agua y ácido acético, mientras 4 de 5 liberaron BPA en aceite de oliva, evidenciando su potencial para la contaminación de productos alimentarios.

Por otra parte, algunos estudios han advertido que una amplia variedad de papeles y cartones en contacto con alimentos, son fuentes potenciales de contaminación con BPA, aunque la mayoría no han medido la tasa de transferencia real sobre los alimentos en contacto con ellos. El BPA es generalmente utilizado en la producción de tintas de impresión, lo que condiciona que, por esta vía, pase a formar parte del papel reciclado. Por tanto, no es una sorpresa su presencia en alimentos que han estado en contacto con

papel o con contenedores de cartón, fabricados con papel reciclado. En el análisis de 20 marcas de papel de cocina manufacturadas con pasta de papel virgen, los extractos de papel no contenían BPA, a excepción de una marca, con 0,12 mg/kg. Por el contrario, los rollos de cocina fabricados con papel reciclado, contenían niveles de BPA en un rango de concentración de 0,55-24,1 mg/kg (Vinggaard *et al.*, 2000). Otro grupo de investigación examinó 28 productos de papel en contacto con alimentos, encontrando que el 67% de las muestras manufacturadas con papel reciclado contenían BPA en un rango de 0,19-26 mg/kg (Ozaki *et al.*, 2004). En este estudio también los productos que referían estar fabricados con papel virgen, 13/16, contenían niveles detectables de BPA, aunque a concentraciones mucho menores (rango 0,034-0,36 mg/kg). Por último, nuestro grupo de trabajo realizó un estudio para investigar los niveles de BPA en contenedores de papel y cartón usados en comida rápida para llevar (López-Espinosa *et al.*, 2007) procedentes de cuatro países europeos diferentes, Inglaterra, Holanda, Portugal y España. En el extracto obtenido con la parte del contenedor en contacto directo con la comida, se detectó BPA en el 45% de las muestras estudiadas, con niveles más altos en las muestras de cartón que en las de papel (rango 0,05–1817,0 ng/g para cartón y 0,08–188,0 ng/g para papel).

I.3.1.4. Exposición a BPA desde latas y envases de comida

Algunas latas de comida están protegidas del óxido y la corrosión mediante la aplicación de revestimientos internos de resinas epoxi. Muchas de estas resinas son sintetizadas mediante un proceso de polimerización que consiste en la condensación de BPA con epiclorhidrina para constituir BPA diglicidil éter (BADGE) (www.bisphenol-a.org). Cuando la polimerización no es completa, puede quedar BPA libre en la resina epoxi, con el consiguiente potencial para contaminar la comida almacenada. Igualmente, el proceso de autoclave conducente a la esterilización, puede también favorecer la liberación de BPA al alimento.

Varios estudios han documentado condiciones que aumentan la liberación y migración de BPA desde el revestimiento de las latas al alimento que

contienen. Así, se han realizado controles cuidadosos sobre la influencia del tiempo transcurrido desde el envasado hasta el momento del consumo, o tiempo de almacenaje, la temperatura de almacenaje y otros factores. Uno de los primeros estudios realizados específicamente para describir y cuantificar el contenido de BPA en latas de comida, fue realizado por nuestro grupo de investigación, detectándose niveles de BPA en un rango de 4-23 µg por lata analizada (Brotons *et al.*, 1995). Kang y colaboradores encontraron que la temperatura utilizada en el proceso de esterilización de las latas tenía un efecto significativo sobre la migración de BPA, mayor que el tiempo de calentamiento (Kang *et al.*, 2003). Takao y colaboradores también describieron la influencia de la temperatura sobre la liberación de BPA desde resinas epoxi. Así, mientras se detectaron bajos niveles de BPA en agua almacenada en latas a temperatura ambiente, cuando las latas fueron calentadas a 100°C -una temperatura normal para realizar la conserva de comida enlatada-, las concentraciones de BPA aumentaron entre 1,7 y 55,4 veces (media: 18,2 veces) (Takao *et al.*, 2002). El aceite vegetal y las soluciones de cloruro sódico utilizados en las latas de comida, también han mostrado un efecto significativo sobre la liberación de BPA (López-Cervantes & Paseiro-Losada, 2003).

Cabe destacar que BPA puede migrar desde las tuberías de PVC al agua que conducen, en condiciones de pH neutro y temperatura ambiente (Yamamoto & Yasuhara, 1999). En estas circunstancias, BPA puede reaccionar con el cloro residual, utilizado en el tratamiento del agua de bebida, dando lugar a los derivados clorados de Bisfenol-A (Yamamoto & Yasuhara, 2002; Zafra *et al.*, 2003).

Muchos estudios han examinado los niveles de BPA procedentes de resinas epoxi que revisten latas de alimentos específicos. Se ha detectado BPA en comidas enlatadas para mascotas (Kang & Kondo, 2002), verduras (Brotons *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2001; Goodson *et al.*, 2002), pescado (Goodson *et al.*, 2002; Murguía-López *et al.*, 2005) o salsas (Sajiki *et al.*, 2007). Los valores encontrados en refrescos enlatados de supermercados canadienses están en un rango de 0,032-4,5 µg/L (Cao *et al.*, 2009a).

Wagner y Oehlmann (Wagner & Oehlmann, 2009) analizaron las marcas comerciales de agua mineral embotellada disponibles (22 marcas envasadas en cristal, plástico o tetra Pak) mediante un bioensayo *in vitro* con levaduras (YES). Este ensayo detectó actividad estrogénica en el 60% de las muestras, con un valor máximo de 75.2 ng/l equivalentes de estradiol. De ellas el 78% correspondían a marcas embotelladas en PET (polietileno tereftalato) además de las correspondientes en Tetra Pak. La migración de compuestos tales como BPA, alquifenoles o ftalatos, del material plástico al agua, podría ser la responsable de la estrogénicidad cuantificada, indicando que el consumo de agua embotellada es una vía de exposición potencial a disruptores endocrinos.

La exposición a BPA procedente de envases plásticos alimentarios quedó recientemente confirmada en el estudio de Carwile y colaboradores (Carwile *et al.*, 2009).

La población infantil está igualmente expuesta al BPA, ya que ha sido identificado y medido en fórmulas infantiles (Biles *et al.*, 1997; Kuo & Ding, 2004). Un estudio reciente ha encontrado niveles detectables de BPA en todos los alimentos infantiles estudiados, concretamente preparados líquidos para lactantes (Cao *et al.*, 2008), con concentraciones en el rango de 2.27 ng/g a 10.2 ng/g. También se han analizado diversos alimentos infantiles envasados en tarros de cristal con tapas de metal, encontrándose BPA en 99 de las 122 muestras analizadas, con un valor máximo de 7.2 ng/g (Cao *et al.*, 2009b).

I.3.1.5. Exposición a BPA procedente de productos dentales

Varios composites, basados en resinas epoxi, se utilizan en Odontología como selladores preventivos, estructuras para prótesis y modificadores dentales. Desde los años 60, el compuesto BPA-diglicidil metacrilato (Bis-GMA) se ha utilizado en materiales para restauración dental. Los precursores se polimerizan *in situ* una vez que se han aplicado al diente, lo que puede ocasionar que parte del material quede sin polimerizar, pudiendo liberarse BPA y originando una vía de exposición significativa en el individuo (Olea *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1999).

En un estudio de 18 adultos voluntarios, Olea y cols., aplicaron un total aproximado de 50 mg de sellador en 12 molares (Olea *et al.*, 1996). Se recogió la saliva de los participantes 1 hora antes y 1 hora después del procedimiento, encontrándose que todas las muestras contenían cantidades variables de BPA, en un rango de 3,3 a 30,0 µg/mL de saliva. Otros estudios posteriores han tratado de reproducir el estudio de Olea y colaboradores. Así, Arenhold-Bindselv y cols., aplicaron 38 mg de sellador sobre 4 molares en 8 voluntarios y encontraron niveles detectables de BPA en saliva inmediatamente después de la aplicación del sellador (Arenhold-Bindselv *et al.*, 1999). Sin embargo, no detectaron BPA en ninguna de las muestras de saliva recogidas entre 1 y 24 horas después de la aplicación. Por el contrario, Fung y cols., detectaron BPA en saliva de pacientes a los que se aplicaron selladores dentales, entre 1 y 3 horas después de la aplicación de los mismos (Fung *et al.*, 2000), pero no detectaron BPA pasados 1, 3 y 5 días después del tratamiento. Zafra y cols., recogieron muestras de saliva de 8 pacientes sometidos a procedimientos dentales con aplicación de resinas comerciales, y encontraron BPA en todas las muestras de saliva recogidas (Zafra *et al.*, 2002), en un rango de 15,3 a 32,4 ng/ml. Sasaki y cols., determinaron mediante ELISA el contenido de BPA en muestras de saliva de 21 pacientes tratados con cualquiera de las 9 resinas dentales comercialmente disponibles (Sasaki *et al.*, 2005), detectándose BPA en saliva, en un rango de varias decenas a 100 ng/ml, inmediatamente después del tratamiento con resinas, aunque se demostró que los enjuagues eliminaban los niveles medibles de BPA en las muestras de saliva posteriores.

I.3.2. Estudios sobre exposición humana. Epidemiología

Existe una extensa literatura sobre los efectos adversos de BPA en animales, que en los últimos años se ha centrado en la exposición a bajas dosis. En contraposición, se han realizado muy pocos estudios epidemiológicos sobre exposición humana a BPA. Algunos de ellos se han orientado hacia la búsqueda de fuentes de exposición, mientras que otros, retrospectivos, han intentado relacionar los niveles de BPA con algunas enfermedades y/o

disfunciones en el hombre. En la mayoría de los casos se ha considerado la exposición global, procedente de la suma de todas las fuentes posibles. Sería de sumo interés proceder a una investigación más dirigida, que permita conocer el peso relativo de las vías de exposición a BPA y sus posibles efectos en salud.

I.3.2.1. Población ocupacionalmente expuesta

La vía principal de exposición en población ocupacionalmente expuesta es el contacto dérmico y la inhalación. La exposición ocupacional a BPA ha sido investigada por Hanaoka y cols., que diseñaron un protocolo epidemiológico transversal con 84 trabajadores en una planta de fabricación de plástico en Japón (Hanaoka *et al.*, 2002). Cuarenta y dos de los trabajadores seleccionados manipulaban BPA diglicil éter (BADGE) en la fabricación, uso, transporte, tratamiento o empaquetado de resinas epoxi, mientras que otros 42 no manipulaban BADGE. Las concentraciones medias de BPA en orina de los primeros fueron significativamente más elevadas ($1,06 \mu\text{mol/mol}$ creatinina, $p=0.002$) que en los segundos. Además, en los trabajadores expuestos se describió una correlación inversa, aunque estadísticamente no significativa entre los niveles de BPA y los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH), de modo que los trabajadores que manipulan resinas epoxi tenían niveles de FSH inferiores a los controles. Aunque este estudio puede no ser extrapolable a los niveles potenciales de BPA en población general no ocupacionalmente expuesta, sí puede arrojar luz sobre los efectos potenciales y sutiles de la exposición a BPA en el hombre.

I.3.2.2. Población general

Para estimar la exposición humana a BPA en población general, podemos, por un lado, medir la concentración de esta sustancia en diferentes matrices biológicas (sangre, orina, leche materna y en otros tejidos o fluidos), en un momento determinado, o a lo largo del tiempo. Este proceso se conoce como *biomonitorización* de la exposición. Los investigadores pueden usar esta información para estimar la cantidad total absorbida del compuesto (BPA) que

reflejaría e incluiría todas las posibles fuentes de exposición, sean éstas conocidas o no. Pero también pueden determinar las cantidades de Bisfenol-A aisladamente en diversas fuentes (comida, aire, agua, polvo, etc.), y sumarlas para estimar la cantidad diaria absorbida. En general, se prefiere la estimación basada en la biomonitorización para calcular la cantidad total absorbida, ya que se integran todas las fuentes de exposición posibles, y no se requiere que estas estén identificadas.

Thomsom y cols., usaron información disponible en la literatura para estimar la exposición a estrógenos procedentes de la dieta, en subgrupos de población de Nueva Zelanda (Thomson *et al.*, 2003). La literatura disponible permitió a estos autores concluir que BPA era responsable de aproximadamente el 34% de la exposición estrogénica en la dieta de Nueva Zelanda, con dosis estimadas de 4,1-4,8 µg/día.

Los programas de biomonitorización establecidos en algunos países, están permitiendo conocer las concentraciones de compuestos químicos que podrían estar interfiriendo con la salud de sus ciudadanos. Así, el programa establecido en Estados Unidos (NHANES) ha permitido conocer la concentración de BPA total en muestras de orina de la población general americana, datos que han sido recientemente publicados (Calafat *et al.*, 2008). En el último informe NHANES publicado, el 92,6% de la población presentaba niveles detectables de BPA y, curiosamente, las concentraciones en orina de los niños fueron significativamente mayores que la de los adultos (4,5 µg/L vs 2,5 µg/L). Igualmente, Becker y su grupo detectaron BPA en 599 de 600 muestras de orina matinal, elegidas aleatoriamente entre 1800, de niños de 3 a 14 años residentes en Alemania. La concentración media fue de 2,7 µg /L.

En la última década, diversos grupos de investigación han publicado los niveles de BPA detectados, generalmente, en muestras de orina de poblaciones de “conveniencia” (Ouchi & Watanabe 2002; Kim *et al.* 2003; Matsumoto *et al.* 2003; Arakawa *et al.* 2004; Fujimaki *et al.* 2004; Calafat *et al.* 2005; Liu *et al.* 2005; Volkel *et al.* 2005; Miyamoto & Kotake 2006; Yang *et al.* 2003, 2006; Wolff *et al.* 2007). Estos datos reflejan algunas variaciones geográficas, que

podrían deberse fundamentalmente al momento de colección de las muestras biológicas, al método analítico empleado para su cuantificación, o al número de muestras incluidas (Calafat *et al.*, 2008).

I.3.2.3. Población infantil

Los niveles de sustancias químicas en la sangre de las mujeres embarazadas, pueden dar una idea de los productos a los que puede estar expuesto un nonato, aunque los niveles reales en el feto pueden ser significativamente diferentes de los niveles de la madre, en dependencia de la absorción a través de la placenta. Las medidas de la contaminación en el líquido amniótico durante el embarazo, o en el cordón umbilical en el momento de nacer, son los mejores indicadores de la contaminación infantil. Junto a estos niveles en sangre, los niveles de productos químicos en la leche materna y en los alimentos infantiles conforman los 3 indicadores básicos de la exposición en este grupo de población.

Los niveles de BPA descritos en sangre de mujeres embarazadas, relativamente mayores que los encontrados en mujeres no embarazadas, junto con los niveles encontrados en sangre de cordón umbilical y en plasma fetal, nos indican que el BPA es capaz de atravesar la barrera placentaria (Vandenberg *et al.*, 2007). Schönfelder y colaboradores encontraron niveles de BPA en plasma fetal por encima de 9,2 µg/L y de 105 µg/Kg en tejido placentario (Schönfelder *et al.*, 2002). De igual forma, otros estudios revelaron concentraciones de BPA en sangre de cordón por encima de 4 µg/L (Todaka & Mori, 2002; Tan & Mohd, 2003).

La especial susceptibilidad a los contaminantes ambientales en este grupo de población, deriva de sus especiales características en relación con cada una de las etapas del desarrollo (Cohen *et al.*, 2008). Así, el crecimiento celular es singularmente rápido en la etapa embrionaria, y el ritmo de los procesos de crecimiento y desarrollo es relevante en el caso de los sistemas nervioso, endocrino, reproductivo, e inmune (Bruckner, 2000). Diferentes estudios han

advertido de las diferencias entre la infancia y la edad adulta en los patrones de absorción, metabolismo y excreción de estos productos, en función de que:

- a) Los niños ingieren de tres a cuatro veces más alimentos y agua que un adulto, en relación al peso corporal.
- b) Las rutas metabólicas en los niños, particularmente en los primeros meses de vida, son fisiológicamente inmaduras, con lo que su capacidad de detoxificación es significativamente menor.

En la infancia, por tanto, pueden confluír una mayor absorción de estas sustancias, un procesamiento más lento y una menor eliminación: se ha estimado que el 50% de la exposición a pesticidas a lo largo de la vida tiene lugar en los primeros 5 años (Weiss *et al.*, 2004). Por ello, los estudios sobre adultos han de utilizarse con cautela para inferir sus resultados a la infancia.

Dos estudios se han dirigido a estimar niveles de exposición en población infantil. El primero estudió 9 niños, de entre 2 y 5 años, y la exposición potencial en el hogar y en la guardería a varios compuestos de síntesis, entre ellos BPA (Wilson *et al.*, 2003). Se detectaron niveles de BPA en muestras de aire interior y exterior, polvo del suelo y tierra del área de juegos, así como en la comida infantil sólida y líquida utilizada en la guardería y en el domicilio de los niños incluidos en el estudio. Basándose en estos datos, los autores estimaron que los niveles medios de exposición para los niños era de 42,98 ng/kg/día (Wilson *et al.*, 2003). Un segundo estudio observacional realizado por el mismo grupo de investigación, examinó la exposición a BPA en 257 niños en edad preescolar (1,5-5 años), verificando que BPA podía ser detectado en más del 50% de las muestras de aire interior, toallitas, y comidas sólidas y líquidas analizadas. Este estudio estimó que el 99% de la exposición a BPA del niño en edad preescolar procedía de la dieta, valorándose en un rango de 52-74 ng/kg/día, mientras que la exposición a BPA procedente de la inhalación se valoró en un rango de 0,24-0,41 ng/kg día (Wilson *et al.*, 2006).

En un estudio más reciente, realizado sobre una muestra representativa de la población americana no institucionalizada (n=2517), las concentraciones de

BPA en orina fueron significativamente más altas en los niños (mayores de 6 años) y en los adolescentes, cuando se compararon con los niveles encontrados en la población adulta (niños: 4,5 µg/L; adolescentes 3,0 µg/L; adultos 2,5 µg/L) (Calafat *et al.*, 2008).

Investigadores del mismo grupo (Calafat *et al.*, 2009) determinaron la concentración de BPA libre y total (libre + conjugado) en la orina de 42 bebés prematuros, ingresados en 2 Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, y que habían requerido, en distinto grado, la utilización de dispositivos de cloruro de polivinilo (sondas, equipos para perfusión, etc). Los principales metabolitos de BPA encontrados fueron las formas conjugadas, lo que habla de la capacidad del bebé prematuro para metabolizar BPA. Las concentraciones medias obtenidas (30,3 µg/L) están incluso muy por encima de las determinaciones realizadas en población general, y fueron, además, selectivamente más altas en aquellos prematuros que habían requerido un mayor uso de estos dispositivos ($p < 0,0001$). Harán falta nuevas investigaciones para determinar las fuentes específicas de exposición de estos niños a BPA.

I.3.3. Metabolismo del BPA. Modelos animales

Los estudios metabólicos sobre compuestos de síntesis dependen de la ruta de exposición al compuesto de interés, que puede ser tan diversa como la administración oral -directa o disuelta en agua-, la inyección intravenosa o intraperitoneal, cápsulas de liberación lenta y bombas osmóticas, entre otros. A este respecto, los estudios que han tenido por objeto investigar el metabolismo de BPA se han centrado, fundamentalmente, en la administración oral, parenteral y subcutánea a animales de experimentación, generalmente ratas y ratones.

I.3.3.1. Digestión y excreción

Varios estudios han determinado que el hígado juega un papel esencial en la metabolización de BPA in vivo. La glucuronización es una ruta metabólica

hepática utilizada para eliminar distintos compuestos tanto endógenos como exógenos. La población adulta metaboliza BPA vía hepática mediante glucuronización y sulfonación. Por esta razón, BPA-glucurónido ha resultado ser, en numerosos estudios, el metabolito principal, tanto en animales como en el hombre, presentando una baja o nula actividad estrogénica en varios ensayos in vitro (Yokota *et al.*, 1999). BPA puede resultar también conjugado en el hígado a BPA-sulfato, metabolito que carece igualmente de actividad estrogénica (Shimizu *et al.*, 2002), sin embargo no existen todavía suficientes estudios sistemáticos que hayan determinado la proporción de BPA que es metabolizado a BPA-glucurónido y BPA-sulfato (Vandenberg *et al.*, 2007).

Algunos estudios han sugerido diferencias de género en la concentración de los dos metabolitos principales de BPA en orina, con niveles superiores de BPA-sulfato en las mujeres y de BPA-glucurónido en los hombres (Kim *et al.*, 2003).

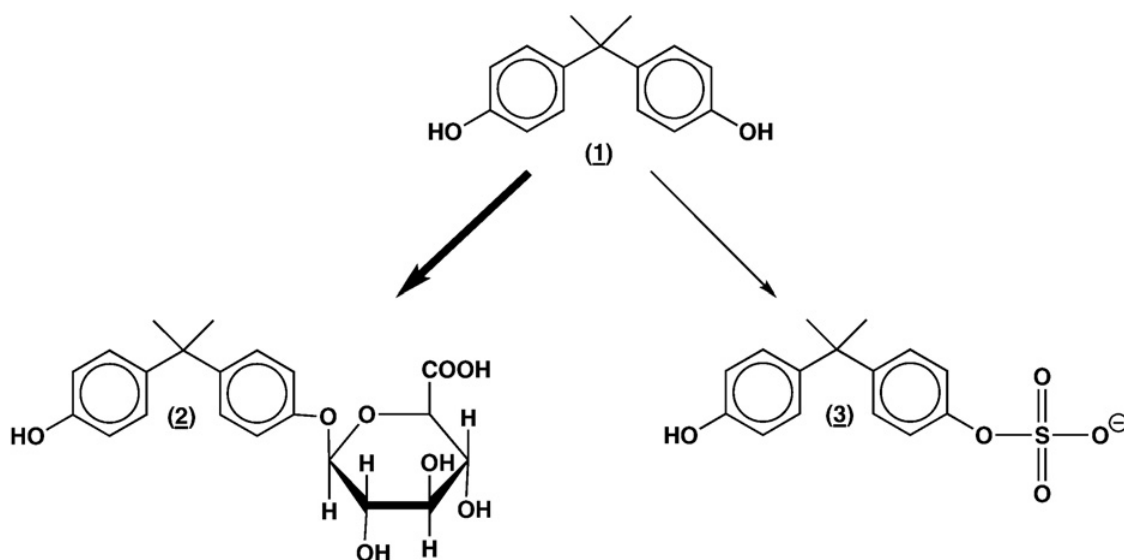


Figura I.2 Estructura química del bisfenol A ⁽¹⁾, bisfenol A glucurónido ⁽²⁾ y bisfenol A sulfato ⁽³⁾

Además de estas rutas de metabolización, otros autores han descrito rutas alternativas, probablemente activas cuando la glucuronización no puede funcionar eficientemente. Yoshihara y colaboradores describen una ruta hepática alternativa que produce un metabolito del BPA con mayor actividad estrogénica que BPA, el MBP, 4-metil-2,4-bis (p-hidroxifenil) pent-1-eno, (Yoshihara *et al.*, 2004). Las rutas de metabolización para detoxificación de compuestos químicos son muy diferentes en el feto y neonato en comparación con los adultos, en los que la actividad de las enzimas responsables de la glucuronización es mucho menor (Pacifci *et al.*, 1993).

Estudios fármaco-cinéticos han puesto de manifiesto que no todo el BPA es conjugado en el hígado; varios estudios han examinado la absorción y el metabolismo del BPA en el intestino y en el colon. La existencia de glucuronidasas en el tracto digestivo ha sido descrita por varios autores (que además ponen de manifiesto el incremento de los niveles desde la infancia a la edad adulta) (Mykkanen *et al.*, 1997), lo que significa que BPA-conjugado podría ser desconjugado y activado en el tracto digestivo de la población infantil durante el proceso digestivo, dando lugar a BPA nuevamente libre que puede ser absorbido por el colon (Mykkanen *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 2003).

Por otra parte, en el intestino también tiene lugar glucuronización de BPA. La adición de BPA a la mucosa intestinal en modelos experimentales *in vitro*, es seguida de absorción y transporte hacia la serosa, no existiendo diferencias significativas en este transporte entre las cinco partes o porciones del intestino estudiadas (Inoue *et al.*, 2003). La aparición de BPA en la serosa resulta acelerada cuando se aplican dosis altas de BPA (100 μ M). El nivel de BPA-glucurónido depositado en la cara mucosa, y transportado a la cara serosa aumenta con el tiempo de incubación. Sin embargo, en el intestino delgado, la mayor cantidad de BPA-glucurónido fue secretado en la cara mucosa, pero en el colon, la secreción fue mayor en la cara serosa, lo que sugiere que mientras el intestino proximal puede proteger contra la ingestión de BPA, el colon puede favorecer su absorción.

Kurebayashi y colaboradores estudiaron el metabolismo y la excreción de BPA en ratas sometidas a dosis únicas de 0.10 mg de BPA marcado por kilogramo de peso corporal, a través de exposición tanto oral como intravenosa (Kurebayashi *et al.*, 2003). Estas dosis relativamente bajas fueron elegidas para evitar la saturación de los mecanismos metabólicos y excretorios responsables de la eliminación del BPA del organismo. Con estas dosis, la administración intravenosa y oral conducen a una excreción en orina del 8,4 y 6,3% de la radioactividad administrada, respectivamente, en las 24 horas siguientes al tratamiento, y la excreción fecal fue del 77,6 y 81,6% de la dosis administrada, respectivamente. Los niveles fueron más altos durante las primeras 6 horas y ligeramente más altos en animales expuestos a través de vía intravenosa. De esta forma, los investigadores concluyen que la cinética de eliminación de BPA es similar e independiente de la ruta de exposición (administración intravenosa y oral), y que la excreción fecal es la principal vía de eliminación de BPA.

En otro estudio se examinaron ratas preñadas a las que se les había administrado vía oral y subcutánea una baja dosis de BPA (25 microgramos/kg) (Zalko *et al.*, 2003). 24 horas después de la administración se detectaron niveles de BPA en sangre con un valor medio de 2,2 ng/ml, el 85% del mismo asociado a la fracción plasmática.

Por razones éticas, no hay muchos estudios donde se haya investigado las rutas de metabolización de BPA en el hombre. Volkel y colaboradores administraron 25 µg/persona a 6 voluntarios, y midieron BPA libre y conjugado en orina y sangre de los voluntarios (Volkel *et al.*, 2005). En hombres, el 85% de la dosis aplicada de BPA se recuperó en orina después de 5 horas, la mayoría en forma de BPA-glucurónido. En mujeres, se recuperó el 75% del BPA, igualmente como BPA-glucurónido y en el mismo período de tiempo. Esto parece indicar potenciales diferencias de género en el metabolismo del BPA, sugeridas por otros estudios previos (Kim *et al.*, 2003; Calafat *et al.*, 2005).

Con anterioridad, el mismo grupo de investigación había realizado otro estudio metabólico administrando 5 mg de BPA a cada uno de los voluntarios

participantes (54-90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal). La eliminación de BPA se completó a las 24 horas posteriores a la administración (Volkel *et al.*, 2002). En el hombre, el BPA es absorbido rápidamente desde el tracto gastrointestinal, conjugado con ácido glucurónico a BPA-glucuronido en el hígado, y rápidamente filtrado desde la sangre por el riñón para excretarse por la orina. Esta ruta metabólica difiere de la rata, donde gran cantidad de BPA-glucuronido es transportado a la bilis y entra en el sistema digestivo (Yokota *et al.*, 1999).

Algunos estudios han indicado que los microsomas humanos no parecen tan capacitados para la glucuronización del BPA como los microsomas de rata, lo que diferenciaría la cinética metabólica de BPA en el hombre respecto a la de otros mamíferos (Elsby *et al.*, 2001). Sin embargo, Pritchett y cols., predicen que cuando los resultados metabólicos medidos en hepatocitos aislados son extrapolados a todo el hígado, la capacidad hepática para la glucuronización de BPA es más alta en humanos que en roedores (Pritchett *et al.*, 2002). El metabolismo del BPA parece diferir también, entre roedores y humanos, en la tasa de aclaramiento de BPA, el proceso de glucuronización intestinal o la tasa de excreción (Teeguarden *et al.*, 2005).

Se piensa que el BPA se liga a proteínas de transporte del plasma en roedores, monos y humanos (Revisado en Teeguarden *et al.*, 2005). Dado que la farmacocinética resulta afectada por la unión a la proteína, la respuesta potencial del BPA en cualquier tejido, incluidos tejidos diana a estrógenos, podría resultar alterada. Serán necesarias nuevas investigaciones para responder a estos aspectos con precisión.

I.4. MEDIDA DE LA EXPOSICIÓN A BPA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA LITERATURA RECIENTE

En la sección que se presenta a continuación, se resumen los estudios cuya finalidad ha sido la medición de la exposición humana a BPA, a través de la determinación de niveles de BPA en tejidos y fluidos humanos. También se

revisan los efectos en salud humana en los pocos estudios disponibles que, retrospectivamente, investigan la relación entre exposición a BPA y enfermedad.

I.4.1. Niveles de BPA en tejidos y fluidos humanos

Debido a la baja persistencia ambiental del BPA, y gracias a que la mayor parte del compuesto se excreta con facilidad y gran rapidez, la comunidad científica había considerado poco relevante la exposición a BPA. Por esta razón, hasta hace poco, muchos científicos creían que la forma activa del BPA no se podría encontrar en tejidos o fluidos biológicos y, por tanto, no podrían detectarse niveles significativos en grupos de población más susceptibles, como los niños, especialmente durante el embarazo y la primera infancia. Sin embargo, estudios realizados en Alemania y Japón, ya mencionados, han confirmado recientemente que los niños están expuestos a BPA antes del nacimiento (Takada *et al.*, 1999; Schonfelder *et al.*, 2002) y que este compuesto puede atravesar la placenta (Uchida *et al.*, 2002).

Es evidente que estas determinaciones han sido realizadas en algunos países desarrollados. La contaminación por BPA en habitantes de países poco desarrollados, permanece aún sin estudiar.

I.4.1.1. Suero, sangre y fluidos asociados al embarazo

Las técnicas usadas para medir BPA en suero humano han incluido cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), previa derivatización química seguida de espectrometría de masas, y técnicas de ELISA, todas con rango de sensibilidad para BPA (en suero) de 0,01-0,5 ng/ml.

Debido a las bajas concentraciones de este compuesto, observadas en las distintas matrices biológicas analizadas, son necesarias metodologías precisas para poder cuantificarlas. Este requisito se cumple en las técnicas basadas en

espectrometría de masas, ya que la detección es altamente selectiva, siendo además, los Límites de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ) suficientemente bajos para determinar BPA y sus metabolitos. Además, en el caso de la Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas (CG/EM), la separación cromatográfica es muy reproducible. Si se compara la CG/EM con la Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas en tándem (CL/EM-EM), una ventaja de esta última es el alto rendimiento, debido a la ausencia del paso de derivatización para generar derivados volátiles de BPA. En cuanto a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), los equipos que disponen de detector electroquímico tienen la sensibilidad necesaria, y la incorporación de detectores culométricos en serie añade, además, una alta selectividad. Cuando se usan detectores de fluorescencia, pueden producirse interferencias con otros compuestos fluorescentes, además de reducirse la selectividad, al ser necesaria la excitación de BPA.

Desde 1999 (Sajiki, 1999), más de una docena de estudios, utilizando técnicas analíticas distintas, han medido concentraciones de BPA libre, no conjugado, en suero y otras muestras humanas, encontrando valores que van desde 0,2-20 ng/ml de sangre, a más de 100 ng/g de tejido placentario. Estos estudios han examinado sangre, tanto de hombres como mujeres, de distintos países y con diferentes rangos de edad (*Tabla 1.2*).

Tabla 1.2 Rangos de concentración de BPA en distintas muestras humanas

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	ESTUDIO
Cordón umbilical	1,6 ng/ml	Takada <i>et al.</i> , 1999
Sangre (población sana)	0,32 ng/ml	Inoue <i>et al.</i> , 2000
Sangre (varones)	1,49 ± 0,11 ng/ml	Takeuchi & Tsutsumi, 2002
Sangre (mujeres)	0,64 ± 0,10 ng/ml	Takeuchi & Tsutsumi, 2002
Sangre (mujeres con sínd. de poliquistosis ovárica)	1,04 ± 0,10 ng/ml	Takeuchi & Tsutsumi, 2002

Fluidos foliculares (fertilización in vitro)	2,4 ± 0,8 ng/ml	Ikezuki <i>et al.</i> , 2002
Sangre (primeros meses del embarazo)	1,5 ± 1,2 ng/ml	Ikezuki <i>et al.</i> , 2002
Fluido amniótico	8,3 ± 8,9 ng/ml	Ikezuki <i>et al.</i> , 2002
Sangre materna (último trimestre del embarazo)	3,1 ng/ml (mediana) 0,3-18,9 ng/ml	Schonfelder <i>et al.</i> , 2002
Cordón umbilical	2,3 ng/ml (mediana) 0,2-9,2 ng/ml	Schonfelder <i>et al.</i> , 2002
Placenta	12,7 ng/g (mediana) 1,0-104,9 ng/g	Schonfelder <i>et al.</i> , 2002
Fluido amniótico	0,26 ng/ml (mediana)	Yamada <i>et al.</i> , 2002
Sangre materna	2,24 ng/ml (mediana)	Yamada <i>et al.</i> , 2002
Sangre materna (mujeres embarazadas)	0,46 ± 0,20 ng/ml	Kuroda <i>et al.</i> , 2003
Cordón umbilical	0,62 ± 0,13 ng/ml	Kuroda <i>et al.</i> , 2003
Sangre (varón estéril)	0,46 ± 0,20 ng/ml	Kuroda <i>et al.</i> , 2003
Cordón umbilical	4 ng/ml	Tan & Mohd, 2003
Sangre (mujeres premenopausicas)	2,5 ± 1,5 ng/ml	Hiroi <i>et al.</i> , 2004
Sangre (mujeres con hiperplasia endometrial)	2,9 ± 2,0 ng/ml	Hiroi <i>et al.</i> , 2004
Sangre (mujeres)	1,17 ± 0,09 ng/ml	Takeuchi <i>et al.</i> , 2004
Sangre (mujeres sanas)	0,77 ± 0,38 ng/ml	Sugiura-Ogasawara <i>et al.</i> , 2005
Sangre (mujeres con aborto recurrente)	5,23 ± 2,59 ng/ml	Sugiura-Ogasawara <i>et al.</i> , 2005
Sangre (varones y mujeres)	0,5 ng/ml	Völkel <i>et al.</i> , 2005
Sangre (varones y mujeres)	0,71 ± 0,29 ng/ml	Fukata <i>et al.</i> , 2006
Sangre (mujeres embarazadas)	ND-66,48 µg/ml	Lee <i>et al.</i> , 2008
Sangre (cordón umbilical)	ND-8,86 µg/ml	Lee <i>et al.</i> , 2008

Sangre (mujeres sanas y con endometriosis)	2,91 ± 1,74 µg/ml	Cobellis <i>et al.</i> , 2009
Sangre (varones y mujeres)	2,84 µg/ml	He <i>et al.</i> , 2009

ND: No detectable

La observación detallada de este conjunto de datos sugiere que la determinación de BPA en suero humano requiere métodos sensibles con límites de detección por debajo de 1 ng/ml. De hecho, estudios más antiguos a los mencionados no consiguieron detectar BPA en muestras de suero humano, por utilizar métodos de detección mucho menos sensibles que los más actuales (Inoue, 2000). Además, este nivel de sensibilidad en el método ve reforzado su interés por el hecho de que:

1) los niveles circulantes de BPA no conjugado, biológicamente activo, en sangre de animales de experimentación expuestos de forma puntual a bajas dosis, se encuentran en el rango de concentración de picogramos a nanogramos por mililitro (Zalko *et al.*, 2003), y

2) se ha demostrado una respuesta a la acción de BPA, en cultivos celulares, en rango de concentración de picogramos a nanogramos por mililitro (Welshons *et al.*, 2006).

Varios estudios han examinado los niveles de BPA en suero de mujeres embarazadas, sangre de cordón umbilical y plasma fetal (Schonfelder *et al.*, 2002; Ikezuki *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Tan & Ali Mohd, 2003). Otros investigadores han medido niveles de BPA en tejido placentario y líquido amniótico (Schonfelder *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Ikezuki *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2009). Los resultados de todos ellos son particularmente interesantes, ya que resaltan los altos niveles de BPA durante el embarazo y confirman que el BPA traspasa la barrera placentaria materno-fetal.

En un trabajo publicado por Ikezuki y colaboradores, donde se analizaban muestras de suero de mujeres embarazadas, encontraron niveles medios de

BPA de 1,4-2,4 ng/ml, mientras que el líquido amniótico de fetos de 15 a 18 semanas mostró niveles medios por encima de 8,3 ng/ml, pero estos niveles caían a una media de 1,1 ng/ml al final del embarazo (Ikezuki *et al.*, 2002). Los autores de este estudio proponen que el BPA puede acumularse en épocas fetales tempranas, debido a menor aclaramiento metabólico de BPA. También se postula que los menores niveles en la gestación tardía son debidos a la ingestión de grandes cantidades de líquido amniótico por parte del feto, que permiten al BPA convertirse en BPA conjugado, por acción del hígado fetal. Sin embargo, la evidencia sobre esta hipótesis es todavía insuficiente.

Los cambios metabólicos asociados con el embarazo, podrían causar alteraciones en el metabolismo y excreción de BPA. Takahashi y Oishi estudiaron la metabolización y excreción de BPA tras la administración oral de 1g de BPA/kg a ratas embarazadas en el día 18 de gestación (Takahashi & Oishi, 2000). Se detectó BPA en la sangre materna dentro de los primeros diez minutos siguientes a la administración de la dosis (2,89 µg/g), alcanzando el pico máximo a los 20 minutos (14,7 µg/g), y disminuyendo gradualmente a lo largo de un periodo de 10 horas. También se detectó BPA en el feto a los 10 minutos tras la dosis (2,00 µg/g), y la concentración máxima se alcanzó a los 20 minutos (9,22 µg/g), cuantificándose después niveles gradualmente menores. La concentración después de 6 horas desde la exposición fue del 5% del nivel máximo detectado. Este estudio muestra que la absorción de BPA por la madre y el feto es rápida, y que la placenta no bloquea la transferencia del compuesto.

Zalko y colaboradores han demostrado que dosis mucho más bajas (25 µg/kg) pueden cruzar también la barrera placentaria (Zalko *et al.*, 2003). 24 horas después de la administración, el balance en el feto muestra un 4% de la radioactividad administrada, con un valor medio de 3,7 ng/g. La placenta mantiene el 0,55% del BPA administrado (3,14 ng/g) y el líquido amniótico contiene el 0,34% (4,85 ng/ml). Un estudio adicional en hembras de ratón embarazadas, a las que se administraron 100 mg/kg en el día 17 de embarazo, determinó que el BPA puede ser detectado en suero, hígado, cerebro, útero y testículo a los 30 minutos de la administración (Uchida *et al.*, 2002).

I.4.1.2. Leche materna

Otra vía potencial de exposición a BPA es a través de la leche materna. Debido a que el BPA es un compuesto ligeramente lipofílico, puede eliminarse a través de la grasa en la leche materna. Así, Sun y colaboradores encontraron BPA en la leche materna de la totalidad de población examinada (23 madres sanas), en un rango de concentración de 0,28 a 0,97 ng/mL y con una concentración media de 0.61 ng/mL (Sun *et al.*, 2004). En un estudio similar, Ye y colaboradores detectaron BPA libre en el 60% de las muestras analizadas y BPA total (incluyendo BPA libre y BPA conjugado) en el 90% de las muestras, con un valor medio de 1,9 ng/mL (Ye *et al.*, 2006).

Otro estudio de interés midió concentraciones de BPA en calostro humano, leche producida durante los 3 primeros días después del nacimiento (Kuruto-Niwa *et al.*, 2007). Esta leche materna, se caracteriza por tener alto contenido en anticuerpos, carbohidratos y proteínas, y bajo contenido de grasa. El estudio examinó 101 muestras, detectando BPA en un rango de valores de 1-7 ng/ml y con una concentración media de 3,41 ng/mL. Las diferencias encontradas entre los valores detectados en la leche materna recolectada después de una semana tras el nacimiento, y los valores obtenidos en la leche recogida en la primeras horas post-parto, pudieran deberse a diferencias en el método analítico empleado para el análisis. Los autores emplearon técnicas analíticas diferentes: HPLC con detector de fluorescencia en el primer caso y ELISA en el segundo, aunque es más probable que cambios producidos en la metabolización del BPA sean los causantes de la disminución de los niveles de compuesto con el transcurso del período de lactancia.

I.4.1.3. Orina

Desde el estudio de Brock y colaboradores (Brock *et al.*, 2001), numerosos estudios han medido BPA en orina humana de diversos colectivos, fundamentalmente de adultos, en países igualmente diversos. Algunos de ellos han quedado referidos en anteriores apartados de esta memoria (Hanaoka *et*

al., 2002; Kim *et al.*, 2003; Arakawa *et al.*, 2004; Fujimaki *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Völkel *et al.*, 2005; Fukata *et al.*, 2006; Miyamoto & Kotake, 2006; Yang *et al.*, 2003 y 2006; Lang *et al.*, 2008).

La mayor parte del BPA en orina está en forma conjugada, como BPA-glucurónido o BPA-sulfato. Es por ello que la mayoría de los estudios que determinan niveles de BPA en orina usan tratamientos enzimáticos previos, tales como incubación con glucuronidasa y/o sulfatasa, expresando finalmente los resultados como BPA total (la suma de BPA libre/no conjugado más BPA conjugado) en orina. Otros estudios también examinan orina sin procesar, donde determinan solamente niveles de BPA libre. Por encima de los detalles técnicos, todos estos estudios confirman la alta exposición humana a BPA, como ya se ha comentado en los estudios descriptivos de BPA en otros fluidos biológicos (sangre, leche, placenta, etc.). Los valores de BPA en orina suelen corregirse con las cifras de aclaramiento de creatinina, para tener en cuenta las diferencias de volumen de orina emitido en la micción.

Conociendo los niveles de BPA en orina, se pueden estimar, mediante extrapolación, los niveles de exposición diaria a BPA. Así, Ouichi y Watanabe, usando muestras de la primera orina de la mañana en mujeres, estimaron que la absorción diaria de BPA era de 0,6-71,4 µg/día (Ouichi & Watanabe, 2002). Aunque estos valores son solo estimaciones de los niveles de exposición, proporcionan datos útiles para la evaluación del riesgo humano.

El estudio realizado en Japón por Matsumoto y colaboradores, estimó que los niveles de BPA en estudiantes universitarios podrían ser de más de 10 µg/g de creatinina, y que una fuente significativa de exposición a BPA serían las latas que contienen café y bebidas con té que consumían los sujetos participantes (Matsumoto *et al.*, 2003). Sin embargo, los niveles de exposición a BPA estarían decreciendo, debido a las modificaciones adoptadas en los procesos de enlatado.

Los estudios recientes ya mencionados, conducidos por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC-Centers for Disease Control) en Estados

Unidos, han detectado BPA en el 95% de población adulta americana (estudio basado en una población de referencia constituida por 394 adultos (Calafat *et al.*, 2005)). En estos estudios se han encontrado niveles medios de BPA en muestras de orina de hombres y mujeres de 1,63 y 1,2 ng/ml, respectivamente. Los niveles encontrados en rango, valores medios y mediana, son muy similares a los descritos en muestras de sangre humana. Otro estudio realizado en 90 chicas jóvenes obtuvo resultados similares, detectando BPA en el 94% de las muestras (Wolff *et al.*, 2007).

Seguramente debido a la facilidad de obtención de la muestra, y teniendo en cuenta las rutas de eliminación de BPA en humanos, la determinación de BPA en orina está siendo utilizada por los investigadores para la evaluación de muestras de población cada vez más numerosas (Calafat *et al.*, 2008; Mahalingaiah *et al.*, 2008; Völkel *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

De particular interés son los muy recientes estudios que han medido BPA en orina de distintos colectivos infantiles. Las concentraciones encontradas se muestran en la *Tabla 1.3*.

Tabla 1.3 Concentraciones de BPA encontradas en orina de diferentes colectivos infantiles.

MUESTRA	NIVEL	ESTUDIO
Orina (90 niñas. Edad 6-9 años)	Detección: 94 % GM BPA total: 2,0 µg/L	Wolff <i>et al.</i> , 2007
Orina (35 niños. Edad aprox. 6 meses)	Detección: 95 % GM BPA total: 3,4 µg/L	Teitelbaum <i>et al.</i> , 2008
Orina (104 niños/as. Edad 7 a 12 años)	Detección: >86% GM BPA total: 2,66 µg/g creatinina	Yamano <i>et al.</i> , 2008
Orina (600 niños/as. Edad 3-14 años)	Detección: 99 % GM BPA total: 2,7 µg/L	Becker <i>et al.</i> , 2009
Orina (42 prematros UCI neonatal)	Detección: >90 % Media BPA: 30,3 µg/L	Calafat <i>et al.</i> , 2009

GM: Media geométrica

I.4.1.4. Semen y líquido folicular

Un número limitado de estudios han examinado niveles de BPA en otros fluidos corporales, tales como líquido folicular (Ikezuki *et al.*, 2002) y semen (Inoue *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2003). Los niveles de BPA medidos en líquido folicular muestran un valor medio de 2,0 ng/ml (Ikezuki *et al.*, 2002). Sin embargo, estas determinaciones se han realizado en líquido folicular de mujeres sometidas a procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV), por lo que no son representativos de la población general; además, se desconoce si el nivel de BPA detectado en líquido folicular durante el proceso de la FIV, constituye un biomarcador de exposición y efecto, jugando un papel causal en fertilidad femenina. Los niveles de BPA en líquido folicular tendrían un interés particular, dado que se ha comprobado que la administración de bajas dosis de BPA por vía oral a ratones adultos, causan anomalías en la división celular y aneuploidia en oocitos (Hunt *et al.*, 2003).

Los niveles de BPA también se han examinado en el semen, y varían de manera significativa según el método analítico empleado. Así, cuando se utiliza un doble sistema de detección mediante ELISA o cromatografía HPLC con espectrometría de masas (límites de detección: 0,5 y 2,0 ng/mL, respectivamente) para cuantificar niveles de BPA, y se comparan los resultados obtenidos, se comprueba que mientras la técnica ELISA detecta valores medios de 5,1 ng/ml, la cromatografía-espectrometría no detectó BPA en ninguna de las muestras analizadas (Inoue *et al.*, 2002). Los autores sugieren que los resultados de la ELISA podrían ser imprecisos debido a interacciones no específicas con anticuerpos anti-BPA. En otro estudio, Katayama y colaboradores tampoco detectaron BPA en ninguna de las muestras recogidas de 57 hombres donantes de semen, en una clínica de FIV empleando una digestión previa de las muestras con proteinasa K, seguido de HPLC con electroforesis capilar (límite de detección 1 pg/mL) (Katayama *et al.* 2003). A la vista de los resultados, y considerando la sensibilidad de los ensayos usados, parece poco probable que BPA pueda detectarse en muestras de semen humano.

I.4.2. Factores asociados a la exposición a BPA

Algunos trabajos de investigación han tratado de buscar factores condicionantes de la exposición a BPA. Así, algunos autores han encontrado concentraciones séricas de BPA significativamente más altas en los hombres que en las mujeres (Takeuchi & Tsutsumi, 2002), aunque otros trabajos no han llegado a las mismas conclusiones: un estudio coreano realizado entre individuos adultos, se diseñó con el objetivo de buscar posibles diferencias de género en los niveles de BPA en muestras de orina (Kim *et al.*, 2003). El estudio no encontró diferencia notable entre sexos, ya que los niveles medios de BPA total para hombres y mujeres fueron de 2,82 y 2,76 ng/ml, respectivamente. Es interesante, sin embargo, destacar que los hombres tenían valores significativamente más altos de BPA-glucurónido (2,34 frente a 0,49 ng/ml).

Tres estudios recientes, 2 de ellos realizados en Estados Unidos, y un tercero en China, han determinado BPA en orina, y han estudiado los factores asociados a los niveles encontrados. Calafat y colaboradores detectaron BPA en el 92,6% de la población (n=2517), con concentraciones significativamente mayores para mujeres respecto a hombres y para niños respecto a adolescentes y adultos, detectando diferencias, también significativas, atendiendo a determinados factores demográficos como raza o clase social (menores niveles en mejicanos que en blancos y negros no hispanos, y mayores en el grupo de renta familiar más baja) (Calafat *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que tanto etnicidad como clase social, podrían ser factores que condicionan la exposición a BPA. Mahalingaiah y colaboradores, en varias muestras obtenidas de 82 individuos, detectan BPA en una concentración media de 1,20 µg/L (rango de 0,4 a 42,6 µg/L). En este estudio, edad, sexo e índice de masa corporal, no resultaron factores predictores de la concentración obtenida (Mahalingaiah *et al.*, 2008). En el tercer estudio, realizado en China sobre 952 sujetos de ambos sexos no ocupacionalmente expuestos, He y colaboradores encontraron mayores concentraciones en sangre y orina en las mujeres y en los sujetos fumadores (He *et al.*, 2009).

1.4.3. Asociación entre exposición a BPA y enfermedad en humanos

Algunos estudios han descrito la relación existente entre los niveles de BPA en sangre y el síndrome de ovarios poliquísticos, lo que podría estar relacionado, a su vez, con los niveles circulantes de hormonas esteroideas, por ejemplo, testosterona (Takeuchi & Tsutsumi 2002; Takeuchi *et al.*, 2004). Takeuchi & Tsutsumi encontraron un incremento significativo de los niveles de BPA en suero de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS). Los autores argumentaron que los mayores niveles de BPA podrían deberse a que las mujeres con PCOS tienen mayores niveles de testosterona que mujeres control, sugiriendo que las diferencias en los niveles de BPA estarían relacionadas con los niveles de andrógenos.

También se ha descrito la asociación entre obesidad y exposición a BPA, de forma que las mujeres obesas con y sin síndrome de ovarios poliquísticos presentan niveles de BPA séricos significativamente más altos que las mujeres normales, no obesas (Takeuchi *et al.*, 2004). La presencia de BPA en sangre ha sido relacionada con el aborto recurrente (Sugiura-Ogassawara *et al.*, 2005) de forma que las mujeres con historia de 3 o más abortos consecutivos en el primer trimestre, tenían niveles de BPA 3 veces mayores que mujeres nulíparas sin antecedentes de aborto. También se ha relacionado la presencia de BPA en suero con la incidencia de hiperplasia de endometrio, un trastorno uterino relacionado con la exposición a estrógenos (Hiroi *et al.*, 2004). El estudio, que compara los niveles de BPA en la sangre de mujeres con diferentes patologías ginecológicas (mujeres normales, mujeres con hiperplasia endometrial benigna y mujeres con hiperplasia endometrial compleja, potencialmente maligna) describe que las mujeres con hiperplasia endometrial compleja presentaban los niveles de BPA en sangre más bajos que el resto de las mujeres analizadas.

Hasta la fecha tan solo se han publicado dos estudios epidemiológicos transversales con suficiente tamaño muestral (n=1455 y 250), cuyo objetivo haya sido el estudio de la asociación entre exposición a BPA y efectos en la

salud de población humana. El primero, utiliza las muestras y la información obtenida de la encuesta de nutrición y salud americana (NHANES CDC, 2007a y 2007b), que incluye la biomonitorización de la exposición a un gran número de contaminantes medioambientales. Un tercio de los participantes (n=1455), adultos aleatoriamente seleccionados, proporcionaron una muestra de orina que fue utilizada para el análisis de BPA total (libre y conjugado). El estudio estadístico de los resultados reveló que altas concentraciones de BPA se asociaban positivamente con la prevalencia de diabetes y problemas cardiovasculares, así como con toxicidad hepática, reflejada en mayores niveles de las enzimas γ -glutamyl-transferasa y fosfatasa alcalina (Lang *et al.*, 2008).

El segundo estudio (Braun *et al.*, 2009), relaciona los niveles de BPA en orina durante el embarazo de 249 madres, con la conducta de sus hijos, evaluada a los 2 años de edad mediante las escalas BASC-2 (Behavioral Assessment System for Children) y Parent Rating Scale for preschoolers (Reynolds & Kamphaus, 2002). El estudio concluye que existe una relación entre mayor exposición prenatal a BPA (niveles más altos en la orina de la madre durante el embarazo) y alteraciones del comportamiento en sus hijos a los 2 años de edad, más notables aún en las niñas. El comportamiento alterado se etiquetó, según la evaluación del BASC-2, como hiperactividad.

Los resultados de los estudios realizados no solo muestran relación de los niveles de BPA con enfermedades o alteraciones que tienen que ver con su condición de xenoestrógeno. El mencionado estudio de Braun y colaboradores relaciona BPA con alteraciones del comportamiento, y otro estudio del mismo año (Meeker *et al.*, 2009), confiere al BPA efectos antitiroideos. En el estudio de Meeker, sobre muestras de orina y suero tomadas de forma simultánea a 167 hombres reclutados en una clínica de infertilidad, se advierte una relación entre valores altos de BPA en orina con elevados niveles de FSH, junto a bajos niveles de inhibina B, ambas condiciones predictoras de baja calidad espermática. Pero, adicionalmente, los investigadores encontraron una relación inversa entre niveles altos de BPA en orina y niveles séricos de TSH,

relación ya sugerida en un estudio anterior, realizado en anfibios (rana toro) (Kaneko *et al.*, 2008).

Serán necesarias nuevas investigaciones, que permitan no sólo conocer los niveles de exposición a BPA en la población, sino también determinar fuentes de BPA no identificadas, así como todo lo concerniente a posibles diferencias en el metabolismo del BPA entre poblaciones, categorizando por grupos de edad y género, y susceptibilidad. Desgraciadamente, las limitaciones de los estudios epidemiológicos comentados (diseño, tamaño muestral, etc.) impiden establecer una relación inequívoca de causalidad entre exposición a BPA y enfermedad.

I.5. SUMARIO

En la última década, numerosos estudios han tratado de monitorizar los niveles de exposición a BPA en el hombre, utilizando para ello distintas matrices biológicas: sangre (suero y plasma), leche materna, líquido amniótico y tejido placentario, orina y otros fluidos, con niveles en rango de ng/mL o ng/g de tejido, y han concluido que la mayoría de la población está expuesta a BPA. De particular interés son los niveles que se han encontrado en sangre de mujeres embarazadas, sangre fetal, cordón umbilical, placenta y líquido amniótico. Debido a la alta sensibilidad del feto en desarrollo a la exposición a compuestos que se comportan como hormonas y otros compuestos químicos, los niveles detectados son especialmente preocupantes.

Se ha propuesto que los xenoestrógenos tales como el BPA, pueden jugar un papel tanto en cánceres del aparato reproductor (testículo, próstata, mama, útero, ovario, etc.), como en problemas de fertilidad (bajo recuento espermático, descenso de la calidad del esperma) y otras alteraciones relacionadas con las hormonas. En este momento, solo unos pocos estudios han explorado las relaciones entre los niveles de BPA y cuestiones de salud humana. Sin embargo, estos datos limitados justifican nuevos estudios para

establecer conexiones firmes entre la exposición al BPA y enfermedades humanas. Actualmente se cree que los niveles de BPA varían entre hombres y mujeres, y/o con varios síndromes o enfermedades relacionadas con las hormonas, incluyendo síndrome de ovarios poliquísticos y obesidad, los cuales han sido inducidos en animales de experimentación mediante exposición a bajas dosis de BPA.

Lo cierto es que numerosos productos de consumo contienen y liberan BPA. El contenido en BPA ha sido medido en contenedores de comida, resinas epoxi, plásticos, biberones y selladores dentales, y las tasas de liberación han sido medidas desde muchos de esos productos bajo condiciones normales de uso. BPA ha sido detectado en un amplio rango de alimentos envasados en latas con resinas epoxi. Además, ha sido descrito como un contaminante habitual en agua potable, agua de río, aguas residuales, aire y partículas de polvo. En conjunto, estos estudios indican que la exposición a BPA es generalizada, y tiene su origen en muy variadas fuentes en el medio ambiente. Hay numerosos estudios que han facilitado estimaciones de la exposición actual a través de productos de consumo. Estos estudios han servido para definir que la exposición humana oscila entre $<1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ y $5 \mu\text{g} /\text{kg}/\text{día}$ ($0,325 \text{ mg}/\text{día}/\text{adulto}$). Sin embargo, modelos toxicológicos han sugerido que se requiere una ingesta oral superior a $100 \text{ mg}/\text{kg}/\text{adulto}$ para explicar los niveles circulantes en humanos hasta ahora publicados. No obstante, el hallazgo de BPA en la mayoría de los individuos demuestra que estos están expuestos a BPA de manera continua y a través de vías de exposición diversas. En relación con los niveles medibles de BPA que se han detectado en sangre humana y orina, Welshons y cols., sugieren dos cuestiones importantes a tener en cuenta:

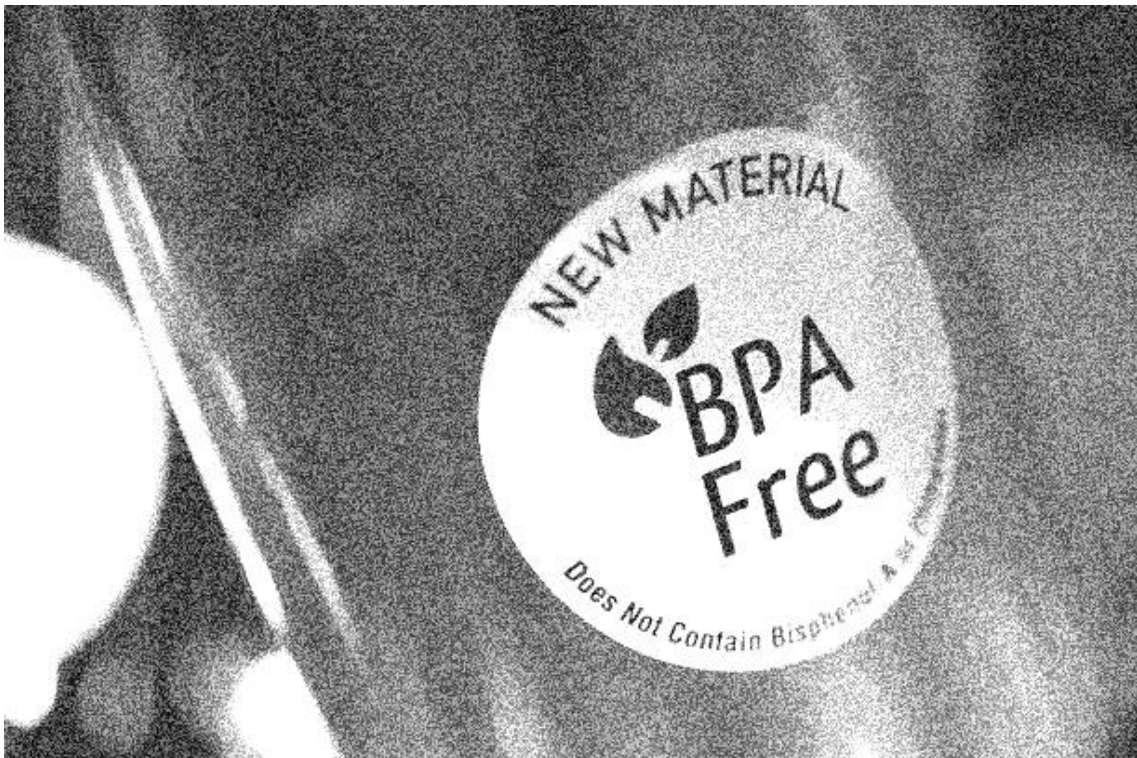
- 1) La exposición a BPA debe ser mucho mayor de lo que se ha sugerido.
- 2) A largo plazo, la exposición continua ocasionaría bioacumulación de BPA, lo que supone niveles de BPA que no están representados por ninguno de los actuales modelos de metabolismo de BPA propuestos, basados en administraciones agudas y únicas (Welshons, 2006).

Los niveles de BPA medidos en suero humano, orina y otros tejidos, están dentro del rango descrito como causante de efectos en animales de laboratorio, así como en ensayos *in vitro*. Por lo tanto, es perfectamente plausible, e incluso probable, que estos niveles sean biológicamente activos en humanos, con potencial obvio de causar enfermedades ó disfunciones particulares.

Conocemos algunas iniciativas decididas, como la del Gobierno de Canadá (Health Canada, 2008), y en ámbito más local, la del Departamento de Salud Pública del Estado de Massachusetts (USA) y la del Centro de Investigación y Política Ambiental del Estado de California (USA). Pero es necesaria una toma de postura general por parte de Gobiernos y legisladores, encaminada a:

- 1) Facilitar información a los consumidores acerca de la existencia de BPA y sus efectos potenciales, así como de las fuentes de exposición más cercanas y habituales.
- 2) Dictar normas que obliguen a fabricantes y proveedores a avisar de la existencia del polímero en sus productos, fundamentalmente en productos para alimentación, e inexcusablemente, en productos para nutrición y uso por parte de la población infantil.
- 3) Incentivar la fabricación alternativa de envases o productos que no lo contengan.
- 4) Promover la investigación en este campo. Caracterizar las vías de exposición y los niveles individuales de los contaminantes ambientales más habituales con efectos sobre la salud, permitirá monitorizar los niveles en la población general en diversas zonas geográficas. El estudio conjunto de la predisposición genética, la exposición ambiental y la nutrición, junto con el contexto social, familiar y los estilos de vida, permitirán identificar factores predictores de riesgo para la salud, así como desarrollar medidas preventivas adecuadas.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La relación existente entre exposición a sustancias químicas con actividad hormonal (disruptores endocrinos-DE) a lo largo de la vida, especialmente en periodos de susceptibilidad particular como el periodo pre y postnatal, y la aparición de patologías en la vida adulta, constituye un problema complejo y de difícil enjuiciamiento. En primer lugar, porque la exposición del ser humano a DE puede ser tanto de carácter ocupacional como ambiental, en el sentido más amplio del término, y ocurre a través de múltiples vías, incluyendo el agua, la comida, el aire, el contacto con el suelo, o mediante el uso de productos de aseo personal. Además, en algunos casos, la vía de exposición puede no ser evidente –exposición inadvertida-, lo que limita la identificación de la fuente y se une a la dificultad de encontrar poblaciones totalmente libres de exposición, que sirvan de referencia. La evaluación del riesgo de exposición del niño define el ámbito del conocimiento científico en el que se enmarca la investigación propuesta.

En segundo lugar, porque el establecimiento de una relación de causalidad entre exposición a DE y enfermedad no es sencillo, a pesar de la demostración fehaciente de exposición humana. También es cierto que la demostración del efecto de los DE sobre la salud se ha limitado al estudio de enfermedades complejas, de causa multifactorial y con prolongados tiempos de latencia, en las cuales la exposición a DE es un factor más, no exclusivo ni excluyente, en la etiología de la enfermedad.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han permitido establecer un protocolo de evaluación de la exposición a DE, que ha sido de utilidad en el estudio de enfermedades de base hormonal, como el cáncer de mama o

algunas malformaciones congénitas (criptorquidia e hipospadias). Tanto la medida de compuestos químicos de forma individualizada, como la estimación de la actividad hormonal resultante en los extractos titulares, son dos formas igualmente útiles de aproximación a la estimación de la exposición. Mediante la cuantificación química de algunos residuos, es posible conocer el nivel de exposición, identificar los compuestos químicos más frecuentes en la población de estudio, incluidos los factores que la han condicionado, y establecer un procedimiento de seguimiento de las fuentes de exposición.

El presente estudio se enmarca dentro de los objetivos planteados en el proyecto de investigación *“Evaluación de la exposición a xenoestrógenos en población infantil de la provincia de Granada, e identificación de factores asociados a la exposición”* llevado a cabo por un grupo multidisciplinar de clínicos, investigadores básicos y epidemiólogos de distintas instituciones, financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (Proyecto nº 202/04), por la Red de Excelencia del VI Programa Marco de la Unión Europea “CASCADE” (Proyecto FOOD-CT-2003-506319), y por el proyecto europeo del VI Programa Marco “CONTAMED” (Proyecto ENV-212502). La consecución de los objetivos del Proyecto pretende contribuir a la determinación del grado de exposición y al esclarecimiento de las vías por las cuales esta exposición ocurre, para el compuesto químico bisfenol-A y sus derivados clorados, clasificados como disruptores endocrinos.

II.1. Hipótesis

La población infantil andaluza ha estado y está expuesta a compuestos químicos DE, principalmente a través de la alimentación, pudiéndose acumular estos compuestos en los tejidos corporales, dependiendo de su carga lipídica, por lo que el muestreo de tejido adiposo y sangre pueden ser buenos indicadores de exposición humana. Además, las propiedades mismas de cada uno de los contaminantes ambientales, en lo que se refiere a su lipofilidad, así como las características personales –edad, sexo, entorno, alimentación, patología, entre otros- determinan la magnitud de la exposición.

II.2. Objetivos

II.2.1. Objetivo General:

- Caracterizar el grado de exposición a compuestos químicos con reconocido carácter estrogénico, bisfenol-A y derivados clorados, en una muestra de la población infantil, de edad comprendida entre 1 y 14 años, de la provincia de Granada.

II.2.2. Objetivos específicos:

- Describir el nivel de exposición individual en la población infantil, atendida en el Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada, mediante la caracterización química en muestras biológicas de suero y tejido adiposo

- Identificar los principales factores asociados a la exposición a bisfenol-A y derivados clorados en esta población, analizando la asociación de los parámetros de exposición determinados con las características sociodemográficas, el estilo de vida, las condiciones de salud y los hábitos alimentarios.

III. MATERIAL Y MÉTODOS



III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. DISEÑO DEL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

III.1.1. Tipo de estudio

Con el objeto de alcanzar los objetivos planteados, anteriormente descritos, se diseñó un estudio transversal descriptivo sobre una muestra de población de base hospitalaria que acudió al servicio de Cirugía Pediátrica del hospital de referencia de la provincia de Granada, entre junio de 2004 y enero de 2006.

El estudio se llevó a cabo sobre una muestra de población del área geográfica definida por el hospital de reclutamiento: el Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada (HUVN).

Inicialmente se realizó un estudio piloto, en el mismo hospital, sobre 25 pacientes, para comprobar la coordinación entre el personal investigador, la viabilidad de la metodología y la obtención de datos preliminares de la población, que permitieran una mejor planificación del estudio.

III.1.2. Población de referencia

Población infantil de la provincia de Granada y parte de la provincia de Jaén, correspondiente esta al municipio de Alcalá la Real, ya que la población de este municipio de Jaén acude habitualmente al hospital en Granada, por razones de proximidad geográfica, comunicaciones y costumbre.

III.1.3. Población de estudio

La población de estudio elegible fue sujetos de ambos sexos de edad inferior a 14 años que acude al servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves”, procurando máxima representatividad de diferentes grupos de edad, sexo y patología de intervención. La muestra de población se recogió teniendo en cuenta los criterios de inclusión establecidos, además de acceder voluntariamente a participar en el estudio, firmando para ello el consentimiento informado.

Como **causas de inclusión** se establecieron las siguientes:

- Sujetos de ambos sexos
- Edad inferior a 14 años
- Patología susceptible de intervención quirúrgica en el servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves”
- Aceptación a participar en el estudio

Como **causas de exclusión** se establecieron las siguientes:

- Recién nacidos prematuros, cuya intervención fuera realizada en el período neonatal
- Enfermedad neoplásica
- Síndromes polimalformativos
- Negativa a participar en el estudio

III.1.4. Tamaño muestral

Para la realización del estudio se seleccionó una muestra de 125 niños de ambos sexos. Este tamaño muestral se estableció conforme a criterios de factibilidad de captación de sujetos en el servicio de Cirugía Pediátrica durante el período de estudio establecido, y de operatividad económica y de tiempo preciso para el procesamiento de los análisis químicos y biológicos, así como para construir modelos con un número razonable de variables predictoras.

Debido al desconocimiento previo de los valores de exposición de la población infantil, esta información no pudo ser utilizada en la estimación del tamaño muestral.

De los 120 niños contactados, 14 padres o tutores no estuvieron de acuerdo en participar en el estudio (11,7%), y 27 (21,6%) no pudieron ser finalmente incluidos, por defecto de recogida de información o de la muestra de tejido adiposo. La muestra final fue de 79 niños (65,8%). Sin embargo, para las determinaciones analíticas en sangre, la muestra final fue de 61 (50,8%).

III.1.5. Procedimiento de muestreo

El responsable del Servicio de Cirugía Pediátrica entregaba al investigador el calendario de citas semanal con el listado de intervenciones de cirugía mayor ambulatoria pediátrica programadas y las encuestas a cumplimentar. Al padre/madre/tutor de cada paciente se le entregaba una hoja de presentación del proyecto (Ver Anexos) y eran informados de los objetivos y procedimiento del estudio, solicitando su participación. La colaboración en el estudio significaba responder al cuestionario, consentir que se obtuviera alguna información de su historia clínica y acceder a que en la intervención quirúrgica se obtuvieran muestras de sangre y tejido adiposo. Si el padre/madre/tutor del paciente no quería participar, se rellenaba la hoja de no respuesta, incluida en la misma encuesta. Si accedía, se realizaba la encuesta durante la estancia del paciente en el hospital. Al tratarse de cirugía mayor ambulatoria, de estancia hospitalaria mínima, con relativa frecuencia los responsables del paciente no rellenaron la encuesta por marcharse del hospital antes de que el entrevistador pudiera realizarla, lo que fue interpretado como rechazo a la participación.

III.1.6. Variables de estudio

III.1.6.1. Variable dependiente

La variable dependiente viene determinada por el grado de exposición a Bisphenol A (BPA) y derivados clorados, de los individuos incluidos en el estudio. Se define como:

- *Valoración de la exposición mediante la caracterización química de las muestras de suero y de tejido adiposo.* En el acto operatorio, y aprovechando la vía para la anestesia, se obtuvo una muestra de sangre de 10 ml, salvo que existiera alguna circunstancia o contraindicación que desaconsejara este procedimiento. Durante la intervención se extrajo, además, una muestra de aproximadamente 0,5 g de tejido adiposo, procedente del tejido celular subcutáneo de las inmediaciones de la herida quirúrgica. Ambas muestras se identificaban y se congelaban a -80°C , almacenándose hasta el momento de su procesamiento. Tanto en la muestra de grasa como en la muestra de sangre se realizó un análisis químico para la identificación y cuantificación de BPA y derivados clorados, seleccionados por haber sido identificados como disruptores endocrinos.

III.1.6.2. Variables independientes

La información referente a factores asociados a la exposición se obtuvo mediante cuestionario epidemiológico *ad hoc*, realizado en el curso de una entrevista específica a cada familia. Las entrevistas fueron realizadas por una única persona entrenada para tal fin, una vez obtenida, directamente de los cirujanos, información acerca de los pacientes candidatos y de su disposición a participar en el estudio. El cuestionario utilizado, previamente validado en el estudio piloto, buscó información acerca de los factores que pudieran influir en las concentraciones obtenidas de BPA, separando las fuentes de exposición en grupos diferentes según su naturaleza.

El cuestionario (ver Anexo) estaba dividido en las siguientes secciones:

Hoja de no respuesta:

Se recogía información mínima acerca de si había sido informado previamente sobre el estudio, y del motivo por el cual no quería participar. Además, se recogió información acerca del sexo, edad y motivo de la intervención de estos sujetos.

Características socio-demográficas del sujeto de estudio:

- Fecha de nacimiento
- Sexo
- Residencia actual, tiempo de residencia y proximidad a zonas agrícolas y/o industriales, así como a invernaderos,
- Residencias a lo largo de la vida, tiempo vivido en cada una de ellas y proximidad de éstas a zonas agrícolas y/o industriales, así como a invernaderos.
- Segunda/s residencia/s, tiempo vivido en cada una y proximidad de éstas a zonas agrícolas y/o industriales, así como a invernaderos.

Características antropométricas del sujeto de estudio:

- Peso y talla, así como superficie corporal e índice de masa corporal, calculados a partir de los datos obtenidos de peso y talla.
- Existencia de pérdida importante de peso, por parte del paciente, en los últimos 12 meses.

Condiciones de salud del sujeto de estudio:

- Enfermedades padecidas y/o actuales
- Frecuencia de visita al dentista, número y tipo de empastes dentales, y tiempo transcurrido desde que le implantaron el último empaste (meses)
- Consumo de medicamentos durante los últimos 3 meses y específicamente durante la última semana, así como la causa que les llevó a tomarlos.

Aspectos relacionados con la dieta del sujeto de estudio:

- Tipo y cantidad de agua ingerida diariamente, así como el tipo de agua usado para cocinar.
- Tipo y cantidad semanal ingerida de diversos grupos de alimentos (carne, pescado, lácteos, vegetales, frutas y verduras)

- Número de latas de conserva ingeridas semanalmente.
- Variaciones en la dieta durante el último año.

Historia reproductiva de la madre:

- Número de embarazos y de hijos
- Lugar que ocupa el sujeto de estudio (primípara o multípara)
- Problemas de salud de algún hijo al nacer.
- Tiempo de lactancia

Estilo de vida de los progenitores:

- Nivel de estudios del padre y de la madre.
- Actividad laboral del padre y de la madre.
- Ocupación de los progenitores durante el embarazo de los sujetos de estudio
- Hábito tabáquico actual y pasado del padre y de la madre
- Consumo de alcohol, evaluado atendiendo al número de bebidas alcohólicas ingeridas por semana.

Otras variables de los progenitores:

- Exposición percibida a compuestos químicos. Sepidió a los padres que realizaran una estimación del promedio de horas semanales durante las cuales estaban en contacto con determinados productos químicos, y el lugar donde solía ocurrir dicha exposición.

III.2. METODOLOGÍA QUÍMICO-ANALÍTICA

III.2.1. Obtención y codificación de las muestras de tejido adiposo

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas en quirófano, durante la intervención quirúrgica. El peso aproximado de las muestras fue de 0,5 gramos.

Los cirujanos extrajeron las muestras siguiendo el protocolo aprobado previamente por el Comité de Ética del HUVN.

Las muestras de grasa fueron almacenadas en tubos de cristal y mantenidas a una temperatura de -80°C hasta el momento de su procesamiento analítico. Cada una de las muestras fue identificada siguiendo una codificación numérica, con el objeto de que fuera imposible relacionarlas con el sujeto de estudio durante el análisis químico y/o estadístico, como parte del protocolo de anonimización.

III.2.2 Obtención y codificación de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante venopunción cubital por personal adiestrado para la extracción de muestras biológicas. El volumen de sangre extraída fue de 10 ml lo que aseguraba un volumen de suero suficiente para la realización de toda la analítica necesaria en este estudio.

Tras la recolección, las muestras de sangre fueron centrifugadas para la obtención del suero que posteriormente fue transvasado a viales de congelación codificados y mantenidos a -80°C hasta su análisis. El volumen aproximado de suero obtenido tras la centrifugación fue de 4 ml.

III.2.3 Preparación, extracción y derivatización química de las muestras de tejido adiposo

Antes de efectuar el análisis químico de las muestras fue necesario someterlas a un proceso de preparación, extracción y derivatización química, con el objeto de aislar los compuestos químicos de interés del resto de sustancias presentes en las mismas.

Previamente a la extracción, las muestras se descongelaron hasta temperatura ambiente, en baño de hielo. Para la extracción de los compuestos a partir de las muestras de tejido adiposo, se ha desarrollado una metodología basada en

el método validado en trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Zafra *et al.*, 2003; del Olmo *et al.*, 2005; Ballesteros *et al.*, 2006). Para cada muestra, se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

Preparación de la muestra:

- Se pesa entre 0,2-0,3 g de muestra de tejido adiposo previamente descongelada.
- Se homogeniza la muestra con 6 ml de n-hexano empleando para ello un homogenizador de pistón.
- A continuación se añaden 2 ml de acetonitrilo a esta mezcla, y después de agitar durante 3 min, el sobrenadante se separa y se lleva completamente a sequedad en corriente de nitrógeno (extracto seco).
- Con anterioridad a la extracción, las muestras de tejido adiposo se fortificaron con 15 ml de una disolución acuosa que contiene bisfenol F (BPF), compuesto empleado como patrón interno.

Limpeza y preconcentración de la muestra mediante cartuchos de extracción en fase sólida (SPE):

- Los cartuchos de SPE empleados fueron los AccuBONDII ODS-C18 (silica-based bonded C18 cartridges, Agilent Technologies, Waldbron, Germany). Se acondicionan previamente añadiéndoles 3 ml de dietiléter, 3 ml de metanol y 3 ml de agua destilada, a una velocidad de 1–2 ml/min.
- Posteriormente se procede a la carga con la disolución preparada previamente por redisolución del extracto seco con 15 ml de agua desionizada. Se pasa a través del cartucho a un flujo de 1–2 ml/min.
- A continuación los cartuchos se secan al vacío durante 20 min.
- Para eluir el BPA y sus derivados clorados, se añaden a los cartuchos 3 ml de una mezcla eluyente formada por dietiléter/metanol (9:1, v/v) a un flujo de 1 ml/min. Finalmente, el eluato es evaporado hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno.

Derivatización de la muestra:

Al eluato seco anterior se añaden 120 µl de acetato de etilo y 30 µl de BSTFA/TMCS [N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y trimetilcloro

silano (TMCS)] (1:1, v/v) en un vial de reacción con objeto de reconstituir el residuo obtenido y llevar a cabo la reacción de derivatización. Estos tubos se cierran y se calientan a 60 °C durante 30 min. Una vez que el proceso de derivatización se ha completado se transfiere a un inserto, de 250 µl de capacidad, situado en el interior de un vial de 2 ml. Finalmente, 2 µl de esta mezcla es inyectada en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM).

III.2.4 Preparación, extracción y derivatización química de las muestras de suero

III.2.4.1 Extracción líquido-líquido

Se toma una alícuota de 0.4 mL de suero y se mezcla con 0.6 mL de agua desionizada. La mezcla se agita durante 1 min y posteriormente se le añade 3 mL de acetonitrilo. Tras agitar durante 1 min, la capa líquida superior o sobrenadante, se transfiere a un nuevo tubo.

III.2.4.2 Extracción en fase sólida (SPE)

El extracto se lleva a sequedad, bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye añadiendo de nuevo 3 ml de agua desionizada. El volumen resultante se pasa a través de una columna/cartucho C-18 (Isolute C-18 cartridges) para limpiar de posibles impurezas que pudieran interferir posteriormente. Las columna/cartucho C-18 se acondicionan previamente con 3 mL de dietil éter, 3 mL de metanol y 3 mL agua desionizada con un flujo de 1-2 mL/min. Una vez acondicionadas, las columna/cartucho se secan mediante vacío durante 10 min.

Los analitos se eluyen de las columna/cartucho con 3 mL de una mezcla formada por dietil éter/metanol (90:10 v/v) y se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituye con 150 µL de una mezcla formada por metanol-agua (80:20 v/v), de los cuales 40 µL se inyectan en el cromatógrafo

de líquido, acoplado en tándem con el espectrómetro de masas (LC/MS/MS) y 20 µL se inyectan en el cromatógrafo de líquido con detector de fluorescencia (LC-FLD).

III.2.5. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) para muestras de tejido adiposo

Las determinaciones analíticas se llevaron a cabo en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

Todos los reactivos empleados a lo largo del proceso de preparación, extracción y derivatización fueron de la máxima pureza. El agua destilada se obtuvo mediante el empleo de un sistema Millipore (18.2 MΩ/cm) con Milli-Q plus (Millipore, Bedford, USA). Todos los reactivos, metanol, hexano, etanol, acetato de etilo, dietiléter y acetonitrilo, fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). Se analizaron para comprobar que no estaban contaminados o contenían alguna traza de los compuestos objeto de estudio, es decir, BPA y derivados clorados. Bisfenol-F (BPF) y BPA fueron adquiridos en Sigma–Aldrich (Madrid, España). Monocloro-, dicloro- y tricloro-bisfenol A (BPACl, BPACl₂ y BPACl₃) fueron sintetizados en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

Se prepararon disoluciones estándar de cada uno de los compuestos estudiados con una concentración de 100 mg/L en n-hexano y se almacenaron en tubos de vidrio opaco a 4 °C hasta que su uso fue requerido, permaneciendo estables durante al menos tres meses. Estas disoluciones se emplearon para fortificar las muestras de tejido adiposo problema. La mezcla N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y trimetilclorosilano (TMCS) (99:1, v/v), suministrada por Supelco (Bellefonte, PA, USA), fue utilizada como reactivo de silanización.

III.2.5.1. Método Cromatográfico

Para el análisis químico se empleó un sistema CG-EM compuesto por un cromatógrafo de gases serie 6890 Agilent (Agilent Technologies, Wilmington, USA), equipado con inyector automático que puede trabajar con/sin división de flujo, modelo 7683, y acoplado un detector cuadrupolo serie 5976 (del Olmo *et al.*, 2005).

Se usó una columna capilar, de sílice, modelo ZB-5 MS Zebron (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m) de Phenomenex. Como gas portador se empleó He (pureza 99,999%) a un flujo constante de 1 ml/min. La temperatura inicial del horno fue 120 °C. El programa de temperaturas para el horno se resume en la *Tabla III.1*.

Tabla III.1 Programación de temperaturas del cromatógrafo

Temp (°C)	Rate (°C/min)	Hold (min)	Total (min)
120	-	2	2,0
230	30	2	7,7
270	40	6	14,7
300	90	5,6	21,04

El detector operó en modo *full-scan* de m/z 50 a 550 para las determinaciones cualitativas y en modo SIM (*selection ion-monitoring*) para las determinaciones cuantitativas. El espectrómetro de masas se calibró diariamente utilizando perfluorotributilamina (PFTBA) como estándar de calibración. El software HPCHEM fue usado para la adquisición e integración. El puerto de inyección operó a 250 °C. Las muestras silanizadas fueron automáticamente inyectadas en modo de *splitless* (sin divisor de flujo). La línea de transferencia del cromatógrafo de gases al espectrómetro de masas operó a 270 °C, y la fuente de ionización a 250 °C. La energía de ionización fue de 70 eV. El tiempo de

solvent delay usado para proteger al espectrómetro de masas de la saturación fue de 4 min.

III.2.5.2. Método del patrón interno

Para identificar de forma cuantitativa los compuestos químicos se siguió la metodología del patrón interno. El patrón interno utilizado fue BPF, ya que se trata de una de las sustancias químicas que mejor se adaptan al concepto de patrón interno para la determinación de los compuestos químicos seleccionados para este estudio, porque:

- Eluye próximo a los picos de interés, pero está bien resuelto sin interferir con ellos
- Es químicamente similar a los analitos y no reacciona con ninguno de los compuestos evaluados (BPA y derivados clorados) ni otros componentes de la muestra
- Como cualquier estándar, está disponible en forma pura (99%)
- Este compuesto se extrae eficientemente de las muestras de tejido adiposo con una recuperación media del 98,4%

La reproducibilidad para el patrón interno fue excelente y la curva de calibrado tuvo un ajuste $r^2 = 0,992$.

III.2.5.3. Calibración

Las curvas de calibración se construyeron usando la relación entre el área de pico correspondiente del analito y la concentración del mismo. Se prepararon una serie de tubos, pesando 0,2 gramos de tejido adiposo libre de los analitos (se comprobó previamente) y se fortificó el día anterior al análisis (aproximadamente 24 horas antes). Se prepararon cinco niveles de concentración por duplicado y se dejó secar al aire el volumen sobrenadante. Se aplicó el procedimiento de tratamiento de muestra y el procedimiento de derivatización previamente descrito y se inyectó en el GC-MS trabajando en

modo SIM. La linealidad de las gráficas de calibración fueron calculadas de acuerdo al Analytical Methods Comité (AMC, 1994).

La *Tabla III.2* muestra los parámetros que definen la curva de calibrado, junto a los coeficientes de correlación.

Tabla III.2 Ecuación de la recta y coeficientes de correlación para cada uno de los compuestos analizados en tejido adiposo

Compuesto	Curva de calibrado	r^2
BPA	$y = 0,2933 + 0,0120x$	0,9763
BPA Cl	$y = 0,0453 + 0,0170x$	0,9768
BPA Cl ₂	$y = 0,0331 + 0,0060x$	0,9864
BPA Cl ₃	$y = 0,0467 + 0,0170x$	0,9778
BPA Cl ₄	$y = 0,0081 + 0,0040x$	0,9678

III.2.5.4. Validación del método

La metodología fue validada mediante estudios de recuperación de muestras fortificadas. La recuperación de BPA y sus derivados clorados estuvo comprendida entre el 91,3 y el 100,4%, con valores medios del 96,4% para BPA, 94,4% para BPACl, del 97,3% para BPACl₂, y del 96,7% para BPACl₃.

III.2.5.5. Límites de Detección y Cuantificación

La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizó en base a la definición de McDougall (McDougall *et al.*, 1980).

El límite de detección se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el nivel más bajo de concentración (o cantidad) de un elemento que se puede determinar analíticamente (Long *et al.*,

1983). También se define como la “concentración neta mínima detectable” (equivalente al límite de detección), o como la concentración (o cantidad) neta verdadera de analito en el material sujeto a análisis que conducirá a la conclusión de que la concentración (o cantidad) de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco.

El límite de cuantificación es la concentración mínima que se puede determinar con garantía en cuanto a su exactitud. A partir de este valor, se establece el intervalo lineal que corresponde al rango de concentraciones para las que se ha establecido su relación con la respuesta instrumental y que, por tanto, dará lugar al intervalo de trabajo en el que podemos trabajar cuantitativamente con la técnica. Es la cantidad más baja de analito que puede ser determinada con precisión aceptable. Se define como la concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

Los límites de detección y cuantificación para cada compuesto químico analizado se detallan en la *Tabla III.3*.

Tabla III.3 Límites de detección y cuantificación de cada uno de los compuestos analizados

Compuesto	Límite de detección LD ($\mu\text{g/L}$)	Límite de cuantificación LQ ($\mu\text{g/L}$)
BPA	3,3	11,1
BPA Cl	3,2	10,9
BPA Cl ₂	2,5	8,3
BPA Cl ₃	3,2	10,7
BPA Cl ₄	3,9	13,0

III.2.5.6. Cuantificación química en muestras de tejido adiposo

Las 79 muestras de tejido adiposo obtenidas se sometieron al proceso de extracción previamente descrito. Cada extracto seco se resuspendió en la mezcla silanizante, y se llevó a cabo la reacción de derivatización. Una vez terminada la derivatización, se inyectaron 2 μ l en el CG-EM en modo SIM para determinar la concentración de los compuestos de interés por interpolación sobre las curvas de calibración del cociente entre el área de analito y el área del patrón interno.

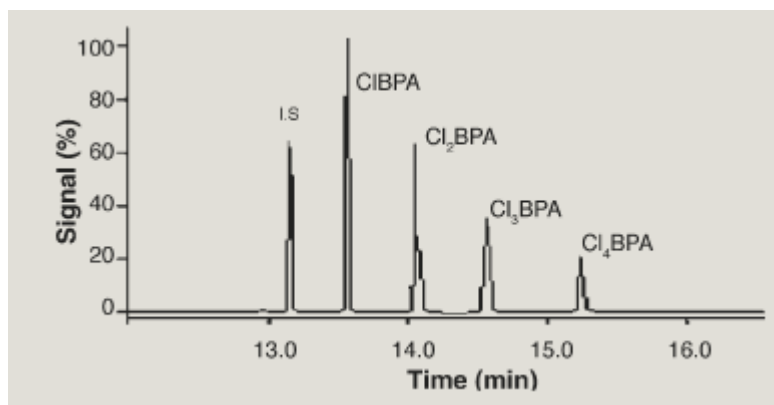


Figura III.1 Cromatograma de los compuestos analizados

III.2.6. Cromatografía de líquido-espectrometría de masas (CL-EM/EM) para muestras de suero

III.2.6.1. Método cromatográfico

- Parámetros del equipo CL/EM/EM

La identificación y cuantificación de BPA y derivados clorados (monocloro, dicloro, y tricloro bisfenol A) en muestras de suero, se llevó a cabo usando un cromatógrafo de líquidos, serie 1200, de Agilent Technologies, en tándem con un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo, de API 2000 (PE SCIEX)

equipado con una interfase de ionización mediante electrospray (ESI), trabajando a 500 °C.

La separación cromatográfica se realizó con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (características: 50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm). Los parámetros cromatográficos (composición y flujo de la fase móvil), así como los parámetros operativos de la interfase de ionización fueron optimizados. Las condiciones óptimas de trabajo fueron las siguientes: elución isocrática con la mezcla formada por metanol y agua (80:20, v/v) como fase móvil, a una presión constante y un flujo de 0,4 mL·min⁻¹. La interfase ESI operó en modo negativo. Las condiciones del espectrómetro de masas se optimizaron para cada compuesto (ver *Tabla III.4*). El gas cortina se mantuvo a 45 L/h, el gas de las fuentes iónicas 1 y 2 a 60 y 50 L/h, respectivamente, y el gas de colisión a 2 L/h. En la *Tabla III.5* se reflejan, así mismo, las transiciones registradas para cada analito, los tiempos de retención y los potenciales instrumentales.

Tabla III.4 Condiciones del espectrómetro de masas para los compuestos de interés

Compuesto	Q1	Q3	DP	FP	EP	CE	CXP	TR (min)
BPA	227.1 227.1	212.3 133.4	-28 -28	-400 -400	-9 -9	-40 -40	-18 -18	1.90
CIBPA	261.1	182.5	-37	-400	-10	-36	-27	2.17
BPACl ₂	295.1	244.5	-48	-400	-10	-29	-37	2.60
BPACl ₃	329.1	250.5	-42	-400	-11	-31	-34	3.32
BPACl ₄	365.1	314.5	-54	-330	-9	-18	-17	4.33

DP: Potencial de desagrupación; FP: Potencial de focalización; EP: Entrada de potencial; CE: Energía de colisión; CXP: Potencial de salida de la célula de colisión; TR: Tiempo de retención.

- Parámetros del equipo CL con detector de FLuorescencia (CC/DFL)

La identificación y cuantificación cromatográfica de BPA en muestras de suero, se llevó también a cabo usando un cromatógrafo de líquidos, serie 1200, de

Agilent Technologies, utilizando una columna C-18 (XBridge C18 Column) de las siguientes características: 150 mm×4.6 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula). El detector de fluorescencia trabajó a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 228 nm y 300 nm, respectivamente. Tanto los estándares como las muestras se separaron mediante elución isocrática, utilizando como fase móvil la mezcla formada por 70% de metanol (solvente A) y 30% de agua (solvente B). El flujo se estableció en 0,8 mL·min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 20 µL. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. El tiempo total del análisis cromatográfico fue de 10 min con un tiempo de post-acondicionamiento de 5 min.

Como patrón interno se utilizó Bisfenol F (BPF), y las curvas de calibración se construyeron usando la relación entre el área de pico correspondiente al analito y la concentración del mismo.

- *Parámetros analíticos*

Los parámetros analíticos calculados fueron los siguientes: pendiente y ordenada en el origen, coeficiente de determinación, rango dinámico lineal (LDR) y precisión determinada como desviación estándar relativa (RSD); el límite de detección (LD) osciló en el rango 1,3 a 7,8 µg·L⁻¹ y el límite de cuantificación (LQ) entre 4,3 y 26,1 µg·L⁻¹, cuando se realizó la identificación y cuantificación de BPA y derivados clorados (monocloro, dicloro, tricloro y tetracloro bisfenol A) en muestras de suero, usando un cromatógrafo de líquidos en tándem con un espectrómetro de masas triple-quadropolo. El límite de detección (LD) fue de 5,9 µg·L⁻¹ y el de cuantificación de 19,5 µg·L⁻¹ cuando se usó un cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia (*Tabla III.5*).

III.2.6.2. Calibración

La Tabla III.5 muestra los parámetros de la curva de calibrado y los correspondientes coeficientes de correlación.

Tabla III.5 *Ecuación de la recta y coeficientes de correlación para cada uno de los compuestos analizados en suero*

Compuesto	Curva de calibrado	r^2
BPA	$y = -910,7 + 240,4x$	0,9865
BPACl	$y = 832,0 + 302,3x$	0,9815
BPACl ₂	$y = -3611,4 + 1162,4x$	0,9994
BPACl ₃	$y = 3307,7 + 1529,0x$	0,9899
BPACl ₄	$y = 1538,4 + 561,47x$	0,9855

III.2.6.3. Validación del método

La metodología fue validada mediante estudios de recuperación de muestras fortificada. La recuperación de BPA y sus derivados clorados estuvo comprendida entre el 60,0 y el 110,0%.

III.2.6.4. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se detallan en la *Tabla III.6*.

Tabla III.6 Límites de detección y cuantificación de cada uno de los compuestos analizados (LC/MS/MS)

Compuesto	Límite de detección LD ($\mu\text{g/L}$)	Límite de cuantificación LQ ($\mu\text{g/L}$)
BPA	6,7	22,2
BPA Cl	7,8	26,1
BPA Cl ₂	1,3	4,3
BPA Cl ₃	5,7	19,1
BPA Cl ₄	6,9	23,1

III.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo usando el programa informático SPSS v18.00 (SPSS, Chicago, IL, USA) y el programa R v2.10.1.

Para el estudio de las concentraciones de los compuestos medidos, cuando un dato de concentración cromatográfica estaba situado por debajo del límite de detección (LD), este era sustituido por un número aleatorio comprendido entre 0 y el límite de detección para ese compuesto.

Dada la distribución no normal, todas las variables de los resultados analíticos se transformaron en su logaritmo neperiano, con el objeto de aproximar lo más posible la distribución de los resultados a la normalidad.

En el análisis bivalente, para evaluar las diferencias de concentraciones de los compuestos químicos investigados entre los diferentes grupos, se usaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney, de Kruskal Wallis y correlación de Spearman.

Para llevar a cabo el análisis de regresión multivariante se usó la técnica paso a paso hacia atrás, introduciendo primero todas las variables consideradas como importantes en el modelo (aquellas que habían resultado con significación estadística en el análisis bivalente y las consideradas de interés en otros estudios epidemiológicos similares) y eliminando progresivamente las que carecían de significación estadística. A su vez, se estudió la existencia de posibles interacciones entre variables que pudieran influir sobre el modelo final. Todas las variables que aparecen en este análisis se estudiaron previamente mediante análisis bivalente, aunque algunas de ellas fueron agrupadas en un

número menor de categorías para mejorar la interpretación de los resultados del análisis.

Todas las variables susceptibles de relación con la concentración de BPA, obtenidas a partir del cuestionario epidemiológico e historia clínica, se describen a continuación. También se recogen las variables referentes al análisis químico y biológico. En el capítulo de análisis estadístico que se muestra en el apartado de resultados de esta Tesis Doctoral, sólo se recogen las variables que se consideraron relevantes sobre la concentración de BPA, tanto por los datos obtenidos en la revisión bibliográfica realizada para este trabajo, como por el análisis estadístico de los resultados realizado en el presente estudio; por eso, algunas variables recogidas en el cuestionario epidemiológico no aparecen reflejadas en dicho análisis.

III.3.1. Variables referentes a las características sociodemográficas

- *Edad*: variable continua calculada como años cumplidos hasta la fecha de la intervención. Para el análisis multivariante, esta variable se centró por su valor medio con el objeto de mejorar la interpretación de resultados.

- *Sexo*: variable dicotómica (niño/niña).

- *Motivo de la intervención quirúrgica*: esta variable se recodificó en las siguientes categorías: *Hernia inguinal*, *Hidrocele* y *Otros*.

- *Nivel de estudios de los progenitores*: esta variable se categorizó en: sin estudios/primaria incompleta, estudios primarios, estudios secundarios/superior.

- *Actividad laboral de los progenitores*: se recodificó en forma de variables dicotómicas (sí/no) que explicaban el hecho de haber trabajado o no durante, al menos 10 años de su vida, en alguna actividad relacionada con cada una de las cuatro categorías profesionales establecidas como potencialmente relacionadas con exposición a compuestos químicos medioambientales.

Debido a la naturaleza de esta remodelación, un mismo sujeto puede estar incluido en más de una categoría “sí” de estas variables.

- *Proximidad de la residencia habitual a tres zonas de exposición potencial a compuestos químicos medioambientales (agricultura, invernaderos, e industria:*

Esta variable se recodificó de dos formas:

. Variable dicotómica (sí/no): en función de haber declarado residir o no cerca de cada una de las zonas de exposición, considerándose que un sujeto reside cerca de una zona cuando lo hace a una distancia inferior a 6 Km. Variable categórica, en la que la distancia a zonas de exposición potencial se recodificó en las siguientes categorías: menos de 100 metros, entre 100 y 1000 metros, más de 1000 metros.

- *Actividad laboral de los progenitores durante el embarazo del sujeto de estudio:* se recogió en forma de dos variables:

. Actividad laboral de la madre, variable categórica recodificada en las siguientes categorías: ama de casa, actividad agrícola, otros.

. Actividad laboral del padre, variable categórica recodificada en las siguientes categorías: construcción, actividad agrícola, otros.

- *Exposición percibida a compuestos químicos:* se recogió, en forma de variables dicotómicas (sí/no), si los sujetos consideraban estar o no expuestos durante, al menos tres horas semanales, a cada uno de los productos químicos considerados como fuente potencial de exposición.

III.3.2. Variables referentes a las características antropométricas

- *Índice de Masa Corporal (IMC):* variable continua calculada como el peso (kilogramos) dividido entre la altura (metros) elevada al cuadrado. Para el análisis multivariante, esta variable se centró por su valor medio, es decir, a cada valor de IMC se le restó 27 Kg/m², con objeto de facilitar la interpretación de resultados. Debido a que la variable IMC en niños es dependiente tanto de la edad del individuo como del sexo, de manera especial durante los primeros

años de vida, consideramos esta variable como IMC según percentil, calculada en función de las curvas de crecimiento españolas para niños y niñas entre 0 y 16 años. Esta variable fue categorizada por encima y por debajo del percentil 85 ($<$ percentil 85 y \geq percentil 85) (Carrascosa *et al.*, 2004).

III.3.3. Variables referentes a la historia reproductiva de la madre

- *Número de hijos*: variable continua que indica el número de hijos que la mujer tiene en el momento de la intervención.

- *Número de meses de lactancia*: variable continua, se expresó como la media de los meses de lactancia para todos sus hijos.

- *Hijo o hija con algún problema de salud al nacer*: se recogió de forma dicotómica (sí/no), si alguno de sus hijos había tenido algún problema de salud en el momento del nacimiento.

- *Uso de anticonceptivos orales (AO)*: variable dicotómica (sí/no), en función de si la mujer había usado AO alguna vez en su vida.

III.3.4. Variables referentes al estilo de vida de los padres

- *Hábito tabáquico*: se recogió en forma de dos variables:

. Hábito tabáquico actual, variable dicotómica (fumador/no fumador).

. Hábito tabáquico pasado (no fumador/exfumador).

- *Consumo de agua*: variable continua que expresa el número de vasos de agua ingeridos diariamente.

- *Consumo de alimentos*: se recogió en forma de variables categóricas el consumo de diversos grupos de alimentos, dependiendo del grupo la información se recogió en tres tipos de variables:

. *Consumo habitual de un grupo de alimentos*: variable dicotómica (sí/no). El concepto de sujeto consumidor habitual se describe, para cada grupo de alimentos, en el análisis descriptivo del capítulo de Resultados.

. *Frecuencia de consumo*: variable categórica, se recoge la frecuencia semanal de consumo de un tipo de alimentos. Las diferentes categorías para cada grupo se explican en el análisis descriptivo del capítulo de Resultados.

. *Tipo de alimento consumido*: variable categórica, se usaba cuando, dentro de un mismo grupo de alimentos, interesaba discriminar entre varias categorías diferentes. Igual que en las anteriores, las diversas categorías usadas para cada grupo de alimentos se detallan en el análisis descriptivo del capítulo de Resultados.

III.3.5. Variables del análisis químico

- *Concentración de cada uno de los compuestos analizados en el tejido adiposo*: variable cuantitativa continua expresada en ng/gramo de tejido (ng/g tejido), obtenida para: BPA y BPACIx (BPACI, BPACI₂, BPACI₃, BPACI₄).

- *Concentración de cada uno de los compuestos analizados en suero*: variable cuantitativa continua expresada en ng/mililitro de suero (ng/ml), obtenida para: BPA y BPACIx (BPACI, BPACI₂, BPACI₃, BPACI₄).

IV. RESULTADOS



IV. RESULTADOS

IV.1. PARTICIPACIÓN, CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

IV. 1.1. Participación

Durante el período de reclutamiento y recogida de información, mayo de 2005 a enero de 2006, se identificaron un total de 120 pacientes susceptibles de participar en el estudio. De este conjunto, un total de 14 personas (11,7%) rechazaron participar. A todos los participantes se les solicitó su consentimiento informado. Para 27 (22,5%) pacientes, la información obtenida fue incompleta, ya que en 16 casos no se realizó la encuesta epidemiológica antes del alta del paciente, y en 11 casos la muestra de grasa no se obtuvo o fue insuficiente. Se recogió una muestra de grasa para 79 sujetos y muestra de suero para 61 sujetos. La muestra final está formada por 79 (65,8%) o 61 (50,8%) sujetos, atendiendo a la muestra biológica seleccionada, tal y como se recoge en la *Tabla IV.1*.

Tabla IV.1 *Distribución de los sujetos seleccionados y no seleccionados*

	n	%
Población elegible	120	100,00
Rechazaron participar	14	11,67
Información o muestra incompleta	27	22,50
Población final muestra grasa	79	65,83
Población final muestra suero	61	50,80

Las características de los sujetos participantes en el estudio, en comparación con los sujetos no participantes, se resumen en la *Tabla IV.2*. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos participantes y los que quedaron excluidos, para algunas variables de las que se disponía información, como edad, índice de masa corporal (IMC) y tipo de intervención quirúrgica. Sin embargo, sí que existieron diferencias significativas en cuanto a la variable género, ya que hubo una sobre-representación de los varones en la muestra final, para aquellos sujetos que proporcionaron muestra de tejido adiposo.

Tabla IV.2 Características de los sujetos participantes y no participantes

	Seleccionados	No seleccionados	<i>p</i>
Total sujetos – <i>n</i> (%)	79 (66)	41 (34)	
Edad (años) – <i>media</i> ± <i>DS</i>	4,26 (± 2,60)	5,09 (± 3,00)	0.215
Sexo - <i>n</i> (%)			0.048
Niños	60 (76)	24 (59)	
Niñas	19 (24)	17 (41)	
IMC (Kg/m ₂) - <i>media</i> ± <i>SD</i> ¹	17,01 (± 3,42)	16,23 (± 2,76)	0.386
Motivo de la intervención - <i>n</i> (%)			0.246
Hernia inguinal	42 (53)	27 (26)	
Hidrocele	17 (22)	2 (5)	
Otros	20 (25)	12 (29)	
Localización de la patología - <i>n</i> (%)			0.344
Abdomen	51 (65)	30 (73)	
Urogenital	22 (28)	6 (15)	
Otros	6 (8)	5 (12)	

DS: Desviación estándar

En los apartados siguientes se presenta el análisis descriptivo de las principales características de la población de estudio, conforme a criterios antropométricos, sociodemográficos, ocupacionales, estado de salud y de estilos de vida, recogidos mediante cuestionario epidemiológico diseñado *ad hoc* para este estudio (Anexo I).

IV.1.2. Características físicas y demográficas de la población de estudio

IV.1.2.1. Edad en el momento de inclusión en el estudio

La edad media de los sujetos de estudio en el momento de la intervención y entrevista fue de $4,26 \pm 2,60$ años, con un rango desde pocos meses hasta los 12 años de edad (*Tabla IV.3*). Como se puede observar en el histograma de la *Figura IV.1*, la distribución de esta variable se aproxima a la normalidad. En los análisis estadísticos posteriores, esta variable fue tratada como variable continua expresada en años, bien como variable categórica, la población en distintos grupos de edad o terciles.

Tabla IV.3 Edad (años). Medidas de tendencia central

	Media	Mediana	DS	IC 95%	
Total	4,26	3,92	2,60	3,68	4,84

DS: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

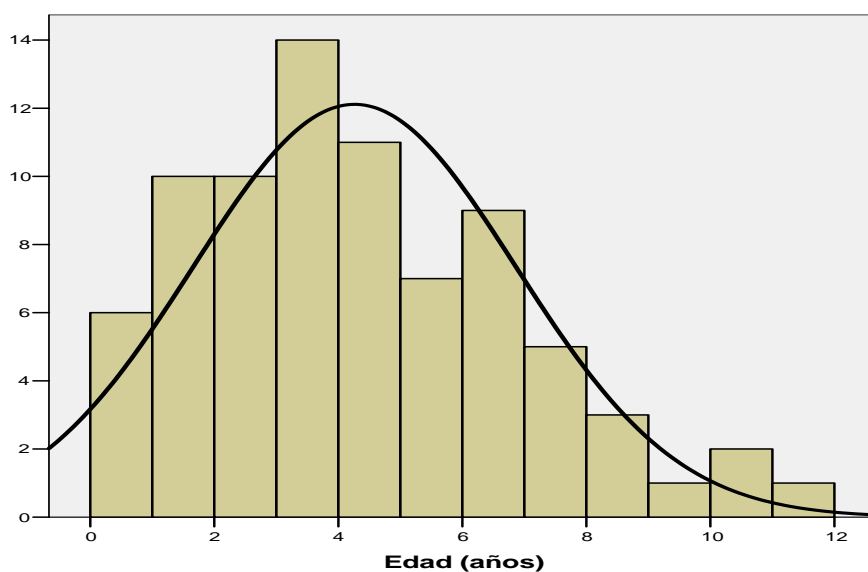


Figura IV.1 Histograma de edad en el momento de la entrevista

IV.1.2.2. Sexo

La Tabla IV.4 muestra la distribución por género del conjunto de la población de estudio. Entre los participantes incluidos, se puede observar una sobre-representación de la población masculina, con un porcentaje del 75%, similar a la distribución por sexo entre la población infantil tratada en el Servicio de Cirugía Pediátrica mediante cirugía de alta precoz, donde han sido seleccionados los sujetos de estudio.

Tabla IV.4 Distribución por sexos de la población de estudio

	n	%
Niños	60	75,9
Niñas	19	24,1
Población final	79	100,0

IV.1.2.3. Índice de Masa Corporal (IMC)

Los pacientes seleccionados fueron pesados y medidos en el momento del ingreso hospitalario, para el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC). Este índice se calcula dividiendo el peso del sujeto, en Kg, entre la talla, en metros, al cuadrado (Kg/m^2), y representa, en cierto modo, el contenido en grasa corporal del sujeto. En la tabla siguiente (*Tabla IV.5*) se muestran las medidas de tendencia central de esta variable. El valor medio del IMC fue de 16,14 Kg/m^2 , con un rango de 7,94 – 25,00. Tanto el valor medio como la mediana están dentro de la normalidad para individuos en el rango de edad de nuestra población de estudio, según la OMS (WHO, 1995).

Tabla IV.5 IMC (Kg/m^2). Medidas de tendencia central

	Media	Mediana	DS	IC 95%	
Total	16,14	15,93	2,71	15,56	16,73

DS: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

En el estudio estadístico posterior, esta variable se categorizó en 2 grupos: por encima y por debajo del percentil 85. Como muestra el histograma, (*Figura IV.2*), esta variable presentó una distribución normal.

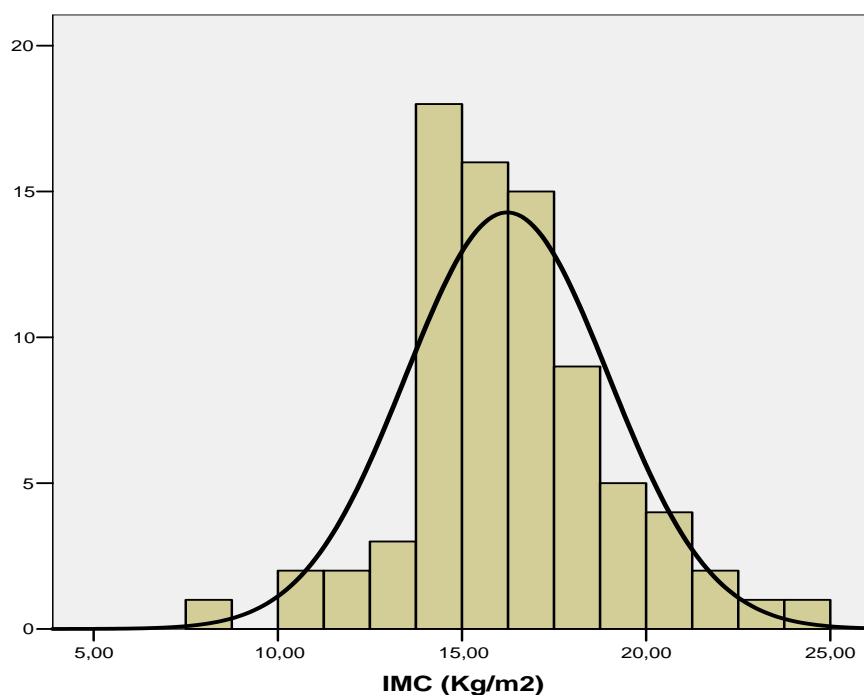


Figura IV.2 Histograma de IMC

IV.1.2.4. Localización de la muestra de grasa

La muestra de grasa fue extraída del panículo adiposo contiguo a la zona de la incisión quirúrgica. Esta variable, según la localización, fue codificada en 3 categorías, como muestra la *Tabla IV.6*.

Tabla IV.6 Procedencia anatómica de la muestra de tejido adiposo

	n	%
Urogenital	22	27,8
Abdomen	51	64,6
Otros	6	7,6

IV.1.2.5. Área de residencia

Otra de las variables recogidas en la encuesta epidemiológica fue el municipio de residencia habitual de los sujetos de estudio. Una vez conocido el municipio se comprobó, mediante la información disponible en el Instituto Nacional de Estadística (INE), el número total de habitantes de cada uno de ellos y se clasificó esta variable en tres categorías: “residencia urbana”, “residencia semiurbana” y “residencia rural”, en función del número de habitantes empadronados en el mismo:

- Urbano: más de 10.000 habitantes
- Semiurbano: entre 5.000 y 10.000 habitantes
- Rural: menos de 5.000 habitantes

La *Tabla IV.7* muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del lugar de residencia en el momento de la intervención quirúrgica.

Tabla IV.7 Distribución de la población según el tipo de municipio

	n	%
Urbano	47	59,5
Semiurbano	9	11,4
Rural	23	29,1

Debido al escaso número de niños residentes en ambientes semiurbanos (n=9), para los análisis estadísticos posteriores, la variable “residencia” se clasificó en “rural” y “urbana” (rural <10.00 habitantes, urbana ≥10.000 habitantes), incluyendo la categoría semiurbana dentro de la urbana. La mayoría de la población declaró, por tanto, residir en grandes núcleos, tanto urbanos como semiurbanos.

Por otro lado, se ha considerado como variable de interés la existencia de más de una residencia, habitual o esporádica, a lo largo de su vida. Los resultados, en la *Tabla IV.8*, muestran que la población de estudio es muy estable y con poca movilidad, ya que el 79,7% permanece, desde el nacimiento, en la residencia declarada en el momento de la entrevista.

Tabla IV.8 ¿Ha tenido otra residencia a lo largo de su vida?

	n	%
No	63	79,7
Si	15	19,0

IV.1.3. Características relacionadas con la salud

IV.1.3.1. Motivo de la intervención quirúrgica

La distribución de la población con respecto al diagnóstico que motiva la intervención quirúrgica, queda reflejada en la Figura IV.3. Como se muestra en la imagen, la patología predominante es inguino-escrotal, fundamentalmente debido al elevado porcentaje de sujetos intervenidos de hernia inguinal (53%) e hidrocele (22%).

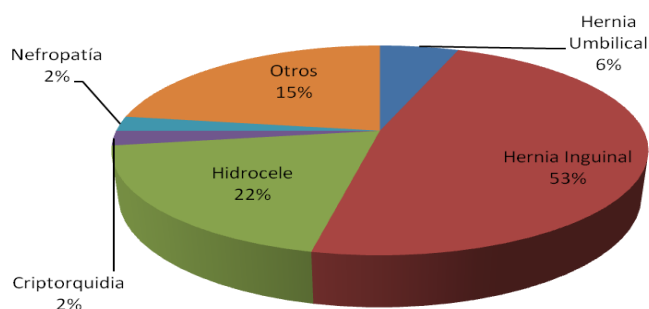


Figura IV.3 Distribución de la población seleccionada por patología

IV.1.3.2. Patología previa

El cuestionario recabó también información acerca de las condiciones de salud de los sujetos de estudio. En la *Tabla IV.9* quedan reflejadas las principales patologías investigadas, así como los datos pertenecientes a las mismas. Un 34,4% de los sujetos manifestaron haber padecido alguna afección cutánea y un 19%, algún tipo de alergia.

Tabla IV.9 Principales patologías padecidas

		n	%
Afectación cutánea	No	52	65,8
	Si	24	30,4
	NS/NC	3	3,8
Estreñimiento	No	57	72,2
	Si	19	24,1
	NS/NC	3	3,8
Alergia	No	59	74,7
	Si	15	19,0
	NS/NC	5	6,3
Asma	No	68	86,1
	Si	6	7,6
	NS/NC	5	6,3
Afección tracto urinario	No	68	86,1
	Si	6	7,6
	NS/NC	5	6,3

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.3.3. Antecedentes odontológicos

El cuestionario epidemiológico recabó información sobre algunos aspectos relacionados con la salud de los sujetos, como antecedentes odontológicos y consumo de medicamentos.

Los antecedentes odontológicos se exploraron en el cuestionario con 2 preguntas, que se desarrollan a continuación. En primer lugar, la existencia de obturación de caries mediante empastes, se registró como variable dicotómica, tanto respecto a su existencia como al tipo de material utilizado, como recoge la *Tabla IV.10*.

Tabla IV.10 *Le han puesto alguna vez un empaste o sellador?*

		n	%
Empastes	No	64	81,0
	Si	13	16,5
	NS/NC	2	2,5
Amalgama	No	70	88,6
	Si	7	8,9
	NS/NC	2	2,5
Composite	No	69	87,3
	Si	8	10,2
	NS/NC	2	2,5

NS/NC: No sabe/No contesta

Además, se dispone de la información sobre la distribución de las medidas de tendencia central respecto al número de empastes de distintos tipos (*Tabla IV.11*).

Tabla IV.11 Número de empastes. Medidas de tendencia central

	Media	Mediana	DS	IC 95%	
Amalgama	0,34	0,00	1,26	0,05	0,62
Composite	0,31	0,00	1,15	0,05	0,57
Total empastes	0,65	0,00	1,83	0,23	1,06

DS: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.1.3.4. Consumo de medicamentos

Se valoró el consumo de medicamentos por parte de los sujetos incluidos en 2 intervalos de tiempo: últimos 3 meses y la semana previa a la intervención quirúrgica. El consumo en los últimos 3 meses queda reflejado en la *Tabla IV.12*. El 82,3% había consumido algún medicamento durante este período.

Tabla IV.12 Ha consumido medicamentos durante los últimos 3 meses?

	n	%
No	12	15,2
Sí	65	82,3
NS/NC	2	2,5

NS/NC: No sabe/No contesta

La distribución respecto al consumo de medicamentos, referido aquí a los 7 días anteriores al ingreso, se muestra en la *Tabla IV.13*. En este apartado se incluyó también el consumo de vitaminas, minerales o suplementos vitamínicos.

Tabla IV.13 *Ha consumido medicamentos, vitaminas o minerales durante los 7 días anteriores al ingreso?*

	n	%
No	49	62,0
Sí	28	35,4
NS/NC	2	2,5

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.4. Características de los progenitores

Se describe a continuación la información obtenida sobre aquellas características de los padres de los participantes que pudieran ser de interés para la identificación de los factores relacionados con la exposición a BPA en la población de estudio.

IV.1.4.1. Nivel de estudios de los progenitores

El nivel de estudios de los progenitores se clasificó en 3 categorías: estudios primarios, secundarios (formación profesional y/o bachillerato) y superiores, cuya distribución de frecuencias se recoge en la *Tabla IV.14*. Atendiendo al nivel de escolaridad, observamos que, tanto entre las madres como entre los padres, el nivel escolar es bajo, ya que un 48,7% de las madres y un 66,7% de los padres, o no tiene estudios o tan solo tiene estudios primarios. La categoría “estudios universitarios” resultó minoritaria, con unos porcentajes del 18% y 13%.

Tabla IV.14 *Nivel de estudios de los padres*

	Madre		Padre	
	n	%	n	%
Sin estudios/incompleto	9	11,8	12	16,0

Estudios primarios	28	36,8	38	50,7
FP/Bachiller	25	32,9	15	20,0
Estudios universitarios	14	18,4	10	13,3

FP: Formación profesional

IV.1.4.2. Actividad laboral de los padres durante el embarazo

Esta variable es de gran interés, dada la posibilidad e importancia de de la exposición materno-infantil a compuestos hormonalmente activos durante la etapa intrauterina. La variedad de actividades laborales declaradas, tanto del padre como de la madre, durante el embarazo de cada sujeto de estudio, se recodificó en 5 categorías profesionales, mostradas en la *Tabla IV.15*, atendiendo a criterios de mayor representatividad o relevancia frente a la posibilidad de exposición a BPA.

Tabla IV.15 Ocupación de los progenitores durante el embarazo

	Madre		Padre	
	n	%	n	%
Agrícola	2	(2,6)	12	16,0
Ama de casa	39	(50,6)	-	-
Industrial	5	(6,5)	31	41,3
Administrativo	13	(16,9)	8	10,7
Otros	18	(23,4)	24	32,0

La mayoría de las madres (50.6%) no desempeñaron un trabajo distinto al doméstico durante el embarazo del sujeto de estudio, y ningún padre tenía como actividad principal esta ocupación. De las madres que trabajaban fuera del hogar, sólo 2 (2,6%) de ellas declararon desarrollar un trabajo agrícola,

frente al 16,0% de los padres, y sólo 5 (6,5%) de ellas realizaban actividades en algún tipo de industria. Sin embargo, este último porcentaje se eleva al 41,3% para el caso de los padres.

IV.1.4.3. Hábito tabáquico de los progenitores

En cuanto al consumo de tabaco en el momento de la entrevista, la *Tabla IV.16* muestra la distribución de frecuencias y porcentajes de esta variable en los progenitores de los sujetos. Más de la mitad de las madres no fumaba, mientras que sí lo hacía el mismo porcentaje de los padres. En el análisis estadístico posterior, esta variable se valoró teniendo en cuenta a los padres, tanto de manera aislada (padre o madre fumador) como conjunta (alguno de los dos fumador).

Tabla IV.16 Hábito tabáquico actual de los progenitores

	Madre		Padre		Madre o Padre	
	n	%	n	%	n	%
No fuma	45	57,0	39	49,4	24	30,4
Si fuma	32	40,5	38	50,6	52	65,8
NS/NC	2	2,5	2	2,5	3	3,8

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.4.4. Consumo de alcohol por los progenitores

Las medidas de tendencia central para el consumo de bebidas alcohólicas por los progenitores, calculado semanalmente, se resumen en la *Tabla IV.17*. Para obtener esta información se preguntó a los padres el número de vasos de cerveza, vino o licores consumidos a la semana, que fueron transformados en volumen semanal total consumido, expresado en litros.

Tabla IV.17 Consumo de alcohol de los progenitores (litros). Medidas de tendencia central

		Media	DS	Mediana	Minimo	Máximo
Madre	Cerveza	0,8	2,0	0,0	0,0	14,0
	Vino	0,5	1,3	0,0	0,0	7,0
	Licor	0,1	0,5	0,0	0,0	3,0
Padre	Cerveza	3,9	6,6	1,0	0,0	42,0
	Vino	1,4	3,0	0,0	0,0	15,0
	Licor	0,4	1,0	0,0	0,0	5,0

DS: Desviación estándar

IV.1.4.5. Historia reproductiva de la madre

El cuestionario realizado recogió información referida a diversos aspectos relacionados con los antecedentes obstétricos de las madres y la eventual patología neonatal de los sujetos.

La tabla *Tabla IV.18* recoge las medidas de tendencia central referidas a las 3 variables: número de hijos, número total de embarazos y lugar que ocupa el sujeto de estudio entre sus hermanos.

Tabla IV.18 Número de hijos y embarazos de la madre, y lugar que ocupa el sujeto en la relación de hermanos. Medidas de tendencia central

	Media	Mediana	DS	IC 95%	
Nº hijos	2,03	2,00	1,00	1,80	2,25
Embarazos	2,09	2,00	0,98	1,87	2,32
Posición que ocupa	1,82	2,00	0,93	1,61	2,03

DS: Desviación estándar

La variable “condición de primogénito del sujeto” se clasificó en relación con el nacimiento del sujeto de estudio como primer nacido vivo. En los demás casos, el sujeto se clasificó como “no primogénito”. (*Tabla IV.19*)

Tabla IV.19 *Condición de primogénito del sujeto*

	n	%
Primogénito	33	41,8
No primogénito	44	55,7
NS/NC	2	2,5

NS/NC: No sabe/No contesta

La *Tabla IV.20* muestra los datos recogidos respecto a la existencia o no de alguna anomalía neonatal en el sujeto de estudio, recodificada como variable dicotómica.

Tabla IV.20 *Hijo o hija con problemas de salud al nacer*

	n	%
No	64	75,3
Si	18	21,2
NS/NC	3	3,5

NS/NC: No sabe/No contesta

Un 21,2% de las madres consideró algún tipo de incidencia en el período neonatal en sus hijos, atendiendo como tal alguna de las siguientes: Prematuridad (n=10), Placenta baja (n=1), Sufrimiento fetal (n=1), Angioma (n=1), Parálisis cerebral (n=1), Derrame cerebral (n=1), Tumor maligno (n=1),

Bajo peso (n=1), o Ictericia (n=1). Las anomalías neonatales detectadas se agruparon en 3 categorías, mostradas en la *Figura IV.4*. Los sujetos prematuros y de bajo peso sumaron un 12,7%. El resto, minoritarios, se agruparon en “otros”

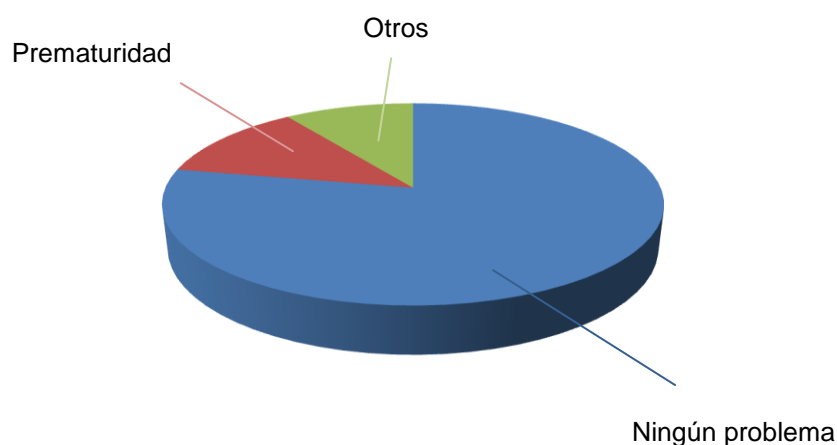


Figura IV.4 Tipo de problema de salud al nacer

Para el caso específico de antecedentes de aborto, la distribución de frecuencias queda recogida en la *Tabla IV.21*.

Tabla IV.21 Antecedentes de aborto de la madre

	n	%
No	66	83,5
Si	9	11,4
NS/NC	4	5,1

NS/NC: No sabe/No contesta

Dentro de la historia reproductiva de las madres de los sujetos de estudio, el cuestionario recogía información sobre lactancia, en tanto que se trata de una de las vías principales de exposición de los lactantes a los contaminantes bioacumulados por sus madres a lo largo de la vida. El 84,8% de las madres

alimentaron durante algún tiempo a sus hijos lactantes al pecho, tal y como queda reflejado en la *Tabla IV.22*.

Tabla IV.22 Sujetos alimentados al pecho

	n	%
No	8	10,1
Si	67	84,8
NS/NC	4	5,1

NS/NC: No sabe/No contesta

La duración media de la lactancia materna queda reflejada en la *Tabla IV.23*, expresada en número de meses.

Tabla IV.23 Duración de la lactancia (meses)

	Media	Mediana	DS	IC 95%	
Meses de lactancia	6,61	4,00	8,44	4,66	8,57

DS: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.1.5. Características relacionadas con la dieta

A continuación se muestran los datos obtenidos en el análisis de la encuesta, en lo referente a hábitos alimentarios, expresando el consumo de cada grupo de alimentos como: frecuencia diaria, semanal y mensual (diariamente, veces/semana, veces/mes y/o nunca). De forma sucesiva se presentan los resultados correspondientes a distintos grupos de alimentos considerados.

IV.1.5.1. Consumo de agua

Las medidas de tendencia central para el consumo diario de agua (expresado en litros), se muestran en la *Tabla IV.24*.

Tabla IV.24 Cantidad diaria de agua ingerida (litros)

	Media	Mediana	DS	IC 95%	
Cantidad de agua	0,90	0,75	0,62	0,75	1,05

DS: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

La *Tabla IV.25* muestra los datos referidos al tipo de agua consumida por los sujetos de estudio.

Tabla IV.25 Tipo de agua consumida

	n	%
Agua no embotellada	35	44,3
Agua embotellada	30	38,0
Ambas	12	15,2
NS/NC	2	2,5

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.5.2. Consumo de pescado

En cuanto a la ingesta de pescado, la frecuencia semanal de consumo obtenida en el cuestionario se recodificó en las categorías reflejadas en la *Tabla IV.26*.

Tabla IV.26 Frecuencia de consumo de pescado

	n	%
Una vez por semana o menos*	31	39,2
Más de una vez a la semana	42	53,2
NS/NC	6	7,6

* Esta categoría incluye también a aquellos sujetos que declararon no consumir pescado.

NS/NC: No sabe/No contesta

La *Tabla IV.27* muestra la distribución de los sujetos en función del tipo de pescado consumido: azul, blanco o cualquiera de los 2, indistintamente. Solo el 7,6% de los sujetos consumía exclusivamente pescado azul, pero resulta notable el alto porcentaje de la población de estudio que incluye el pescado en su dieta de manera habitual.

Tabla IV.27 Tipo de pescado consumido de forma mayoritaria

	n	%
Pescado azul	6	7,6
Pescado blanco	33	41,8
Indistintamente	31	39,2
NS/NC	6	11,4

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.5.3. Consumo de carne

Los patrones de frecuencia de consumo de carne se recodificaron en las categorías mostradas en la *Tabla IV.28*.

Tabla IV.28 Frecuencia de consumo de carnes

	n	%
2 o menos veces por semana	11	13,9
Más de 2 veces por semana	60	75,9
NS/NC	8	10,1

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.5.4. Consumo de fiambres y embutidos

La *Tabla IV.29* recoge los datos referidos a la frecuencia de consumo de fiambres y embutidos en forma de variable dicotómica, reflejado como consumo diario.

Tabla IV.29 Frecuencia de consumo de fiambres y embutidos

	n	%
Todos los días	48	60,8
No consume todos los días	25	31,6
NS/NC	6	7,6

NS/NC: No sabe/No contesta

El consumo de fiambres y embutidos también se recalificó atendiendo al tipo, según las categorías que muestra la *Tabla IV.30*.

Tabla IV.30 Tipo de fiambres y embutidos consumidos

	n	%
Embutido	9	11,4
Fiambre	27	34,2

Ambos	29	36,7
NS/NC	14	17,7

NS/NC: No sabe/No contesta

Estos datos, unidos a los obtenidos en relación al consumo de carne, y teniendo en cuenta las recomendaciones nutricionales para este grupo de alimentos, sitúan a nuestra población de estudio como consumidores de excesiva cantidad de productos cárnicos, como en el resto de España, donde cada vez está más extendido este mal hábito dietético.

IV.1.5.5. Consumo de grasas

En relación a la ingesta de grasas, se recabaron datos de forma independiente acerca del consumo de aceites vegetales, y de mantequilla y margarina. La población de estudio declaró consumir aceite de oliva como aceite vegetal mayoritario, y mantequilla/margarina de forma moderada. Respecto al tipo de aceite vegetal consumido, los datos quedan reflejados en la *Tabla IV.31*.

Tabla IV.31 Tipo de aceite consumido de forma mayoritaria

	n	%
Aceite de oliva	60	75,9
Otros aceites vegetales	3	3,8
Indistintamente	6	7,6
NS/NC	10	12,7

NS/NC: No sabe/No contesta

La *Tabla IV.32* muestra los datos referidos a la opción de consumo de los sujetos de estudio.

Tabla IV.32 Consumo de mantequilla o margarina

	n	%
Nunca	30	38,0
Mantequilla	18	22,8
Margarina	22	27,8
Indistintamente	1	1,3
NS/NC	8	10,1

NS/NC: No sabe/No contesta

La frecuencia de consumo queda reflejada en la *Tabla IV.33*.

Tabla IV.33 Frecuencia de consumo de mantequilla o margarina

	n	%
Nunca	30	38,0
Una vez por semana	18	22,8
3-4 veces por semana	8	10,1
Una o más veces al día	12	15,2
NS/NC	11	13,9

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.5.6. Consumo de lácteos

En el caso de la leche y productos derivados, se recogió información sobre la frecuencia de consumo de leche, así como frecuencia y tipo de queso consumido.

Con el objeto de facilitar la posibilidad de inclusión del consumo de leche en los modelos multivariantes, la frecuencia de consumo de leche fue recodificada en

una variable dicotómica, la cual indicaba si el sujeto era consumidor habitual de leche o no, definiéndose como consumidor habitual todo aquel que, en la pregunta nº 87 del cuestionario epidemiológico, respondió que consumía leche, independientemente de la cantidad. Los datos recogidos se muestran en la *Tabla IV.34*.

Tabla IV.34 Frecuencia de consumo de leche

	n	%
Todos los días	75	94,9
No toma	0	0,0
NS/NC	4	5,1

NS/NC: No sabe/No contesta

La frecuencia de consumo de queso se valoró en tres categorías (*Tabla IV.35*). El elevado porcentaje de individuos que declararon no consumo habitual de queso (20,3%) se situó entre los menores de un año, al no estar introducido este alimento en este grupo de edad.

Tabla IV.35 Frecuencia de consumo de queso

	n	%
No consumo habitual	16	20,3
2 veces por semana o menos	18	22,8
Más de 2 veces por semana	27	34,2
Todos los días	13	16,5
NS/NC	5	6,3

NS/NC: No sabe/No contesta

La distribución de la población de estudio en cuanto al tipo de queso consumido de forma mayoritaria, se refleja en la *Tabla IV.36*.

Tabla IV.36 *Tipo de queso consumido*

	n	%
N o consumo habitual	16	20,3
Fresco	18	22,8
Curado/semicurado	23	29,1
Indistintamente	18	22,8
NS/NC	5	6,3

NS/NC: No sabe/No contesta

Teniendo en cuenta las recomendaciones de ingesta diaria para este grupo de edad, de 2-3 raciones diarias de productos lácteos en general, y considerando los resultados de la ingesta de queso junto al consumo de leche, podemos afirmar que la mayoría de nuestra población se ajusta a la ingesta recomendada.

IV.1.5.7. Consumo de legumbres

En relación con el consumo de legumbres, el 74,6% de los niños resultaron ser consumidores de legumbres al menos 2 veces por semana, lo que se ajusta a las recomendaciones de ingesta para este grupo de alimentos, cifradas en 2-3 raciones semanales.

Tabla IV.37 *Frecuencia de consumo de legumbres*

	n	%
Una vez por semana o menos	13	16,5
2 veces por semana	25	31,6

Más de 2 veces por semana	34	43,0
NS/NC	7	8,9

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.5.8. Consumo de verduras

En las *Tablas IV.38 y 39* se muestran los resultados para la frecuencia de consumo de de verduras, cocinadas y crudas.

Tabla IV.38 *Frecuencia de consumo de verduras crudas*

	n	%
Una vez por semana o menos	29	36,7
2 veces por semana	5	6,3
Más de 2 veces por semana	39	49,4
NS/NC	6	7,6

NS/NC: No sabe/No contesta

Tabla IV.39 *Frecuencia de consumo de verduras cocinadas*

	n	%
Una vez por semana o menos	25	31,6
2 veces por semana	14	17,7
Más de 2 veces por semana	33	41,8
NS/NC	7	8,9

NS/NC: No sabe/No contesta

Las recomendaciones en la infancia para este grupo de alimentos se cifran en 250-300 gramos diarios, es decir, 2 o más raciones diarias, y preferentemente

alguna de ellas en crudo. Aunque la información facilitada por la encuesta no permite conocer la ingesta diaria, por las cifras semanales podemos afirmar que, en general, nuestra población de estudio no se ajustaría a la ingesta recomendada.

IV.1.5.9. Consumo de fruta

La *Tabla IV.40* refleja los datos para este grupo de alimentos. El 75,9% de los sujetos consume fruta más de 2 veces a la semana; sin embargo, teniendo en cuenta las recomendaciones de consumo diario, y las limitaciones de la información facilitada por el cuestionario utilizado, nuestra población de estudio estaría por debajo de lo recomendado para niños en crecimiento.

Tabla IV.40 Frecuencia de consumo de fruta

	n	%
Una vez por semana o menos	8	10,1
2 veces por semana	5	6,3
Más de 2 veces por semana	60	75,9
NS/NC	6	7,6

NS/NC: No sabe/No contesta

IV.1.5.10. Consumo de huevos

En la *Tabla IV.41* se detalla el patrón de frecuencia de consumo semanal de huevos en nuestra población de estudio.

Tabla IV.41 Frecuencia de consumo de huevos

	n	%
Una vez por semana o menos	30	38,0

2 veces por semana	26	32,9
Más de 2 veces por semana	17	21,5
NS/NC	6	7,6

NS/NC: No sabe/No contesta

Un consumo de 3-4 huevos por semana es el recomendado en etapas de crecimiento, fundamentalmente como fuente alternativa a las proteínas de la carne. Según los datos obtenidos, la mayor parte de la población de estudio se ajusta a la ingesta recomendada.

IV.1.5.11. Consumo de cereales

La tabla *Tabla IV.42* recoge el patrón de frecuencia del consumo diario de pan.

Tabla IV.42 Frecuencia de consumo de pan

	n	%
Una vez o menos al día	34	43,0
Más de 1 vez al día	37	46,8
NS/NC	8	10,1

NS/NC: No sabe/No contesta

La distribución de los sujetos de estudio en torno a la frecuencia de consumo de pasta, se detalla en la *Tabla IV.43*.

Tabla IV.43 Frecuencia de consumo de pasta

	n	%
Una vez por semana o menos	56	70,9
Más de una vez por semana	17	21,5

NS/NC	6	7,6
-------	---	-----

NS/NC: No sabe/No contesta

Se recomienda, en etapas de crecimiento, la ingesta de pan en todas las comidas del día, y de pasta alimenticia una vez a la semana. Con los datos de la encuesta epidemiológica referidos a la ingesta de pan y pasta, nuestra población de estudio parece ajustarse a la ingesta recomendada de cereales.

IV.1.5.12. Consumo de comida enlatada

En cuanto al consumo de comida enlatada, su inclusión en la encuesta fué debida al frecuente uso de resinas epoxi, potencialmente liberadoras de BPA, en el recubrimiento interno de las latas. La *Tabla IV.44* muestra la distribución de esta variable dicotómica.

Tabla IV.44 Consumo habitual de comida enlatada

	n	%
No	36	45,6
Si	37	46,8
NS/NC	6	7,6

NS/NC: No sabe/No contesta

La *Tabla IV.45* muestra la distribución respecto al consumo semanal.

Tabla IV.45 Cantidad semanal de latas consumidas

	n	%
0	36	45,6
0-1	20	25,3

≥ 1	17	21,5
NS/NC	6	7,6

NS/NC: No sabe/No contesta

Para concluir, y a la vista de los resultados obtenidos en el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, y que han sido recogidos en las tablas anteriormente detalladas, se puede deducir que los hábitos nutricionales de la población de estudio siguen las pautas de la dieta habitual de la región, y se pueden considerar próximas a las recomendaciones de la dieta mediterránea.

IV.2. ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A BPA Y DERIVADOS CLORADOS

Utilizando la metodología cromatográfica descrita en el apartado correspondiente de la sección de material y métodos, se procedió a la determinación de la concentración de residuo de los compuestos de interés en las muestras disponibles de tejido adiposo y suero.

IV.2.1. Estimación de la exposición a BPA y derivados clorados en muestras de grasa

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia y la concentración de los compuestos de interés, medidos en muestras de tejido adiposo de los participantes incluidos en el estudio (n = 79).

En la *Tabla IV.46* se muestran los porcentajes por encima y por debajo del límite de detección (LD) para cada compuesto químico. Por cuestiones de número de muestras y de significación estadística, para el estudio de los factores de riesgo asociados a la exposición, se seleccionaron compuestos que se encontraban por encima del límite de detección en, al menos, el 25% de las muestras.

Tabla IV.46 Frecuencia de detección para cada compuesto en muestras de grasa

Compuesto	>LD	<LD	%>LD
BPA	48	31	60,8
BPACl	70	9	88,6
BPA Cl ₂	79	0	100,0
BPA Cl ₃	18	61	22,8
BPA Cl ₄	8	71	10,1
Σ BP Cl _x	79	0	100,0

LD: Límite de detección; Σ BP Cl_x: Sumatoria de todos los compuestos clorados

En la *Tabla IV.47* se indican los datos referidos a la concentración de cada uno de los compuestos encontrados.

Tabla IV.47 Concentraciones de los compuestos de interés tejido adiposo (ng/gramo de tejido)

Compuesto	GM	GSD	Skewness	EE Skewness	Kurtosis	EE Kurtosis	Min	Máx
BPA	14,61	2,18	1,11	1,41	0,67	1,96	2,90	96,60
BPA Cl	6,18	1,71	1,22	1,33	0,57	1,76	2,56	25,24
BPA Cl ₂	9,88	1,79	0,76	1,31	0,79	1,71	2,27	34,36
BPA Cl ₃	4,40	1,47	1,38	1,71	0,22	2,82	2,51	8,10
BPA Cl ₄	4,06	1,37	7,33	2,12	83,71	4,40	3,07	8,34
Σ BF Cl _x	24,97	0,24	063	1,31	1,62	1,71	3,08	139,52

GM: Media geométrica. GSD: Desviación estándar geométrica. EE: Error estándar. Σ BPA Cl_x: Sumatoria de todos los compuestos clorados

La totalidad de las muestras contenía al menos uno de los compuestos seleccionados en concentración detectable. La distribución de frecuencias de la población de estudio, en función de la concentración de los compuestos seleccionados en las muestras de grasa, se muestra en la *Figura IV.5*.

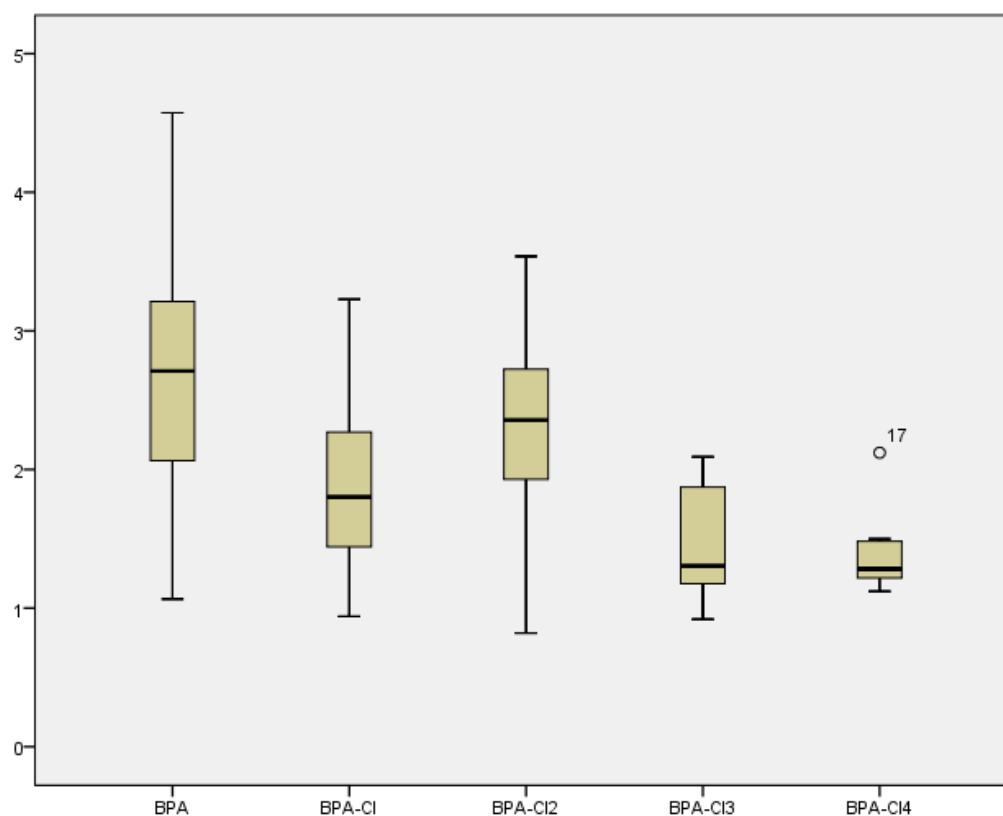


Figura IV.5 Concentración de los compuestos seleccionados en las muestras de grasa (ng/gramo de tejido)

IV.2.2. Estimación de la exposición a BPA y derivados clorados en muestras de suero

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia y la concentración de los compuestos medidos en muestras de suero de los participantes incluidos en el estudio (n = 61). Del total de muestras de suero

colectadas, solo 53 de ellas se pudieron asociar a información obtenida mediante cuestionario epidemiológico.

En la *Tabla IV.48* se muestran los porcentajes de muestras de suero por encima y por debajo del límite de detección (LD) para cada compuesto químico. Por cuestiones de número de muestras y de significación estadística, para el estudio de los factores de riesgo asociados a la exposición, se seleccionaron compuestos que se encontraban por encima del límite de detección en, al menos, el 25% de las muestras. Siguiendo este criterio, los compuestos seleccionados para el estudio fueron los siguientes:

Tabla IV.48 Frecuencia de detección para cada compuesto en muestras de suero

Compuesto	>LD	<LD	%>LD
BPA	53	0	100
BPA CL	53	0	100
BPA CL ₂	53	0	100
BPA CL ₃	53	0	100
BPA CL ₄	27	26	50,9
\sum BF Cl _x	53	0	100

LD: Límite de detección. \sum BPA Cl_x: Sumatoria de todos los compuestos clorados

En la *Tabla IV.49* se relacionan los datos referidos a la concentración de cada uno de los compuestos encontrados.

Tabla IV.49 Concentraciones de los compuestos de interés en suero
(ng/ml)

Compuesto	GM	GSD	Skew-ness	EE Skew-ness	Kurto-sis	EE Kurto-sis	Min	Máx
BPA	58,46	7,78	0,12	0,33	-1,87	0,64	4	1275
BPA Cl	142,31	10,48	-0,20	0,33	-1,86	0,64	5	2445
BPA Cl ₂	193,33	10,34	-0,09	0,33	-1,82	0,64	7	2509
BPA Cl ₃	58,90	13,93	-0,07	0,33	-1,80	0,64	1	1740
BPA Cl ₄	48,76	3,95	-2,26	0,45	4,37	0,87	0	251
Σ BF Cl _x	403,54	10,89	-0,06	0,33	-1,85	0,64	16	6907

GM: Media geométrica. GSD: Desviación estándar geométrica. EE: Error estándar. Σ BPA Cl_x: Sumatoria de todos los compuestos clorados

La totalidad de las muestras contenía al menos uno de los compuestos seleccionados en concentración detectable. La distribución de frecuencias de la población de estudio, en función de la cantidad de residuos detectados en las muestras de grasa, se muestra en la *Figura IV.6*.

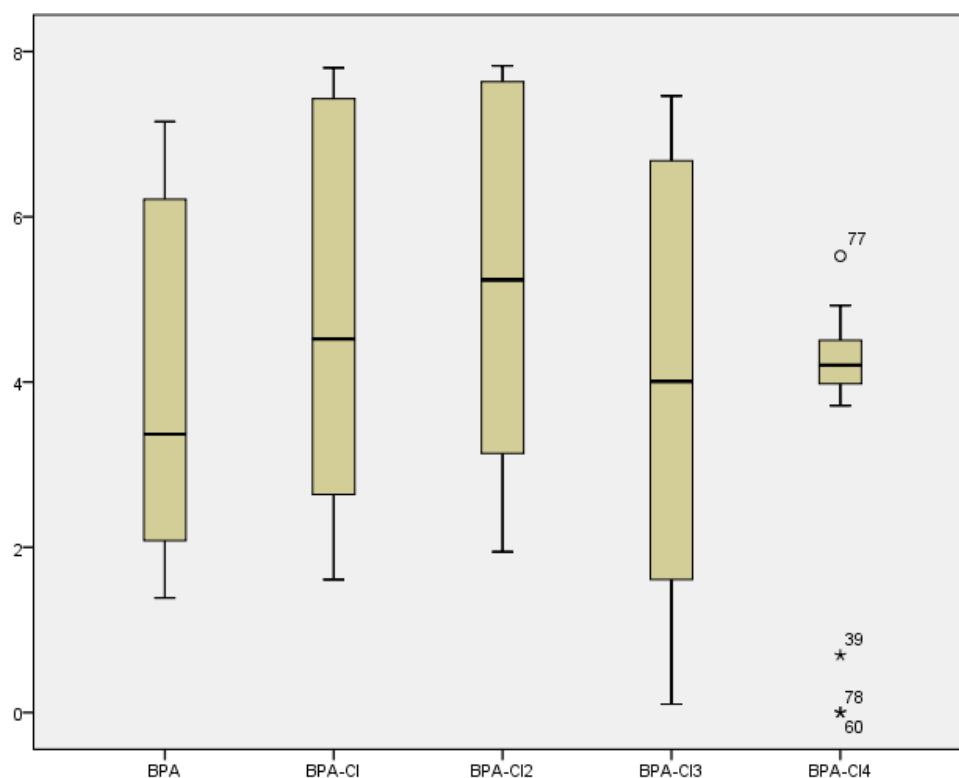


Figura IV.6 Concentración logarítmica de los compuestos seleccionados en las muestras de suero (ng/ml)

IV.3 CONCENTRACIONES DE BPA Y RELACIÓN CON LAS VARIABLES PREDICTORAS DE EXPOSICIÓN

En este apartado se describen las concentraciones encontradas de bisfenol A en las muestras de tejido adiposo y suero, así como los análisis bivariate y multivariate de los posibles factores de exposición asociados a dichas concentraciones.

IV.3.1. Edad

Esta variable se ha calculado como el número de años cumplidos en la fecha de intervención o toma de muestras. Se aprecia una correlación negativa entre

la edad de los sujetos reclutados y las concentraciones de BPA, es decir, una disminución de los niveles de BPA, tanto en tejido adiposo como en suero, con la edad de los sujetos (coeficientes de Spearman: -0.060 y -0,257), pero las diferencias no fueron en ningún caso estadísticamente significativas, aunque en el caso de las muestras de suero se acercaran a la significación.

Tabla IV.50 Relación entre concentraciones de BPA y edad

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	48	-0,060	0,687
Suero	52	-0,257	0,066

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.3.2. Género

No se apreció tampoco una relación estadísticamente significativa entre los sujetos reclutados, estratificando por sexo y las concentraciones de BPA encontradas en las muestras de tejido adiposo y suero ($p=0,404$ y $0,602$ respectivamente). Sin embargo, en ambas matrices biológicas se apreció que las niñas presentaban valores más elevados del contaminante, más evidente en muestras de suero, con una media geométrica de $92,06$ ng/ml, frente a los $51,18$ ng/ml de la población masculina. Los detalles del análisis de regresión lineal se muestran en la *Tabla IV.51*.

Tabla IV.51 Relación entre concentraciones de BPA y género

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. adiposo	Niñas	13	16,83	2,46	9,77	29,01	0,404
	Niños	35	13,86	2,09	10,75	17,85	
Suero	Niñas	12	92,06	7,21	26,23	323,08	0,602
	Niños	41	51,18	7,98	26,57	98,61	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Los niveles de BPA encontrados en las muestras de tejido adiposo fueron mayores entre las niñas que entre los niños, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

IV.3.3. Índice de masa corporal (IMC)

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de BPA en tejido adiposo y suero y el IMC; sin embargo, en ambas matrices se observa una disminución de los niveles de BPA a mayor IMC de los sujetos (coeficiente de Spearman= -0,222 y - 0,082). Los resultados del análisis de regresión lineal entre las dos variables se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla IV.52 Relación entre concentraciones de BPA e IMC

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	48	-0,222	0,129
Suero	52	-0,082	0,563

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

Cuando la población de estudio se categorizó por encima y por debajo del percentil 85 de IMC, se mantuvo la tendencia descrita con la variable en continuo para el caso de muestras de tejido adiposo, es decir los individuos por encima del percentil 85 presentaron mayores valores de BPA, sin embargo no ocurrió lo mismo en las muestras de suero ya que a mayor IMC, menores concentraciones del contaminante, como puede apreciarse en la *Tabla IV. 53*.

Tabla IV.53 Relación entre concentraciones de BPA y categorías de la variable IMC

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	Percentil <85	35	14,08	2,16	10,80	18,35	0,728
	Percentil >85	13	16,13	2,28	9,79	26,57	
Suero	Percentil <85	41	64,52	8,12	33,32	124,95	0,341
	Percentil >85	11	49,77	6,94	13,54	182,94	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.4. Localización de la muestra de grasa

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de BPA en tejido adiposo y la procedencia anatómica de la muestra grasa, indicando que la distribución de BPA es homogénea, no presentando su bioacumulación ninguna preferencia corporal.

Tabla IV.54 Relación entre concentraciones de BPA y lugar de extracción de la muestra de grasa

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. adiposo	Urogenital	12	11,50	2,15	7,08	18,68	0,368
	Abdomen	33	16,17	2,15	12,32	21,22	
	Otros	3	12,43	2,92	0,86	178,74	
Suero	Urogenital	15	99,89	8,70	30,15	330,97	0,375
	Abdomen	35	43,03	7,25	21,79	84,97	
	Otros	3	143,29	9,24	0,57	35882,74	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.5. Área de residencia

En la *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se muestran las medias geométricas de las concentraciones de BPA estratificando por área de residencia para la población de estudio y ambas muestras biológicas. La población urbana presentó, en ambas matrices, menores concentraciones de BPA, pero en ninguno de los casos de manera estadísticamente significativa.

Tabla IV.55 Relación entre concentraciones de BPA y área de residencia

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. adiposo	Urbano	28	13,98	2,16	10,37	18,85	0,859
	Rural	20	15,52	2,25	10,62	22,68	
Suero	Urbano	34	57,17	7,52	28,28	115,57	0,840
	Rural	18	69,20	8,61	23,72	201,85	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.6. Permanencia en la residencia actual

Se ha considerado como variable de interés la existencia de más de una residencia, habitual o esporádica, a lo largo de su vida, lo que se ha manejado en el análisis bivalente como permanencia en la residencia habitual. Como se comentó anteriormente, nuestra población de estudio es muy estable y con poca movilidad, ya que el 79,7% permanece desde el nacimiento en la residencia declarada en el momento de la entrevista. Los resultados mostrados en la *Tabla IV.56* no indican ninguna relación de esta variable con las concentraciones del contaminante.

Tabla IV.56 Relación entre concentraciones de BPA y permanencia en la residencia actual

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	Siempre	39	13,55	2,27	10,39	17,68	0,165

	Otra res.	8	19,70	1,67	12,84	30,21	
Suero	Siempre	40	58,07	7,70	30,23	111,53	0,982
	Otra res.	11	58,76	8,33	14,14	244,19	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.7. Residencia habitual cercana a industria

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se refleja la variación de las concentraciones de BPA en la población de estudio según la cercanía de la residencia habitual a zonas de exposición potencial (áreas industriales). Los datos obtenidos indican que los sujetos incluidos no parecen estar más expuestos a BPA dependiendo de la proximidad de su residencia a potenciales áreas de exposición.

Tabla IV.57 Relación entre concentraciones de BPA y cercanía de la residencia a industria

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	29	15,17	2,29	11,06	20,81	0,768
	Si	18	13,34	2,06	9,32	19,09	
Suero	No	31	53,23	7,16	25,85	109,61	0,678
	Si	20	66,88	8,86	24,09	185,68	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.8. Motivo de intervención

Las patologías predominantes fueron las hernias inguinales (53%) e hidrocele (22%), que se consideraron de manera conjunta en el análisis bivalente frente a otras patologías diferentes. Cabe destacar que las muestras de suero de individuos intervenidos en la categoría “otras patologías” presentaron valores muy superiores de BPA, con una media geométrica de 149,43 ng/ml, frente a

los 43,09 ng/ml en los intervenidos por hernia o hidrocele; diferencias muy cercanas a la significación estadística (p: 0,06).

Tabla IV.58 Relación entre concentraciones de BPA y motivo de la intervención

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Hernia/Hidrocele	34	15,34	2,23	11,61	20,28	0,480
	Otros	14	12,96	2,11	8,43	19,92	
Suero	Hernia/Hidrocele	40	43,09	7,37	22,75	81,63	0,060
	Otros	13	149,43	7,39	44,61	500,52	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.9. Condiciones de salud previas

El cuestionario recabó también información acerca de las condiciones de salud de los sujetos de estudio. Se han seleccionado aquellas condiciones presentes en un mayor número de individuos, esto es, alergia, afectación del tracto urinario, estreñimiento o enfermedades cutáneas. Su relación con los niveles de BPA encontrados se expone en las tablas siguientes:

Tabla IV.59 Relación entre concentraciones de BPA y antecedentes de alergia

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	35	14,53	2,30	10,91	19,35	0,867
	Si	11	15,76	1,76	10,78	23,03	
Suero	No	37	51,99	8,00	22,99	104,00	0,264
	Si	11	89,42	7,72	22,66	352,83	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.60 Relación entre concentraciones de BPA y padecimiento de alteraciones del tracto urinario

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	41	14,90	2,25	11,54	19,23	0,503
	Si	6	11,66	1,84	6,17	22,06	
Suero	No	46	54,34	7,67	29,67	99,52	0,147
	Si	4	133,50	11,27	2,83	6303,02	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.61 Relación entre concentraciones de BPA y padecimiento de estreñimiento

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	33	14,82	2,27	11,07	19,83	0,935
	Si	14	13,59	2,04	8,99	20,54	
Suero	No	34	99,77	7,59	49,18	202,41	0,008
	Si	16	18,71	5,25	7,73	45,26	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.62 Relación entre concentraciones de BPA y padecimiento de enfermedades cutáneas

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	32	14,71	2,07	11,31	19,13	0,882
	Si	15	13,89	2,51	8,34	23,12	
Suero	No	31	48,38	8,08	22,48	104,10	0,263
	Si	19	79,38	7,55	29,96	210,31	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Ninguna de las condiciones de salud consideradas presentó una asociación significativa con la concentración de BPA encontrada en las dos matrices biológicas investigadas en este estudio.

IV.3.10. Antecedentes odontológicos: empastes dentales y composites

Se estudió la relación entre la concentración de BPA encontrada y la presencia de obturación de caries mediante empastes o selladores, considerando además el tipo de material utilizado. Los datos obtenidos indican que los sujetos incluidos no están más expuestos a BPA en función de tener o no empastes dentales.

Tabla IV.63 Relación entre concentraciones de BPA y empastes dentales

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	41	15,24	2,09	12,08	19,24	0,208
	Si	6	9,99	2,89	3,28	30,40	
Suero	No	38	69,77	8,10	35,07	138,79	0,183
	Si	11	25,81	5,97	7,77	85,72	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Cuando se consideró el material utilizado, y concretamente para el caso de los composites, como solo 8 sujetos declararon tenerlos, la variable se consideró de manera continua. El análisis estadístico no mostró una relación estadísticamente significativa, sin embargo los individuos con composites presentaban mayores niveles de BPA en tejido adiposo (coeficiente de Spearman= 0,116), comportamiento que no se observó en las muestras de suero de los individuos de estudio. Hay que destacar que esta diferencia se mantiene cuando se controla por otras variables en el análisis multivariante.

Tabla IV.64 Relación entre concentraciones de BPA y utilización de empastes de composite

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	47	0,116	0,439
Suero	46	-0,065	0,667

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.3.11. Consumo de medicamentos

El consumo de medicamentos y/o complejos vitamínicos por parte de los sujetos, como posible vía de exposición a BPA, se valoró en dos intervalos de tiempo: últimos tres meses y la semana previa a la intervención. En ninguno de los dos intervalos considerados se apreció relación con las concentraciones de BPA encontradas.

Tabla IV.65 Relación entre concentraciones de BPA y uso de medicamentos (últimos 3 meses)

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	7	12,28	2,33	5,60	26,89	0,550
	Si	40	14,86	2,18	11,57	19,08	
Suero	No	6	33,57	9,96	3,14	358,90	0,570
	Si	44	62,97	7,73	33,82	117,26	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.66 Relación entre concentraciones de BPA y uso de medicamentos (semana previa)

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	28	14,25	2,22	10,46	19,41	0,991

	Si	19	14,72	2,20	10,07	21,53	
Suero	No	28	87,73	8,13	38,93	197,71	0,151
	Si	22	34,78	6,89	14,78	81,87	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.12. Nivel de estudios de los progenitores

El nivel de estudios de los progenitores se ha considerado teniendo en cuenta los estudios de la madre y el padre de manera independiente, o considerando el nivel de estudios más alto de alguno de los miembros de la pareja. Esta variable se ha considerado por estar relacionada de manera directa con la clase social de los individuos, condición relacionada en la bibliografía con una exposición diferencial a BPA. Así, mayor clase social, y por ende estudios superiores, se relacionan de manera inversamente proporcional a los niveles de BPA detectados.

Tabla IV.67 Relación entre concentraciones de BPA y nivel de estudios de la madre

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Primaria	22	16,76	2,17	11,88	23,64	0,240
	FP/Bachiller	16	11,03	2,18	7,28	16,71	
	Universitario/a	9	16,22	2,17	8,96	29,39	
Suero	Primaria	24	45,37	8,13	18,73	109,91	0,906
	FP/Bachiller	14	79,13	7,50	24,72	253,29	
	Universitario/a	11	82,41	8,45	19,65	345,60	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.68 Relación entre concentraciones de BPA y nivel de estudios del padre

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Primaria	30	13,36	2,25	9,86	18,10	0,359
	FP/Bachiller	10	14,78	2,09	8,73	25,04	
	Universitario/a	7	19,51	2,14	9,67	39,38	
Suero	Primaria	33	66,97	8,25	31,68	141,56	0,730
	FP/Bachiller	9	69,83	7,87	14,30	340,94	
	Universitario/a	7	32,30	7,22	5,19	201,02	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.69 Relación entre concentraciones de BPA y nivel de estudios más alto entre los progenitores

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Primaria	18	15,66	2,26	10,45	23,47	0,320
	FP/Bachiller	19	11,96	2,12	8,32	17,20	
	Universitario/a	10	17,86	2,20	10,15	31,42	
Suero	Primaria	21	57,20	8,53	21,56	151,79	0,747
	FP/Bachiller	15	52,58	7,48	17,26	160,22	
	Universitario/a	13	79,39	8,25	22,19	284,12	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.13. Actividad laboral de los progenitores

Las concentraciones de BPA conforme a la actividad laboral desarrollada por la madre durante el embarazo del individuo, se reflejan en la *Tabla IV.70*, y en

la *Tabla IV.71*, la actividad laboral desarrollada por el padre durante el mismo periodo, respectivamente.

Tabla IV.70 *Relación entre concentraciones de BPA y actividad laboral de la madre*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Administrativo	9	13,09	2,31	6,88	24,93	0,841
	Ama de casa	24	15,48	2,19	11,11	21,57	
	Otros	14	13,66	2,22	8,62	21,64	
Suero	Administrativo	7	156,76	7,71	23,71	1036,64	0,122
	Ama de casa	27	30,01	6,55	14,27	63,10	
	Otros	16	102,46	7,78	34,35	305,61	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.71 *Relación entre concentraciones de BPA y actividad laboral del padre*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Industrial	18	14,95	1,95	10,73	20,83	0,583
	Administrativo	3	9,36	1,76	2,30	38,15	
	Otros	26	14,82	2,42	10,37	21,18	
Suero	Industrial	19	50,14	8,55	17,82	141,08	0,974
	Administrativo	5	100,24	6,01	10,81	929,14	
	Otros	25	54,40	8,16	22,88	129,38	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

La actividad de ambos progenitores (madre y padre) no parece estar relacionada con las concentraciones de BPA observadas en tejido adiposo o en suero, presentando las menores concentraciones de BPA las muestras de

suero de aquellos niños cuyas madres habían realizado como actividad principal durante el embarazo las tareas del hogar (GM= 30,01 ng/ml), y las muestras de tejido adiposo de los padres que habían trabajado como administrativos (GM=9,36 ng/g tejido adiposo).

IV.3.14. Hábito tabáquico de los progenitores

En las *Tablas IV.72* y *IV.73* se muestra la distribución de las concentraciones en tejido adiposo y suero de BPA en función del hábito tabáquico, para madres y padres, respectivamente.

Tabla IV.72 *Relación entre concentraciones de BPA y hábito tabáquico de la madre*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	No fumadora	28	13,24	2,23	9,70	18,09	0,324
	Fumadora	19	16,41	2,14	11,38	23,65	
Suero	No fumadora	26	80,93	7,80	35,29	185,59	0,322
	Fumadora	24	41,00	7,72	17,30	97,18	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.73 *Relación entre concentraciones de BPA y hábito tabáquico del padre*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	No fumador	25	14,17	2,24	10,16	19,75	0,647
	Fumador	22	14,76	2,18	10,44	20,86	
Suero	No fumador	21	19,02	4,86	9,26	39,06	0,002
	Fumador	29	131,58	7,38	61,53	281,36	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Si analizamos el hábito tabáquico, las *Tablas IV.72 y IV.73* muestran los diferentes niveles de BPA en tejido adiposo dependiendo de si la madre o el padre del sujeto había sido fumador o no durante algún período de la vida. A este respecto, se observaron diferencias no estadísticamente significativas en el grupo de niños con mayores valores aquellos que tenían madres fumadoras. Por el contrario, entre los sujetos cuyos padres eran fumadores, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las muestras de suero, diferencia que no se mantiene en el análisis multivariante posterior. Este hecho hace pensar que los resultados del análisis bivariante en este punto podrían estar sesgados por la influencia de otras variables, como por ejemplo, número de cigarrillos o duración de este hábito.

También se consideró la distribución de las concentraciones de BPA en tejido adiposo y suero en función de que fuera fumador uno de los miembros de la pareja. La significación estadística se mantuvo entre los padres fumadores.

Tabla IV.74 *Relación entre concentraciones de BPA y condición de fumador de alguno de los progenitores*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	14	13,22	2,21	8,36	20,90	0,443
	Si	33	14,99	2,20	11,33	19,85	
Suero	No	11	14,06	4,03	5,51	35,84	0,022
	Si	38	83,25	7,80	42,38	163,53	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.15. Consumo de alcohol por los progenitores

Las *Tablas IV.75 y IV.76* muestran la relación entre las concentraciones de BPA y el consumo de alcohol. No se aprecian correlaciones estadísticamente significativas entre las madres o padres de los sujetos de estudio.

Tabla IV.75 Relación entre concentraciones de BPA y consumo de alcohol por la madre

		n	C. Spearman	p
Tejido adiposo	Cerveza	47	-0,013	0,933
	Vino	47	0,133	0,373
	Licores	47	-0,099	0,510
Suero	Cerveza	49	-0,171	0,240
	Vino	49	0,017	0,907
	Licores	49	-0,137	0,348

β : Coeficiente de Spearman

Tabla IV.76 Relación entre concentraciones de BPA y consumo de alcohol por el padre

		n	C. Spearman	p
Tejido adiposo	Cerveza	46	0,031	0,837
	Vino	46	0,012	0,935
	Licores	46	-0,072	0,636
Suero	Cerveza	48	0,043	0,771
	Vino	48	0,075	0,613
	Licores	48	-0,056	0,705

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.3.16. Condición de primogénito del sujeto de estudio

En la población de estudio se aprecia una correlación positiva, pero estadísticamente no significativa, entre condición de primogénito y la concentración de BPA en tejido adiposo, con una media geométrica de 16,84

ng/g de tejido, frente a los 13,13 ng/g de tejido en los sujetos sin esta condición. Sin embargo, este comportamiento no se apreció en las concentraciones de BPA obtenidas en las muestras de suero de los mismos individuos.

Tabla IV.77 Relación entre concentraciones de BPA y condición de primogénito del sujeto

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	Primogénito	18	16,84	2,13	11,57	24,52	0,364
	No primogénito	29	13,13	2,23	9,68	17,80	
Suero	Primogénito	18	55,43	8,18	19,49	157,63	0,808
	No primogénito	32	60,13	7,89	28,56	126,61	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

El lugar que ocupa el sujeto de estudio entre sus hermanos fue una de las variables que, en el análisis multivariante posterior, se mantuvo con una significación estadística de $p: 0,1$, a pesar de que, como se puede apreciar en la *Tabla IV.78*, no mostrara una significación estadística en el análisis bivariante,

Tabla IV.78 Relación entre concentraciones de BPA y lugar que ocupa el sujeto entre los hermanos

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	47	-0,128	0,392
Suero	50	0,147	0,308

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.3.17. Número de embarazos y de hijos

Otra manera de cuantificar la carga xenobiotica transferida por la madre al hijo durante el embarazo, ha sido, tradicionalmente, considerar el número de embarazos. Esta variable es similar a la anterior, pero considerada de manera cuantitativa, ya que más embarazos significarían un mayor orden de nacimiento. En las *Tablas IV.78 y IV.79* se aprecia una correlación negativa, aunque estadísticamente no significativa, entre el número de embarazos o de hijos y las concentraciones de BPA en tejido adiposo. Esta tendencia no se mantiene en las muestras de suero.

Tabla IV.79 *Relación entre concentraciones de BPA y número de embarazos de la madre*

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	47	-0,012	0,938
Suero	49	0,050	0,734

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

Tabla IV.80 *Relación entre concentraciones de BPA y número de hijos de la madre*

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	47	-0,029	0,844
Suero	50	0,091	0,530

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.3.18. Hijos con problemas de salud al nacer

En cuanto al hecho de haber tenido un hijo con algún problema de salud al nacer, no se observa relación con las concentraciones de BPA en tejido

adiposo o suero (*Tabla IV.81*), aunque sí concentraciones de BPA ligeramente superiores en ambas matrices biológicas.

Tabla IV.81 *Relación entre concentraciones de BPA y existencia de hijos con algún problema al nacer*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	37	14,18	2,00	11,25	17,86	0,805
	Si	10	15,46	3,02	7,02	34,07	
Suero	No	37	56,89	7,74	28,65	112,16	0,707
	Si	13	63,55	8,75	17,14	235,65	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.18.1. Prematuridad (entre los sujetos de estudio)

La condición de prematuro entre los sujetos de estudio, no se relacionó con las concentraciones de BPA encontradas en las muestras biológicas analizadas.

Tabla IV.82 *Relación entre concentraciones de BPA y prematuridad*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	41	14,93	2,07	11,87	18,77	0,930
	Si	5	13,94	3,34	3,12	62,21	
Suero	No	41	64,65	7,89	33,68	124,10	0,756
	Si	8	45,18	8,26	7,73	263,90	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.18.2. Abortos previos de la madre del sujeto de estudio

Tampoco se relacionaron las concentraciones de BPA con la existencia de abortos previos por parte de la madre del sujeto de estudio, variable relacionada en la literatura científica con la presencia de este contaminante.

Tabla IV.83 Relación entre concentraciones de BPA y antecedentes de aborto en la madre

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	42	14,15	2,05	11,32	17,69	0,918
	Si	5	17,14	3,79	3,28	89,62	
Suero	No	44	58,32	7,85	31,17	109,11	0,644
	Si	5	39,28	9,27	2,48	623,25	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.18.3. Lactancia materna

Una de las posibles vías de exposición a contaminantes ambientales de naturaleza lipofílica es la transferencia madre-hijo a través de la leche materna. La relación entre las concentraciones de BPA en muestras de tejido adiposo y suero en los sujetos de estudio, y el haber sido amamantado, se observa en la *Tabla IV.84*.

Tabla IV.84 Relación entre concentraciones de BPA y alimentación del sujeto al pecho

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	4	12,98	1,82	5,00	33,69	0,834
	Si	43	14,59	2,24	11,39	18,69	
Suero	No	5	47,63	10,59	2,54	892,47	0,856
	Si	44	57,05	7,77	30,59	106,40	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

No se apreció ninguna relación estadísticamente significativa entre sujetos alimentados al pecho, y las concentraciones de BPA encontradas en las muestras de tejido adiposo y suero. Sin embargo, en ambas matrices

biológicas se apreció que los niños lactantes presentaban valores más elevados del contaminante.

IV.3.19. Tipo de agua consumida de forma habitual

A continuación se muestran las concentraciones de BPA obtenidas en el análisis bivariante y multivariante en lo referente a los hábitos alimentarios de la población de estudio.

La *Tabla IV.85* muestra la relación entre las concentraciones de BPA y el consumo de agua para los sujetos de estudio, no observando ninguna correlación estadísticamente significativa; sin embargo, los individuos que consumían agua embotellada presentaron mayores niveles de BPA tanto en las muestras de grasa como en las de suero. Hay que destacar que esta diferencia se mantiene y alcanza significación estadística cuando se controla por otras variables en el análisis multivariante.

Tabla IV.85 Relación entre concentraciones de BPA y tipo de agua consumida

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Del grifo	22	13,45	2,18	9,51	19,01	0,502
	Embotellada*	25	15,38	2,22	11,06	21,39	
Suero	Del grifo	24	38,66	7,12	16,87	88,59	0,186
	Embotellada*	26	85,44	8,21	36,50	200,01	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza
* Embotellada: consumo mayoritario de este tipo de agua

IV.3.20. Consumo de pescado

La *Tabla IV.86* muestra las diferencias de medias geométricas de BPA en tejido adiposo y en suero en función del tipo de pescado consumido de forma mayoritaria, entre los sujetos que declararon consumirlo de forma habitual.

Respecto a las muestras de tejido adiposo, aquellos niños que consumen pescado blanco presentan concentraciones mayores de BPA, mientras que los que comen principalmente pescado azul son los que menos cantidad de BPA han bioacumulado en su tejido adiposo, con un valor p próximo a la significación estadística. En suero, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a esta variable (p: 0,022), con un patrón de distribución de las concentraciones diferente al obtenido en tejido adiposo, teniendo mayores concentraciones de BPA aquellos individuos con consumo indistinto de ambos tipos de pescado.

Tabla IV.86 Relación entre concentraciones de BPA y tipo de pescado consumido

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Pescado azul	5	8,20	1,57	4,69	14,32	0,108
	Pescado blanco	19	15,91	2,51	10,21	24,80	
	Indistintamente	20	14,60	1,75	11,25	18,95	
Suero	Pescado azul	4	6,16	1,21	4,52	8,39	0,022
	Pescado blanco	20	61,71	7,59	23,90	159,36	
	Indistintamente	23	89,87	7,95	36,66	220,27	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Si se estudia la frecuencia de consumo de pescado, no se observan diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de BPA ni en tejido adiposo ni en suero.

Tabla IV.87 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de pescado

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido	≤ 1 vez/semana	20	15,84	2,20	10,95	22,92	0,565

adiposo	> 1 vez/semana	26	13,96	2,19	10,17	19,16	
Suero	≤ 1 vez/semana	21	55,65	7,71	21,96	141,06	0,442
	> 1 vez/semana	28	64,99	8,20	28,74	146,97	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.21. Consumo de carne

En cuanto al estudio de la relación de las concentraciones de BPA con el consumo de carne, no se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia semanal de consumo de dicho alimento, tanto para tejido adiposo como para suero (*Tabla IV.88*).

Tabla IV.88 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de carne

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤ 2 vez/semana	6	19,61	2,79	6,67	57,64	0,546
	> 2 vez/semana	39	14,45	2,09	11,38	18,37	
Suero	≤ 2 vez/semana	5	37,24	10,96	1,91	727,64	0,410
	> 2 vez/semana	43	67,14	7,72	35,79	125,96	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.22. Consumo de fiambres o embutidos

El estudio de la relación de las concentraciones de BPA con el consumo de embutidos y fiambre, queda reflejado en la *Tabla IV.89*. No se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al consumo habitual de dichos alimentos, tanto para tejido adiposo como para suero.

Tabla IV.89 Relación entre concentraciones de BPA y consumo diario de fiambres

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	29	14,18	2,05	10,78	18,64	0,759
	Si	17	15,77	2,45	9,96	24,98	
Suero	No	29	55,22	8,08	24,94	122,26	0,654
	si	20	69,94	7,82	26,70	183,18	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Si categorizamos la población en función del tipo de fiambre consumido de forma habitual, se aprecian niveles de BPA inferiores en las personas no consumidoras habituales de carne de fiambres y/o embutidos, en las muestras de tejido adiposo, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla IV.90). El patrón de distribución de las concentraciones de BPA en suero es totalmente diferente al obtenido en tejido adiposo.

Tabla IV.90 Relación entre concentraciones de BPA y tipo de fiambre consumido

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	No toma	5	8,26	1,45	5,22	13,05	0,118
	Ebutido	7	15,27	2,88	5,74	40,62	
	Fiambre	15	19,37	1,89	13,63	27,53	
	Ambos	18	13,85	2,28	9,19	20,85	
Suero	No toma	3	146,38	11,77	0,32	66875,55	0,406
	Ebutido	8	28,29	7,22	5,42	147,75	
	Fiambre	15	90,76	7,18	30,46	270,45	
	Ambos	22	49,13	8,32	19,20	125,67	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.23. Consumo de grasas

En relación a la ingesta de grasas, nuestra población de estudio declaró consumir aceite de oliva como aceite vegetal mayoritario, y mantequilla/margarina de forma moderada (al menos una vez por semana). La relación de estas dos variables con los niveles de BPA se muestra en las *Tablas IV.91 IV.92*, respectivamente. Los individuos que consumían preferentemente aceite de oliva tienen mayores niveles de BPA, tanto en tejido adiposo como en suero, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al escaso número de individuos en el grupo que gastaban cualquier tipo de aceite.

Tabla IV.91 Relación entre concentraciones de BPA y tipo de aceite

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Aceite de oliva	37	15,18	2,15	11,76	19,60	0,252
	Cualquiera	5	9,35	2,04	3,85	22,68	
Suero	Aceite de oliva	39	84,01	7,72	43,31	162,94	0,161
	Cualquiera	6	30,07	7,30	3,73	242,32	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.92 Relación entre concentraciones de BPA y consumo de mantequilla o margarina

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. adiposo	No	19	12,32	2,16	8,49	17,87	0,193
	Si	23	17,63	2,06	12,89	24,12	
Suero	No	19	68,03	8,09	24,83	186,37	0,845
	Si	24	75,50	7,73	31,83	179,08	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

En la *Tabla IV.93* se muestran las concentraciones de BPA en tejido adiposo y suero en función del patrón de consumo habitual de mantequilla y/o margarina. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla IV.93 *Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de mantequilla o margarina*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	Nunca	19	12,32	2,16	8,49	17,87	0,378
	1 vez/semana	11	14,97	2,04	9,27	24,17	
	3-4/semana	6	16,16	1,82	8,60	30,36	
	1 ≤ /día	6	25,97	2,28	10,91	61,81	
Suero	Nunca	19	68,03	8,09	24,83	186,37	0,745
	1 vez/semana	14	46,59	8,10	13,92	155,91	
	3-4/semana	6	107,89	9,68	9,97	1167,93	
	1 ≤ /día	7	54,45	7,63	8,31	356,63	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.24. Consumo de leche

Como la población infantil es consumidora habitual de leche, esta variable se consideró de manera continua, teniendo en cuenta el número de vasos de leche consumidos diariamente. En la *Tabla IV.94* se encuentran las correlaciones entre esta variable y los niveles de BPA en tejido adiposo (coeficiente de Spearman:-0,089, p=0,551) y suero (coeficiente de Spearman:-0,144, p=0,339).

Tabla IV.94 *Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de leche*

	n	C. Spearman	p
T. adiposo	47	-0,089	0,551
Suero	46	-0,144	0,339

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.3.25. Consumo de queso

Considerando el consumo de queso como variable dicotómica (sí consume/no consume), se encuentran niveles significativamente mayores dentro del grupo de niños que consumen queso de forma habitual, con respecto a los no consumidores ($p=0,048$), en las muestras de tejido adiposo. En las muestras de suero se observa el fenómeno opuesto, siendo los que no consumen queso, los que presentan concentraciones mayores de BPA, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Tabla IV.95 Relación entre concentraciones de BPA y consumo habitual de queso

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	37	12,92	2,06	10,15	16,45	0,048
	Si	9	25,40	2,24	13,64	47,28	
Suero	No	41	70,87	8,19	36,49	137,63	0,208
	Si	8	27,76	5,55	6,63	116,33	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Si estudiamos la variedad de queso consumida, en tejido adiposo se encuentran concentraciones de BPA superiores en los sujetos que consumían habitualmente queso curado/semicurado, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,033$). En las muestras de suero los sujetos queso fresco o cualquier tipo de variedad presentaron las mayores

concentraciones, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla IV.96 Relación entre concentraciones de BPA y tipo de queso consumido

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	No toma	10	9,38	1,92	5,88	14,97	0,033
	Fresco	12	13,68	1,88	9,16	20,42	
	Curado/Semi	14	24,24	2,06	15,97	36,80	
	Indistintamente	10	12,64	2,35	6,86	23,31	
Suero	No toma	10	49,33	10,36	9,26	262,67	0,279
	Fresco	9	106,79	5,76	27,79	410,33	
	Curado/Semi	17	33,12	6,66	12,49	87,79	
	Indistintamente	13	107,08	9,07	28,24	405,98	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.26. Frecuencia de consumo de legumbres

La distribución de las concentraciones de BPA en función de la frecuencia semanal de consumo de legumbres, alimentos que generalmente se comercializan envasados en plástico, queda recogida en la *Tabla IV.97*, tanto para tejido adiposo como para suero. No se observó ninguna relación entre esta variable y las concentraciones de BPA determinadas.

Tabla IV.97 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de legumbres

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido	≤1 vez/semana	10	16,30	1,95	10,10	26,30	0,446

Adiposo	2 veces/semana	17	12,26	2,18	8,21	18,30	
	>2 veces/semana	19	16,50	2,32	11,01	24,75	
Suero	≤1 vez/semana	10	101,87	8,76	21,57	481,20	0,659
	2 veces/semana	14	44,23	6,65	14,82	132,06	
	>2 veces/semana	24	63,67	8,64	25,62	158,23	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.27. Frecuencia de consumo de verduras

La distribución de las concentraciones de BPA en función de la frecuencia semanal de consumo de verduras, tanto cocinadas como crudas, queda recogida en las *Tablas IV.98 y IV.99*, para tejido adiposo y para suero. No se observó ninguna relación entre estas variables y las concentraciones de BPA determinadas.

Tabla IV.98 *Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de verduras cocinadas*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤1 vez/semana	16	12,87	2,60	7,74	21,41	0,595
	2 veces/semana	7	15,67	2,36	7,08	34,71	
	>2 veces/semana	22	16,07	1,91	12,06	21,40	
Suero	≤1 vez/semana	16	56,31	8,37	18,15	174,72	0,560
	2 veces/semana	10	33,34	6,01	9,24	120,25	
	>2 veces/semana	22	74,93	8,39	29,18	192,39	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.99 *Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de verduras crudas*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤1 vez/semana	23	12,86	2,30	8,96	18,45	0,240
	>2 veces/semana	23	16,91	2,04	12,42	23,02	
Suero	≤1 vez/semana	21	33,82	6,76	14,17	80,71	0,063
	>2 veces/semana	28	94,43	8,07	42,03	212,15	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.28. Frecuencia de consumo de fruta

En cuanto al estudio de la relación de las concentraciones de BPA con el consumo de fruta, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia semanal de consumo de dicho alimento, tanto para tejido adiposo como para suero (*Tabla IV.100*).

Tabla IV.100 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de fruta

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤1 vez/semana	8	16,14	2,26	8,15	31,98	0,543
	>2 vec./semana	38	14,47	2,19	11,19	18,71	
Suero	≤1 vez/semana	6	68,12	9,37	6,51	713,26	0,795
	>2 vec./semana	43	59,86	7,85	31,75	112,83	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.29. Frecuencia de consumo de huevos

Respecto a la frecuencia semanal de consumo de huevos, no se observa relación entre dicha variable y las concentraciones de BPA, ni en las muestras de tejido adiposo ni en las de suero.

Tabla IV.101 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de huevos

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤1 vez/semana	20	15,90	2,08	11,28	22,43	0,314
	2 veces/semana	15	17,31	2,18	11,24	26,66	
	>2 veces/semana	11	10,33	2,27	5,95	17,93	
Suero	≤1 vez/semana	19	42,09	7,50	15,93	111,20	0,577
	2 veces/semana	18	85,61	8,47	29,59	247,70	
	>2 veces/semana	12	65,19	8,06	17,32	245,43	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.30. Frecuencia de consumo de pan

El estudio de la relación de las concentraciones de BPA con la frecuencia de consumo de pan, se muestra en la *Tabla IV.102*. No se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia semanal de consumo de dicho alimento en la población de estudio, tanto para tejido adiposo como para suero.

Tabla IV.102 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de pan

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤1 vez/día	21	16,11	2,20	11,25	23,08	0,601
	>1 vez/día	24	13,73	2,22	9,80	19,22	
Suero	≤1 vez/día	18	105,35	7,17	39,57	20,49	0,083
	>1 vez/día	28	45,49	7,72	20,60	100,46	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.31. Frecuencia de consumo de pasta

La distribución de las concentraciones de BPA en función de la frecuencia semanal de consumo de pasta, queda recogida en *Tabla IV.103*, para tejido adiposo, y para suero. No se observó ninguna relación entre esta variable y las concentraciones de BPA determinadas.

Tabla IV.103 Relación entre concentraciones de BPA y frecuencia de consumo de pasta

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	≤1 vez/semana	38	15,34	2,28	11,70	20,09	0,562
	>2 veces/semana	8	12,24	1,72	7,79	19,23	
Suero	≤1 vez/semana	37	61,69	7,44	31,60	120,43	0,701
	>2 veces/semana	12	58,18	10,01	13,46	251,50	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.32. Consumo habitual de comida enlatada

Considerando el consumo de comida enlatada como variable dicotómica (sí /no), se encuentran niveles mayores dentro del grupo de niños que la consumen de forma habitual con respecto a los no consumidores, tanto en las muestras de tejido adiposo como en las de suero, pero en ambas matrices con diferencias no estadísticamente significativas.

Tabla IV.104 Relación entre concentraciones de BPA y consumo de comida enlatada

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	25	13,13	2,21	9,46	18,20	0,221
	Si	21	16,94	2,14	11,98	23,95	
Suero	No	20	39,83	7,87	15,17	104,58	0,324

	Si	29	81,42	7,68	37,49	176,86	
--	----	----	-------	------	-------	--------	--

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Si la variable “comida enlatada” se estudia en función de la frecuencia de consumo, tampoco se encuentra relación con las concentraciones de BPA determinadas.

Tabla IV.105 Relación entre concentraciones de BPA y cantidad de latas consumidas

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	Nunca	25	13,13	2,21	9,46	18,20	0,086
	1 lata/semana	12	20,73	2,16	12,73	33,77	
	≥1 lata/semana	9	12,94	2,02	7,53	22,22	
Suero	Nunca	20	39,83	7,87	15,17	104,58	0,588
	1 lata/semana	16	78,54	8,92	24,47	252,02	
	≥1 lata/semana	13	85,12	6,87	26,56	272,81	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.3.33. Concentraciones de BPA en tejido adiposo y variables predictoras. Análisis multivariante

Con objeto de encontrar las variables independientes que expliquen de forma global las concentraciones de BPA en tejido adiposo de la población de estudio, se realizó un análisis de regresión lineal multivariante de los factores predictores asociados a las concentraciones logarítmicas de BPA, incluyendo en el modelo variables independientes relacionadas y variables que, aunque no estuvieran asociadas, la literatura científica había indicado algún tipo de relación. Los resultados del mismo se muestran en la *Tabla IV. 106*.

Tabla IV.106 Modelo de regresión lineal multivariante para BPA
($r^2 = 0,576$)

	β	EE	p
(Intercept)	-0,58	0,83	0,486
Edad	-0,01	0,04	0,763
IMC	0,13	0,04	0,001
Consume pescado blanco	1,01	0,30	0,002
Consume fiambres o embutidos	1,19	0,28	<0,001
Nº empastes de composite	0,49	0,24	0,047
Nº vasos de agua	-0,55	0,14	<0,001
Lugar entre los hermanos	-0,20	0,12	0,100

β : Coeficiente de regresión lineal; EE: Error estándar

El modelo final explica un 57,6% de la variabilidad de los niveles de BPA en tejido adiposo. Los principales factores que se relacionaron positivamente con los niveles de BPA fueron IMC, consumo de pescado blanco, consumo de fiambres o embutidos y número de empastes de composite. Los factores que influyeron negativamente sobre las concentraciones fueron el número de vasos de agua y lugar que ocupa el sujeto de estudio entre sus hermanos.

IV.3.34. Concentraciones de BPA en suero y variables predictoras. Análisis multivariante

Con el mismo objetivo que en las muestras de tejido adiposo, y siguiendo el mismo modelo estadístico, se realizó un análisis de regresión lineal multivariante de los factores predictores asociados a las concentraciones

logarítmicas de BPA en las muestras de suero de los sujetos de estudio. Los resultados del mismo se muestran en la *Tabla IV.107*.

Tabla IV.107 Modelo de regresión lineal multivariante para BPA
($r^2 = 0,180$)

	β	EE	p
(Intercept)	-1,80	2,21	0,420
Edad	0,06	0,11	0,566
IMC	0,20	0,11	0,082
Consume pescado blanco	2,48	1,02	0,020

β : Coeficiente de regresión lineal; EE: Error estándar

El modelo explicó una variabilidad del 18,0% y los principales factores que influyeron sobre los niveles séricos de BPA encontrados fueron, en esta matriz, IMC y consumo de pescado blanco, ambos de manera positiva.

Si se comparan los dos modelos obtenidos, se puede apreciar que factores predictores asociados a las concentraciones logarítmicas de BPA en las muestras de suero y en las muestras de tejido adiposo, son diferentes, y nuestra aproximación ha sido capaz de explicar un mayor porcentaje en las muestras de grasa.

IV.4. CONCENTRACIONES DE DERIVADOS CLORADOS DE BPA Y RELACIÓN CON LAS VARIABLES PREDICTORAS DE EXPOSICIÓN

En este apartado se expone el análisis, tanto bivariante como multivariante, de las concentraciones de derivados clorados de BPA, en relación con las

variables predictoras de exposición. Con el ánimo de reducir la extensión de la exposición de resultados de esta memoria, se exponen, en este caso y para cada uno de los derivados, sólo aquellas relaciones que resultaron estadísticamente significativas en alguna de las muestras analizadas (tejido adiposo o suero).

IV.4.1. Concentraciones de BPA monoclorado (BPACl) y variables predictoras. Estudio bivariante

IV.4.1.1. Padecimiento de alteraciones del tracto urinario

En la población de estudio no se aprecia asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas y en tejido adiposo del derivado monoclorado de BPA, y padecimiento de alteraciones del tracto urinario.

Tabla IV.108 Relación entre concentraciones de BPACl y alteraciones del tracto urinario

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	62	6,23	1,71	5,44	7,14	0,089
	Si	5	7,30	1,83	3,44	15,49	
Suero	No	46	131,82	10,74	65,13	266,78	0,115
	Si	4	342,56	8,79	10,79	10879,38	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.4.1.2. Hábito tabáquico de los progenitores

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las muestras de suero de los hijos de padres fumadores (Tabla IV.109), diferencia que se

mantiene en el análisis bivariante cuando se considera si alguno de los dos progenitores era fumador (*Tabla IV.110*). Sin embargo, esta significación desaparece en el análisis multivariante posterior. Este hecho hace pensar que los resultados del análisis bivariante en este punto podrían estar sesgados por la influencia de otras variables, como por ejemplo, número de cigarrillos o duración de este hábito.

Tabla IV.109 *Relación entre concentraciones de BPACI y hábito tabáquico del padre*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	No fumador	25	6,16	1,80	5,03	7,53	0,668
	Fumador	33	6,29	1,65	5,26	7,52	
Suero	No fumador	21	40,68	6,56	17,27	95,80	0,001
	Fumador	29	352,32	9,62	148,90	833,63	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

Tabla IV.110 *Relación entre concentraciones de BPACI y condición de fumador de alguno de los progenitores*

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	20	5,28	1,77	4,04	6,89	0,063
	Si	48	6,67	1,69	5,73	7,76	
Suero	No	11	33,31	4,97	11,35	97,76	0,039
	Si	38	203,37	10,93	92,66	446,37	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.4.1.3. Concentraciones de BPA monoclorado (BPACI) en tejido adiposo y variables predictoras. Análisis multivariante

Con objeto de encontrar las variables independientes que expliquen de forma global las concentraciones de BPACI en tejido adiposo de la población de estudio, se realizó un análisis de regresión lineal multivariante de los factores predictores asociados a las concentraciones logarítmicas de BPA, incluyendo en el modelo variables independientes relacionadas y variables, que aunque no estuvieran asociadas, la literatura científica había indicado algún tipo de relación. La *Tabla IV.111* muestra el resultado del análisis.

Tabla IV.111 Modelo de regresión lineal multivariante para BPA-CI
($r^2 = 0,226$)

	β	EE	p
(Intercept)	1,42	0,49	0,003
Edad	-0,01	0,02	0,922
IMC	0,01	0,02	0,910
Estudios primarios o sin estudios	0,27	0,13	0,045
Consumo mayoritario de pescado blanco	0,39	0,23	0,100
Nº de vasos de leche diarios	0,35	0,17	0,042
Consumo de huevos inferior a 2/semana	-0,33	0,13	0,018

β : Coeficiente de regresión lineal; EE: Error estándar

El modelo explicó una variabilidad del 22,6%. Los principales factores que influyeron positivamente sobre los niveles de BPACI fueron IMC, bajo nivel educativo, consumo de pescado blanco y consumo de leche. El consumo de huevos se relacionó negativamente con los niveles de BPACI.

IV.4.1.4. Concentraciones de BPA monoclorado (BPACI) en suero y variables predictoras. Análisis multivariante

La *Tabla IV.114* muestra el resultado del análisis de regresión lineal multivariante de los factores predictores de las concentraciones de BPA-CI en suero.

Tabla IV.112 Modelo de regresión lineal multivariante para BPACI
($r^2 = 0,258$)

	β	EE	p
(Intercept)	-2,58	2,42	0,293
Edad	0,05	0,12	0,670
IMC	0,32	0,13	0,016
Madre fumadora	-1,35	0,64	0,041
Consumo de pescado blanco	3,04	1,12	0,009

β : Coeficiente de regresión lineal; EE: Error estándar

El modelo explicó una variabilidad del 25.8%. Los principales factores que influyeron positivamente sobre los niveles de BPA-CI fueron IMC y consumo de pescado blanco. En el modelo, el hábito tabáquico materno se relacionó negativamente con las concentraciones de BPA-CI.

IV.4.2. Concentraciones de BPA diclorado (BPACl₂) y variables predictoras. Estudio bivalente

IV.4.2.1. Alteraciones del tracto urinario

De nuevo, en la población de estudio se aprecia una correlación positiva y estadísticamente significativa entre las concentraciones del derivado diclorado de BPA, en muestras de suero de los individuos con alteraciones del tracto urinario, con una media geométrica de 492,87 ng/ml, frente a los 178,28 ng/ml de los sujetos sin esta condición. Sin embargo este comportamiento no se

apreció en las concentraciones de BPACl₂ obtenidas en las muestras de tejido adiposo de los mismos individuos.

Tabla IV.113 Relación entre concentraciones de BPACl₂ y alteraciones del tracto urinario

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	70	10,25	1,75	0,96	11,72	0,737
	Si	6	8,20	1,59	5,06	13,31	
Suero	No	46	178,28	10,86	87,0	362,00	0,033
	Si	4	491,87	6,53	24,84	9741,36	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.4.2.2. Padecimiento de estreñimiento

También se observa una correlación negativa y estadísticamente significativa entre las concentraciones del derivado diclorado de BPA en muestras de suero de los individuos con estreñimiento, comportamiento no apreciado en las concentraciones de BPACl₂ obtenidas en las muestras de tejido adiposo de los mismos individuos.

Tabla IV.114 Relación entre concentraciones de BPACl₂ y padecimiento de estreñimiento

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	57	4,05	1,42	3,30	4,97	0,737
	Si	19	5,56	1,60	1,73	17,92	
Suero	No	34	110,80	14,12	43,99	279,10	0,033
	Si	16	15,80	8,56	5,03	49,62	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.4.2.3. Consumo de alcohol por la madre

Al Estudiar el consumo de alcohol entre las madres de los sujetos de estudio, encontramos una correlación positiva entre los niveles de BPACl₂ en tejido adiposo y el número de vasos de cerveza ingeridos semanalmente (p=0,019) (Tabla IV.115).

Tabla IV.115 Relación entre concentraciones de BPACl₂ y consumo de alcohol por la madre

		n	C. Spearman	p
Tejido adiposo	Cerveza	76	0,268	0,019
	Vino	76	-0,108	0,354
	Licores	76	0,124	0,285
Suero	Cerveza	49	-0,127	0,385
	Vino	49	-0,04	0,979
	Licores	49	-0,112	0,442

C. Spearman: Coeficiente de Spearman

IV.4.2.4. Concentraciones de BPA diclorado (BPACl₂) en tejido adiposo y variables predictoras. Análisis multivariante

La Tabla IV.116 muestra el resultado del análisis de regresión lineal multivariante de los factores predictores de las concentraciones de BPACl₂ en muestras de tejido adiposo.

Tabla IV.116 Modelo de regresión lineal multivariante para BPACl₂
($r^2 = 0,232$)

	β	EE	p
(Intercept)	1,45	0,43	<0,001
Edad	0,07	0,03	0,014

IMC	0,03	0,02	0,210
Consume agua embotellada	0,21	0,12	0,080
Consumo de cerveza (madre)	0,08	0,03	0,009
Consumo de huevos <2/sem	0,34	0,14	0,018

β : Coeficiente de regresión lineal; EE: Error estándar

El modelo explicó una variabilidad del 23.2%. Los principales factores que influyeron positivamente sobre los niveles de BPACl₂ fueron la edad, consumo de agua embotellada, consumo materno de cerveza y consumo de huevos. En el modelo, el consumo de huevos se relacionó inversamente con las concentraciones de BPACl₂.

IV.4.2.5. Concentraciones de BPA diclorado (BPACl₂) en suero y variables predictoras. Análisis multivariante

La Tabla IV.117 muestra el resultado del análisis de regresión lineal multivariante de los factores predictores de las concentraciones de BPACl₂ en muestras de suero.

Tabla IV.117 Modelo de regresión lineal multivariante para BPACl₂
($r^2 = 0,247$)

	β	EE	p
(Intercept)	2,12	2,31	0,364
Edad	0,12	0,11	0,317
IMC	0,14	0,13	0,261
Ocupación de la madre (hogar)	-1,54	0,63	0,019
Madre o padre fumador	1,32	0,75	0,087

β : Coeficiente de regresión lineal; EE: Error estándar

El modelo explicó una variabilidad del 24,7%. El hábito tabáquico de los progenitores se relacionó positivamente con los niveles séricos de BPACl₂,

mientras que la dedicación materna a las labores de casa como actividad laboral principal durante el embarazo, se relacionó negativamente con dichas concentraciones.

IV.4.3. Concentraciones de BPA triclorado (BPACl₃) y variables predictoras. Estudio bivariante

IV.4.3.1. Padecimiento de alteraciones del tracto urinario

También se aprecia una correlación positiva y estadísticamente significativa entre las concentraciones del derivado triclorado de BPA en muestras de suero de los individuos con alteraciones del tracto urinario, con una media geométrica de 187,06 ng/ml, frente a los 53,78 ng/ml de los sujetos sin esta condición.

Tabla IV.118 Relación entre concentraciones de BPACl₃ y padecimiento de alteraciones del tracto urinario

		n	GM	GSD	IC 95%		p
T. Adiposo	No	16	4,36	1,47	3,55	5,36	-
	Si	1	-	-	-	-	
Suero	No	34	53,78	14,28	24,41	118,45	0,019
	Si	16	187,06	11,46	3,86	9061,25	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.4.3.2 Hábito tabáquico del padre

En el caso del derivado triclorado de BPA, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las muestras de suero de los hijos de padres fumadores (Tabla IV.119). Sin embargo esta significación desaparece en el análisis multivariante posterior.

Tabla IV.119 Relación entre concentraciones de BPACl₃ y hábito tabáquico del padre

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido Adiposo	No fumador	6	4,16	1,36	3,01	5,77	0,546
	Fumador	11	4,35	1,53	3,26	5,80	
Suero	No fumador	21	14,99	9,08	5,49	40,90	0,002
	Fumador	29	161,10	12,25	62,12	417,82	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

IV.4.3.3. Tipo de pescado consumido con mayor frecuencia

La *Tabla IV.120* muestra las diferencias de medias geométricas de BPACl₃ en tejido adiposo y en suero en función del tipo de pescado consumido de forma mayoritaria, entre los sujetos que declararon consumirlo de forma habitual. Respecto a las muestras de suero, aquellos individuos con consumo indistinto de ambos tipos de pescado presentan concentraciones mayores de BPACl₃, mientras que los que comen principalmente pescado azul son los que muestran menores concentraciones de BPACl₃, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Tabla IV.120 Relación entre concentraciones de BPACl₃ y tipo de pescado consumido

		n	GM	GSD	IC 95%		p
Tejido adiposo	Pescado azul	2	3,74	1,22	0,61	22,90	0,627
	Pescado blanco	9	4,11	1,55	2,94	5,75	
	Indistintamente	5	5,08	1,43	3,25	7,94	
Suero	Pescado azul	4	3,31	1,49	1,76	6,21	0,046
	Pescado blanco	20	63,45	13,74	18,61	216,28	
	Indistintamente	23	106,19	13,18	34,82	323,89	

GM: Media geométrica; GSD: Desviación geométrica estándar; IC: Intervalo de confianza

V. DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

Puesto que la exposición de la población infantil a BPA y sus derivados clorados, reconocidos mimetizadores hormonales, es generalizada y afecta a la totalidad de los individuos investigados, los hallazgos presentados en esta Tesis Doctoral confirman la hipótesis de trabajo. La exposición parece haberse producido, principalmente, a través de la alimentación, distribuyéndose los BPAs por el torrente sanguíneo y acumulándose en los compartimentos tisulares en función de su contenido graso. La opción elegida de evaluar la exposición tanto en sangre/suero como en tejido adiposo, se muestra como una excelente alternativa, más apropiada que la desarrollada en otros estudios que se limitan a una sola matriz biológica y no tienen en consideración la mayor o menor lipofilia de estos compuestos químicos.

Nuestros propios resultados también indican que los niños de la serie investigada han estado y están expuestos, durante periodos críticos de su desarrollo, a mezclas complejas de compuestos contaminantes, potencialmente adversos para el desarrollo reproductivo y neuroconductual, dado su carácter hormonal y antihormonal, y a las interacciones con las hormonas endógenas y sus receptores nucleares.

En principio, para estimar la exposición humana a BPAs, se podrían haber monitorizado los niveles de estos compuestos mediante la medida directa de sus residuos en muy diferentes matrices biológicas -sangre, orina, leche materna y en otros tejidos o fluidos- y en un momento determinado en la vida del individuo. En este trabajo de tesis doctoral se diseñó un protocolo de trabajo que nos permitió estimar la concentración de BPAs en muestras de tejido adiposo y de suero, aproximación que cubre la mayor parte de las

posibles fuentes de exposición, aunque ocurra por vías no conocidas, y abarca un grupo importante de isómeros y derivados. Se trata, pues, de un estudio pionero, ya que a la determinación de BPA, se une la detección y cuantificación de los derivados clorados de BPA en ambas matrices biológicas.

Los datos resultantes sobre la exposición a BPA y sus derivados clorados son difícilmente comparables con otros estudios, debido a que son muy pocos los trabajos donde se hayan realizado medidas de exposición a este grupo de compuestos químicos en las dos matrices biológicas. En el caso particular del tejido adiposo y BPA y sus derivados clorados, tan solo existe el antecedente del trabajo realizado por nuestro grupo de investigación en una muestra de población adulta femenina (Fernández et al., 2007a). No obstante las diferencias de edad -la población infantil elegida tiene una edad media de 4 años de edad y se distribuye en un rango que va desde tan solo pocos meses a los 11,08 años y la población femenina adulta tenía una edad media de 59,7- las dos poblaciones corresponden a la misma área geográfica, y los periodos de reclutamiento son próximos entre si. Algunas observaciones referentes a ambos estudios, dignas de mención, se comentan en los siguientes párrafos.

Al igual que se ha subrayado en numerosos estudios de investigación sobre exposición a BPA en población infantil, utilizando distintas matrices biológicas, el residuo de BPA fue mas frecuentemente detectado en las muestras de tejido adiposo de la población infantil que en las muestras de tejido adiposo de población adulta (61% vs 55%). Además, la concentración media de BPA fue cuatro veces mayor entre los niños cuando se comparó con los resultados obtenidos en las mujeres adultas ($14,61 \pm 3,59$ vs $3,16 \pm 4,11$ ng/g de tejido adiposo). Por otra parte, los derivados clorados de BPA, considerando la sumatoria ΣBPACl_x , siguieron un patrón similar al residuo de BPA, apareciendo en el 100% de las muestras infantiles analizadas frente al 80% de las muestras de la población adulta. También, la concentración media de BPACl_2 fue mayor en la población infantil (9,88 vs 3,05 ng/g de tejido adiposo). Por último, el derivado tetraclorado BPACl_4 , que no fue detectado en ninguna de las muestras de tejido adiposo procedentes de población adulta, se encontró en el 10% de las muestras de grasas procedentes de niños.

En los últimos cinco años se ha producido un aumento espectacular de las publicaciones científicas que ponen de manifiesto la exposición a BPA de diferentes poblaciones alrededor del mundo (Arakawa *et al.*, 2004; Calafat *et al.*, 2005, 2008; Fujimaki *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2003; Miyamoto & Kotake 2006; Ouchi & Watanabe 2002; Volkel *et al.*, 2005; Wolff *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2003, 2006, Benachour & Aris, 2009). La mayor parte de los trabajos publicados se han centrado en describir los niveles de BPA en sangre, o bien de sus metabolitos en orina, como una forma indirecta de estimar la exposición derivada de diferentes fuentes y soslayar el problema de la contaminación interna en la manipulación de las muestras. Así, por ejemplo Sun y colaboradores encontraron BPA en muestras de leche humana de mujeres sanas, en el rango de 0,28-0,97 ng/ml (Sun *et al.*, 2004), mientras que la concentración media publicada por el grupo de Ye se situaba en 1,9 ng/ml, estando el 90% de la población estudiada expuesta a BPA libre y/o conjugado (Ye *et al.*, 2006). La concentración descrita en calostro por Kuruto-Niwa fue incluso mayor ($3,41 \pm 0,01$ ng/ml), a pesar de que el calostro es menos rico en grasa que la leche madura (Kuruto-Niwa *et al.*, 2007). El residuo de BPA también ha sido descrito en muestras de placenta, con un valor medio de 11,2 ng/g de tejido y un valor máximo de 104,9 ng/g de tejido, sensiblemente superior a los $4,4 \pm 0,64$ ng/ml encontrados en las muestras de suero de las mismas mujeres (Schonfelder *et al.*, 2002). Recientemente, Padmanabhan describió el residuo de BPA en muestras de suero de mujeres embarazadas en el rango 0,5-22,3 ng/ml (Padmanabhan *et al.*, 2008). Por último, un valor máximo de 66,48 ng/ml fue encontrado en muestras sanguíneas de mujeres coreanas embarazadas (Lee *et al.*, 2008).

Los valores medios del residuo de BPA descritos en este trabajo de tesis doctoral, utilizando muestras de suero, son ligeramente superiores a los descritos en la bibliografía consultada, ya que se alcanzan los $58,46 \pm 7,78$ ng/ml y el rango se sitúa entre 4 y 1275 ng por ml de suero. Tomados en conjunto, todos estos estudios sugieren que la exposición humana a BPA es generalizada, aunque los datos revelan algunas diferencias sustanciales, tanto geográficas como de edad y de género, que es necesario discutir.

Lo cierto es que establecer comparaciones entre los niveles de BPA descritos en las publicaciones referidas y en el presente trabajo, no está exento de dificultad. Esto es debido, fundamentalmente, a la existencia de numerosas variables particulares de cada protocolo de estudio que podrían influir en los resultados obtenidos. Entre estas, habría que resaltar: i) la naturaleza de matriz biológica donde se realiza el análisis (orina, suero/sangre, tejido adiposo), ii) la hora de colección de la misma, crítica en el caso de las muestras de orina [entre las 10.00 y 17.00 hr. (Volkel *et al.*, 2005) o antes del desayuno (Yang *et al.*, 2003)]; iii) el método analítico utilizado [colorimetría (Ouchi & Watanabe, 2002), dilución isotópica–espectrometría de masas en tandem (Volkel *et al.*, 2005), o fluorescencia (Yang *et al.*, 2003)]; iv) los límites de detección establecidos; y v) los métodos de corrección empleados para la expresión de los resultados (ajuste por creatinina en el caso de las muestras de orina, expresión por contenido de lípidos en el caso de tejido adiposo).

Por otra parte, regulaciones particulares establecidas en los países donde se realizaron los estudios en cuanto al uso de BPA y límites ocupacionales de exposición, podrían también determinar la exposición y, por ende, los rangos de concentraciones de BPA encontradas. Así, en países como Canadá, que han regulado el uso de BPA en productos destinados a población infantil, desaconsejando el uso de biberones de policarbonato, podrían encontrarse menores concentraciones de BPA circulante en los niños monitorizados, como consecuencia de las medidas preventivas implementadas.

Como se ha comentado, existe una amplia variedad de técnicas para la cuantificación y análisis de BPA y sus metabolitos, por lo que no es fácil definir una única metodología de referencia. Por esta razón, el método de extracción y análisis de las muestras biológicas utilizada en esta tesis doctoral fue elegido entre las técnicas disponibles y validado en estudios previos que confirmaron la sensibilidad, precisión y reproducibilidad de la técnica (Fernández *et al.*, 2007a; Olea *et al.*, 2008). De hecho, debido a las bajas concentraciones de estos compuestos observadas en las distintas matrices biológicas, son necesarias metodologías sensibles para su cuantificación, y obligan a tratar con cautela los

resultados de trabajos en los que la mayor parte de las muestras analizadas se presentan como no detectables, o por debajo de los límites de cuantificación.

Los requisitos de sensibilidad y especificidad se cumplen en las técnicas basadas en espectrometría de masas (EM), ya que la detección es altamente selectiva, siendo además, los Límites de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ) suficientemente bajos para determinar BPA y sus metabolitos. Además, en el caso de la Cromatografía de Gases con EM (CG/EM), utilizada para muestras complejas y heterogéneas como es el tejido adiposo, la separación cromatográfica es francamente reproducible. Si se compara la técnica de CG/EM con la Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas en tándem (CL/EM-EM), una ventaja de esta última es el alto rendimiento, debido a la ausencia del paso de derivatización para generar derivados volátiles de BPA. En cuanto a Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), hay que destacar, que los equipos que disponen de detector electroquímico, tienen la sensibilidad necesaria, y con la incorporación de detectores coulométricos en serie, se obtiene también una alta selectividad. No obstante, cuando se usa un detector de fluorescencia, pueden producirse interferencias con otros compuestos fluorescentes, además de reducirse la selectividad al ser necesaria la excitación de BPA. Por último, también se puede determinar BPA mediante el uso de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas, en tests tipo ELISA (Kodaira *et al.*, 2000; Ohkuma *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2003,) que, aunque son baratos y sencillos de utilizar, parecen no ser recomendables para cuantificar el residuo de BPA (Fukata *et al.*, 2006), ya que es posible que se produzcan fenómenos de reactividad cruzada con otros componentes de la muestras y se sobreestime la concentración del residuo. En nuestro estudio, las muestras de tejido adiposo fueron analizadas usando SPE y determinando y cuantificando los analitos, tras la reacción de derivatización, mediante GC/MS. Por su parte, las muestras de suero se analizaron mediante cromatografía líquida en tandem, con detector electroquímico de alta sensibilidad. En ambos casos se trata de metodologías con suficiente grado de confianza y reproducibilidad.

Al igual que ocurre con la variabilidad metodológica, los niveles de BPA en la población general han sido investigados en una serie de trabajos con series de

individuos muy heterogéneas. Así, por ejemplo, en una submuestra no representativa de la población general, procedente de la encuesta nacional de salud y nutrición americana (NHANES III), que incluía hombres y mujeres de edades comprendidas entre los 20 y 59 años de edad, Calafat y colaboradores describieron que la concentración geométrica media de BPA, entre los sujetos estudiados era de 1,33 µg/L (Calafat *et al.*, 2005). La publicación posterior del mismo grupo, incluyendo un número mayor de individuos representativos de población general americana, con un amplio rango de edad, sexo y raza, procedentes también de NHANES (NHANES, 2003–2004), confirmó que más del 90% de los participantes tenían niveles detectables de BPA (libre y/o conjugado) en las muestras de orina analizadas (Calafat *et al.*, 2008). Entre los sujetos examinados, las mujeres presentaron niveles de BPA significativamente mayores que los varones ($p = 0,043$) (Calafat *et al.*, 2008). Estas diferencias podrían reflejar no solo desigualdades en la forma de exposición, sino también rutas metabólicas y farmacocinéticas específicas según géneros. Sin embargo la relevancia de esta observación aun no se conoce. En el estudio descrito en esta tesis doctoral también se ha puesto de manifiesto que las niñas presentaban mayores concentraciones de BPA, tanto en muestras de tejido adiposo como de suero, con una media geométrica de 92,06 ng/ml en suero, frente a los 51,18 ng/ml de la población masculina. Sin embargo, probablemente debido al pequeño número de sujetos, no se alcanzó la significación estadística en la comparación. Esta situación tampoco es infrecuente, de hecho, Yamano y colaboradores tampoco encontraron diferencias significativas debidas al sexo de los escolares japoneses estudiados, a pesar de que la población investigada alcanzó los cuatrocientos individuos (Yamano *et al.*, 2008).

No es frecuente que se encuentren diferencias de forma sistemática en los niveles de BPA en función del género (Kim *et al.*, 2003; Takeuchi & Tsutsumi 2002; Yang *et al.*, 2006). Kim y colaboradores encontraron concentraciones de BPA en orina de población adulta coreana ($n=30$) similares, tanto en hombres ($2,82 \pm 0,73$ µg/L) como en mujeres ($2,76 \pm 0,54$ µg/L), aunque los hombres tenían niveles significativamente mayores de BPA-glucurónido que las mujeres ($p < 0,01$), donde el metabolito predominante fue el BPA-sulfato (Kim *et al.*,

2003). Tampoco se encontraron diferencias de género en otro estudio de exposición a BPA llevado a cabo en población coreana (n=160) por Yang y colaboradores (Yang *et al.*, 2006). Yang había descrito previamente (2003) una concentración de BPA media de 9,54 µg/L entre los 73 sujetos investigados (34 hombres y 39 mujeres). La concentración media de BPA descrita por Ouchi & Watanabe (2002) entre 48 mujeres japonesas, fue de 1,2 µg/L, con un rango de 0,2–19,1 µg/L.

El trabajo basado en la encuesta NHANES también describe una mayor prevalencia del residuo de BPA y sus metabolitos en la orina de los niños analizados. El estudio NHANES establece unos criterios estrictos de inclusión que solo permiten el reclutamiento de población mayor de 6 años de edad. Aun así, se describe que los individuos con edades comprendidas entre los 6 y los 11 años tienen concentraciones de BPA significativamente mayores que los individuos adolescentes (12-19 años de edad) y estos, a su vez, concentraciones mayores que la encontradas en población adulta. Los valores medios de BPA total (libre mas conjugado) fueron de 4,5 µg/L en niños, 3,0 µg/L en adolescentes, 2, 5 µg/L en población adulta, respectivamente (Calafat *et al.*, 2008). Por su parte, Wolff y colaboradores describieron una concentración media de BPA de 2,0 µg/L entre niñas de 6 a 8 años de edad (Wolff *et al.*, 2007), y Liu y colaboradores confirmaron que las concentraciones de BPA son mas altas en los niños que en los adolescentes o en los adultos (Liu *et al.*, 2005).

En el estudio descrito en esta tesis doctoral también se ha puesto de manifiesto que los sujetos de menor edad presentaban mayores concentraciones de BPA tanto en muestras de tejido adiposo como de suero, apreciándose una correlación negativa entre la edad de los sujetos reclutados y las concentraciones de BPA, es decir una disminución de los niveles de BPA, tanto en tejido adiposo como en suero, conforme aumenta la edad de los sujetos (coeficientes de Spearman: -0.060 y -0,257). De nuevo, debido al pequeño número de sujetos, las diferencias no fueron, en ningún caso, estadísticamente significativas, aunque en el caso particular de las medidas en muestras de suero se acercara a la significación (p = 0,066).

También sobrepeso y obesidad podrían influir sobre el acúmulo en el tejido graso de los contaminantes lipofílicos. De hecho, así se ha sugerido para los compuestos orgánicos persistentes (Cerrillo *et al.*, 2006). Por esta razón es interesante la observación de Wolff y colaboradores para la presencia y concentración de BPA en orinas de niñas de 6 a 9 años de edad. Las concentraciones de BPA total (libre y conjugado) encontradas en la orina de estas niñas con un IMC < percentil 85, fueron superiores a las halladas entre las del grupo con IMC > percentil 85 (Wolff *et al.*, 2007), situación que es aparentemente paradójica, puesto que el sobrepeso se acompañaría de una menor excreción de BPA. No obstante, hay que resaltar que las medidas en orina reflejan los niveles de exposición inmediata, pero no los niveles internos del contaminante. En nuestro estudio, hemos podido constatar este mismo hecho, ya que que en ambas matrices biológicas investigadas se presenta una disminución de los niveles de BPA con un incremento de IMC de los sujetos (coeficiente de Spearman= -0,222 y -0,082, para grasa y suero, respectivamente). Además, cuando la población de estudio se categorizó por encima y por debajo del percentil 85 de IMC, no se alcanzó la significación estadística para la comparación. Por último, ni Yamano ni Calafat encontraron asociación alguna entre el IMC de los niños estudiados en sus series y las concentraciones de BPA medidas (Yamano *et al.*, 2008, Calafat *et al.*, 2008). Queda por resolver el comportamiento aparentemente diferente que BPA y sus derivados clorados tendrán en cuanto a persistencia en los tejidos corporales y vías de metabolización.

Más recientemente, de nuevo Calafat y colaboradores han publicado los niveles de exposición a BPA en población infantil (n= 54) procedente de dos unidades de cuidados intensivos neonatales. La concentración geométrica media de BPA encontrada en los prematuros fue un orden de magnitud mayor (30,3 µg/L) que la descrita para la población general adulta (2,6 µg/L), incluso mayor que la descrita en población infantil (6-11 años de edad) (3,7 µg/L) y casi el doble que la concentración del percentil 95 entre esta misma población (16,0 µg/L), según datos procedentes de NHANES (2003–2004) (Calafat *et al.*, 2008). En el análisis no ajustado, la concentración media total de BPA fue

además un orden de magnitud mayor entre los prematuros con 25-27 semanas de edad que entre los que tenían 28-34 semanas, lo que los autores atribuyen en parte al tratamiento médico recibido por los recién nacidos. Además, el tiempo de estancia en la unidad neonatal, o el método de alimentación de los niños (lecha materna vs. leche artificial) no parece estar relacionada con los valores de BPA, aunque la información disponible sobre edad gestacional, estancia media en la UCI y alimentación, no fue completa para todos los sujetos incluidos en el estudio (Calafat *et al.*, 2008). La mayoría de los compuestos encontrados en la orina de los prematuros correspondía a los metabolitos principales de BPA, es decir, a sus formas conjugadas glucurónica y sulfónica, lo que revela que la capacidad de metabolizar compuestos exógenos está ya instaurada en algún grado en los primeros momentos de la vida. Todos estos datos, junto con los encontrados en este trabajo de tesis doctoral, sugieren que la exposición a BPA en la población infantil es bastante mayor que la descrita entre individuos adultos y, por tanto, motivo de la mayor preocupación (Chapin *et al.*, 2008; National Toxicology Program-NTP, 2008).

Las concentraciones mas elevadas de BPA encontradas en niños de la población general, cuando se comparan con los adultos, podrían ser explicadas porque los sistemas biológicos de detoxificación en los niños tienen unas características específicas que van cambiando en cada una de las etapas de su desarrollo (Cohen *et al.*, 2008), y que condicionan un metabolismo mas lento y, en consecuencia, una mayor permanencia de los xenobióticos en sangre. Las rutas metabólicas en los niños, especialmente en los primeros meses de vida, son fisiológicamente inmaduras, con lo que la capacidad de detoxificación y excreción de compuestos químicos exógenos al organismo es inferior a aquella en adultos. Al mismo tiempo, desde la primera infancia hasta la pubertad se producen cambios en el tamaño, estructura y función de su organismo, que lo van preparando para un manejo más eficaz de los contaminantes, al la vez que determinan ventanas de especial susceptibilidad dependiente de la maduración de los órganos, aparatos y sistemas corporales.

A la susceptibilidad particular del niño se unen, durante la gestación, la infancia y la adolescencia, una gran variedad de factores sociales y psicosociales que

determinan la exposición a contaminantes, así como los efectos en salud derivados de dicha exposición. Los procesos de crecimiento y desarrollo se producen a un ritmo particularmente relevante en el caso de los sistemas nervioso, endocrino, reproductivo e inmune (Bruckner, 2000). Además, los niños están proporcionalmente más expuestos que los adultos a los contaminantes ambientales: los niños beben más agua, ingieren más alimentos e inhalan más aire en relación a su peso corporal. Mayores concentraciones de BPA en niños, respecto a adolescentes y adultos, han sido también evidenciadas para otros contaminantes ambientales como, por ejemplo, los contaminantes no persistentes, ftalatos y pesticidas organofosforados (CDC, 2005).

En resumen, la mayor frecuencia y concentración de BPA y metabolitos descrita en población infantil podría ser una consecuencia de los patrones específicos de absorción, distribución, metabolismo o excreción de estos compuestos, así como de: a) diferencias en las vías de exposición, por ejemplo en el uso o consumo de productos o de alimentos que contienen BPA; b) diferencias en el volumen de distribución y/o en el secuestro de BPA en diferentes compartimentos corporales.

El análisis de los mecanismos de detoxificación de compuestos fenólicos, como BPA, en el hombre, han revelado una actividad enzimática significativamente menor en niños que en adultos (Strassburg *et al.*, 2002). Aunque, casi de manera inmediata tras el nacimiento, algunas de las enzimas hepáticas implicadas en los procesos de metabolización fase II, como por ejemplo UDP-glucuronosiltransferasas, pueden activarse incluso en niños prematuros (Blake *et al.*, 2005), estos mecanismos de glucuronización no funcionan de manera tan eficaz como lo hacen en individuos adultos hasta que se alcanzan los primeros años de vida (de Wildt *et al.*, 1999). Se sabe que la farmacocinética de fármacos y compuestos químicos en fetos y neonatos difiere de la que tiene lugar durante la primera infancia o en la edad adulta, debido a que existe una expresión diferencial de las enzimas implicadas en estos procesos de metabolización, fundamentalmente las glucuronosiltransferasas, cuya actividad es dependiente de la edad. De hecho estas enzimas participan en la

metabolización hepática de BPA en el adulto (Strassburg *et al.*, 2002; Welshons *et al.*, 2006).

Las mayores concentraciones de BPA y metabolitos encontrados en los niños podrían deberse, también, a diferencias en el volumen de distribución y/o en su secuestro dentro de los diferentes compartimentos corporales (Nunez *et al.*, 2001, Mahalingaiah *et al.*, 2008). En este sentido, en este trabajo de tesis doctoral no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de BPA en tejido adiposo y la procedencia anatómica de la muestra grasa, indicando que la distribución de BPA es homogénea, no presentando su bioacumulación ninguna preferencia corporal. A pesar de que la metabolización de BPA en el hombre tiene lugar en pocas horas (vida media: ~ 6 hr) tras la exposición, mediante su conjugación principal a monoglucurónido (Pottenger *et al.*, 2000; Volkel *et al.*, 2002), una fracción del mismo es absorbida y distribuida en diferentes tejidos y órganos, pudiéndose almacenar en el tejido adiposo, tal y como se pone de manifiesto en este trabajo de tesis doctoral y en otros previos de nuestro grupo de investigación (Fernández *et al.*, 2007a; Olea *et al.*, 2008). También se ha descrito su presencia en tejido placentario (Schönfelder *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2009), al igual que en líquido amniótico (Yamada *et al.*, 2002, Ikezuki *et al.*, 2002) o leche materna (Sun *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2006; Kuruto-Niwa *et al.*, 2007). Este hecho es de enormes consecuencias ya que sitúa la exposición a BPA y sus derivados clorados en un plano muy similar a la exposición interna continua que se produce con otros contaminantes ambientales más lipofílicos, como los COPs.

En el caso de los contaminantes ambientales lipofílicos, las principales vías de exposición de los recién nacidos son a través de la placenta durante el embarazo y a través de la leche materna en los primeros meses de vida. Este sería también el caso de las vías de exposición de los derivados clorados de BPA, dado su carácter mas hidrofóbico, pero se desconoce en qué medida estas vías determinan la exposición a compuestos menos liposolubles como el BPA. Mahalingaiah y colaboradores compararon la concentración de BPA en orina de mujeres antes y durante el embarazo, describiendo un incremento no significativo del 33% en la concentración durante la gestación, cuando se

compara con los niveles previos al embarazo. La presencia de BPA en mujeres embarazadas también ha sido evidenciada por otros autores que han utilizado muestras de orina o de suero para la monitorización de las participantes (Padmanabhan *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002; Wolff *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2008). Durante el embarazo, se producen numerosos cambios fisiológicos en la mujer que pueden afectar a la distribución, metabolismo y eliminación de contaminantes ambientales, lo que podría contribuir a las variaciones en las medidas de exposición observados (Mahalingaiah *et al.*, 2008). Por otra parte, la transferencia madre-hijo de compuestos fenólicos parece estar asegurada, ya que algunos estudios han descrito la presencia de BPA en muestras de placenta (concentración media de BPA de 11,2 ng/g de tejido), líquido amniótico (concentración media de BPA de 8,3 ng/ml), y sangre de cordón umbilical (concentración media de BPA de 4,4 mg/ml) (Engel *et al.*, 2006; Ikezuki *et al.*, 2002; Schonfelder *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008).

Tras el nacimiento, los niños vuelven a estar expuestos a BPA bien a través de la leche materna que contenga este residuo y/o de la leche maternizada contaminada por BPA. De hecho, algunos autores han descrito la presencia de BPA en muestras de calostro y leche materna madura (Ye *et al.*, 2006; Kuruto-Niwa *et al.*, 2007), lo que sugiere que una de las principales vías de exposición a BPA en los primeros meses de vida sea a través de la lactancia natural (Kuo & Ding, 2004; Wong *et al.*, 2005). En nuestra población, sin embargo, no hemos encontrado relación entre el residuo de BPA y el hecho de haber sido amamantado, aunque en ambas matrices biológicas se apreciaron valores más elevados del contaminante entre los niños con lactancia natural. Además, el lugar que ocupa el sujeto de estudio entre sus hermanos fue una de las variables que se mantuvo en el análisis multivariante, con una significación estadística interesante ($p= 0,1$), lo que sugiere que el lugar ordinal del niño entre sus hermanos es un factor de riesgo para mayor exposición, ya que el niño nacido en primer lugar recibe la carga bioacumulada por la madre durante su vida previa al embarazo. Este patrón de exposición ya ha sido referido para otros compuestos con cierta capacidad de bioacumulación.

Estudios recientes han encontrado niveles detectables de BPA en todos los alimentos infantiles estudiados, concretamente preparados líquidos para lactantes (Cao *et al.*, 2008b), con concentraciones en el rango de 2,27 ng/g a 10,2 ng/g. También se han analizado diversos alimentos infantiles envasados en tarros de cristal con tapas de metal, encostrándose BPA en 99 de las 122 muestras analizadas, con un valor máximo de 7.2 ng/g (Cao *et al.*, 2009b). En otro trabajo realizado en Taiwán, donde se analizan muestras de leche infantil de fórmula en polvo, se detectó BPA en 5 de las 6 muestras estudiadas, con valores dentro del rango 45 a 113 ng/g (Kuo *et al.*, 2004). La leche maternizada, y cualquier líquido incluido en la alimentación, puede resultar contaminado por el uso de biberones de policarbonato (Quitmeyer & Roberts 2007), o por la contaminación de los alimentos con BPA migrado de envases alimentarios fabricados con plástico o con papel y cartón reciclado (López-Espinosa *et al.*, 2007; Carwile *et al.*, 2009).

BPA también puede migrar de los envases plásticos y del revestimiento interno de las latas al alimento (Brotons *et al.*, 1995). La migración se ve favorecida a elevadas temperaturas (Le *et al.*, 2008), así como en condiciones ácidas y básicas, lo que puede ocurrir en determinadas etapas del proceso de fabricación. La ubicuidad de los contenedores de plástico hace que la exposición a este compuesto y a sus derivados clorados sea prácticamente universal en los países desarrollados. Cabe destacar, por otra parte, que BPA puede migrar también desde las tuberías de PVC al agua que conducen, en condiciones de pH neutro y temperatura ambiente (Yamamoto *et al.*, 1999). En estas circunstancias, BPA puede reaccionar con el cloro residual, utilizado en el tratamiento del agua de bebida, dando lugar a los derivados clorados de bisfenol-A (Yamamoto *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003). A este respecto, la explicación más plausible a la contaminación por derivados clorados de BPA de las muestras analizadas, podría encontrarse en la utilización de agua - potabilizada con cloro- ya que en condiciones de pH básico y a temperatura ambiente, BPA puede reaccionar espontáneamente con el cloro residual, dando lugar a los derivados clorados de BPA (Yamamoto *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003).

En definitiva, si atendemos a los datos disponibles en la bibliografía científica, la principal fuente de exposición a BPA, tanto en población infantil como adulta, será a través de la dieta (Wilson *et al.*, 2007), aunque otras vías de exposición como el aire, el polvo y el agua -incluyendo el contacto dérmico durante el baño- no deben ser descartadas (NTP, 2008; Vandenberg *et al.*, 2007). Además de la transferencia de contaminantes medioambientales madre-hijo, la contaminación generalizada a BPA en el medioambiente y en la cadena alimentaria, hace que los niños de la población general resulten expuestos de manera inadvertida, tanto a BPA como a sus derivados clorados, especialmente a través de la dieta.

La ingesta, que se presume es la principal vía de exposición a BPA (Kang *et al.*, 2006; Vandenberg *et al.*, 2007), resultaría en una mayor concentración a BPA en las muestras colectadas durante el día, comparada con las muestras colectadas por la tarde o antes del desayuno. Sin embargo, en los niños y en los adolescentes, las concentraciones de BPA (media geométrica) no varía en función del momento de colección de la muestra (Calafat *et al.*, 2008). Estas observaciones podrían reflejar también variabilidad en la exposición como consecuencia de distintos factores además de la dieta, por ejemplo, diferencias en estilo de vida, o uso de productos que contienen BPA. Para confirmar este hecho, Mahalingaiah y colaboradores supusieron que las concentraciones de BPA en muestras de orina procedentes de parejas sería más similar que entre individuos que no compartían casa, dieta y estilos de vida, comprobando una moderadamente buena relación entre los niveles de BPA presentes en ambos miembros de la pareja (Mahalingaiah *et al.*, 2008).

Al analizar la información referente al hábito tabáquico de los padres de los sujetos incluidos en el estudio, se observó que los niños con mayores concentraciones de BPA en suero, fueron aquellos que tenían padres fumadores, respecto a los de progenitores no fumadores ($p= 0,002$). Esta diferencia no se mantuvo en el análisis multivariante posterior. Sin embargo, Lakind & Naiman encontraron, recientemente, una relación inversa y estadísticamente significativa entre los niveles de BPA en orina y el hábito tabáquico ($p= 0,011$), aunque esta asociación no era dosis dependiente, es

decir, no se mantenía cuando el análisis se realizaba en función del número de cigarrillos por día (Lakind & Naiman, 2010).

En este trabajo de tesis doctoral no hemos encontrado fuertes asociaciones entre las concentraciones tisulares (sangre y/o grasa) de BPA y factores como edad, género, o IMC, sin embargo las relaciones halladas nos animan a proseguir estudiando la hipótesis de trabajo planteada, bien aumentando el tamaño de la muestra, o siguiendo a la población de estudio en el tiempo para poder establecer si se manifiestan determinados problemas en salud entre la población más expuesta.

A pesar del interés por conocer las fuentes de exposición a BPA en el niño, lo cierto es que muy pocos estudios han abordado este tema con la profundidad y garantía suficientes. De acuerdo a los resultados descritos en esta tesis doctoral, la exposición de los niños de nuestra serie parece estar asociada a factores específicos de la dieta. Así, el consumo de pescado blanco y de embutidos se ha relacionado con mayores niveles de BPA en las muestras de tejido adiposo de la muestra seleccionada, mientras que aquellos que declararon un mayor uso de agua mineral embotellada presentaron valores menores de estos contaminantes. Ambas observaciones son del mayor interés y permiten especular sobre la forma en que la contaminación del pescado y del agua de bebida, puede haber ocurrido. Hay pocos trabajos que hayan descrito la relación entre hábitos de dieta y concentraciones de BPA, pero recientemente, Lakind & Naiman han identificado, como predictores principales de exposición, el consumo de comida preparada y empaquetada, alimentos enlatados, así como de bebidas enlatadas y/o embotelladas (Lakind & Naiman, 2010).

A este respecto, Wagner & Oelmann (2009) publicaban recientemente que la exposición a xenoestrógenos era mayor entre los consumidores de agua mineral embotellada en botellas de plástico PET que entre aquellos que preferían agua mineral embotellada en contenedores de cristal. Los responsables de la estrogenicidad en las botellas de plástico eran principalmente ftalatos y alquifenoles, y en menor grado BPA. En este sentido,

es conveniente recordar que la exposición a derivados clorados de BPA puede verse favorecida por el consumo de agua del grifo si se dan las condiciones de pH básico, ya que en estas circunstancias, BPA puede reaccionar espontáneamente con el cloro residual, presente en el agua desinfectada con cloro o liberado de las tuberías de PVC (Yamamoto & Yasuhara 1999) dando lugar a los derivados clorados de BPA (Yamamoto *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003). De esta manera, en nuestra serie, la exposición a los derivados clorados de BPA habría ocurrido a través del agua de consumo, cuando esta es de la red pública –especialmente la de Granada, cuyo pH medio de 8.3 la hace más que apropiada para la formación de estas especies moleculares-. Los niños que refieren consumo de agua embotellada estarían, de alguna manera, protegidos.

La agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) permite el uso de BPA como monómero base o como aditivo en la fabricación de contenedores plásticos o materiales diseñados para el contacto con los alimentos, permitiendo un nivel de residuo máximo de 0.05 mg/kg peso/día (Muncke, 2009). De esta manera, BPA se puede encontrar como componente de los plásticos empleados para envolver y preservar comida fresca o envasada, pudiendo contribuir a su contaminación por este compuesto químico. Las diferencias en hábitos dietéticos de los diferentes países son conocidas y caracterizadas, y deberían tenerse en cuenta a la hora de estimar la exposición a BPA y derivados clorados vehiculizada por la dieta (Slimani *et al.*, 2002). La dieta propia del sur de España se caracteriza por el alto contenido de artículos frescos, como verduras, fruta, y/o pescados, además de carnes y embutidos, y una baja ingesta de alimentos y bebidas enlatadas, lo que podría implicar un menor aporte del contaminante vehiculado por alimentos contaminados (Mariscal *et al.*, 2009). No obstante, la asociación entre exposición a BPA y consumo de embutidos, bien merece prestarle atención y establecer un seguimiento riguroso de esta fuente no conocida hasta el momento.

La mayoría de los pocos estudios de exposición infantil a BPA concluyen que la dieta es la fuente principal de contaminación para esta población. Así, el estudio llevado a cabo por Wilson y colaboradores entre 257 preescolares de

edades comprendidas entre 1,5 y 5 años de edad con el objetivo de investigar la exposición de los mismos a contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en la guardería y en la casa, indicó que la dieta de los niños suponía hasta un 99% de la exposición total a BPA (Wilson *et al.* 2007). Los investigadores encontraron este contaminante en todas las muestras analizadas, tanto de aire interior como exterior, tierra y alimentos sólidos y líquidos.

En 2002, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) determinó como Límite Específico de Migración (SML) 3 mg de BPA por Kg de alimento (3ppm), para la protección de los consumidores en la Unión Europea. En 2006, la ingesta diaria tolerable (TDI) para BPA se estableció en 0,05 mg/Kg de peso corporal, tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos, mientras que Canadá estableció una ingesta diaria tolerable provisional (pTDI) inferior, concretamente de 0,025 mg/Kg de peso corporal. Estas regulaciones responden a la frecuencia con la que se han publicado informes que refieren la presencia de BPAs en los alimentos. De hecho, BPA se ha cuantificado en muy diversos productos alimentarios, por ejemplo, en latas de comida de distintos países (Biles *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2001; Goodson *et al.*, 2002; Thomson *et al.*, 2005; Braunrath *et al.*, 2005; Munguia-López *et al.*, 2005; Sajiki *et al.*, 2007; Yonekubo *et al.*, 2008), habiéndose encontrado niveles tan altos como 422 ng/g en jamón cocido (Goodson *et al.*, 2002), 842 ng/g en salsas (Sajiki *et al.*, 2007), 102,7 ng/g en pescado (Munguia-López *et al.*, 2005) o 95,3 ng/g en verduras (Yoshida *et al.*, 2001). Los valores encontrados en latas de refrescos de supermercados canadienses están en el rango de 0,032 a 4,5 µg/L (Cao *et al.*, 2009a).

Con carácter regulador, se ha estimado la dosis diaria de exposición a BPA proveniente de la fuente alimentaria y bebida. De forma notable, la estimación más alta entre la población general, corresponde a niños, obteniéndose valores que van desde 0,043 a 14,7 µg BPA/Kg peso/día (FDA, 1996; European Union, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Miyamoto *et al.*, 2006; EFSA, 2006; Wilson *et al.*, 2007; Chapin *et al.*, 2008). Así mismo, los valores estimados a partir de la última encuesta NHANES (2005/2006) revelan también la mayor exposición para la población de entre 6 y 11 años, situándose en un valor

medio de 51,3 ng/kg-día (Lakind & Naiman, 2010). Desafortunadamente, no existen estimaciones en la encuesta americana para niños de edades inferiores que cubrieran el rango de edades de la población considerada en este trabajo de Tesis Doctoral, por lo que no es posible utilizar esos datos como referencia en este trabajo, pero orientan hacia el hecho de una mayor exposición para niños de menor edad.

Como se ha comentado anteriormente, Calafat y colaboradores también han mostrado que una de las principales fuentes de exposición a BPA podrían ser algunos materiales o dispositivos médicos, lo que explicaría que recién nacidos prematuros ingresados en unidades de cuidados intensivos, tengan concentraciones de BPA hasta un orden de magnitud mayor que cualquier otra población estudiada en los Estados Unidos (Calafat *et al.*, 2009). En este sentido, cabe destacar que las muestras de suero de individuos intervenidos de otras patologías distintas a hernias inguinales e hidrocele, presentaron valores muy superiores de BPA, con una media geométrica de 149,43 ng/ml, frente a los 43,09 ng/ml entre los primeros ($p = 0,06$). Esta observación sugiere que el motivo de la intervención podría estar relacionado con una mayor exposición a este contaminante, y que la patología motivo de ingreso estuviera asociada a procedimientos médicos específicos o estancias hospitalarias mas prolongadas, que habrían aumentado los niveles séricos de BPA en esta población, fenómeno que debería ser estudiado con más detenimiento y en una serie mas amplia de individuos.

Nuestro grupo de investigación fue pionero en la detección de BPA en muestras de saliva colectadas después de tratamientos dentales con productos basados en BPA o BPA metacrilato (Olea *et al.*, 1996; Pulgar *et al.*, 2006; Zafra *et al.*, 2003), trabajos que han confirmado posteriormente otros grupos de investigación. Así por ejemplo, Joskow y colaboradores midieron los niveles de BPA en saliva de sujetos a los que se les pusieron selladores dentales de diferentes marcas comerciales en una única muestra tomada tras el tratamiento. Los investigadores comprobaron que algunas de ellas implicaban aumentos significativos de los niveles de BPA respecto a otras, concretamente 50 veces más de BPA después del tratamiento con Delton (Joskow *et al.* 2006).

En cualquier caso, los niveles descritos por Joskow fueron mucho menores que los encontrados por nuestro grupo de investigación (Olea *et al.*, 1996). En nuestro caso, las muestras de saliva se colectaron durante la hora completa que siguió al tratamiento, indicando que las medidas puntuales de muestras de saliva, procedimiento seguido por varios grupos de investigación, podrían subestimar los niveles reales de exposición a BPA.

Otro trabajo que corrobora la exposición a BPA a través de diferentes procedimientos médicos es el publicado por Murakami y colaboradores (Murakami *et al.*, 2007). El suero de pacientes sometidos a hemodiálisis, así como el material empleado en este proceso, fue analizado para determinar los niveles de BPA. Los resultados mostraban mayores concentraciones de BPA dependiendo de la composición del dializador empleado, así como que los niveles de BPA aumentaban significativamente en suero tras la sesiones de diálisis, y se asociaban significativamente con una función renal mas deteriorada (Murakami *et al.*, 2007).

En este trabajo de tesis doctoral, una de las variables predictivas consideradas ha sido el número de *composites* o selladores de los niños participantes. A pesar del pequeño tamaño muestral que presentaba esta característica, los niveles de BPA encontrados se relacionaban significativamente con la presencia de selladores dentales, en el análisis multivariante, corroborando los resultados descritos por nuestro grupo de investigación en otros grupos de población.

Aunque la bioacumulación de compuestos persistentes organohalogenados en tejido adiposo está bien documentada en nuestras series de población (Cerrillo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2007a; López-Espinosa *et al.*, 2008), son muy pocos los estudios que han descrito la bioacumulación de BPA y sus derivados clorados en esta matriz biológica. En este sentido, Núñez y colaboradores (Núñez *et al.*, 2001) encontraron concentraciones de BPA en todas las muestras de tejido analizadas procedentes de ratas expuestas de manera crónica a BPA (dosis repetidas de BPA), aunque este compuesto se encontró preferentemente en tejido adiposo marrón. En otro estudio, ratas preñadas

fueron expuestas a una dosis única, pero alta, de BPA, y transcurridos tan solo 40 min, este contaminante pudo detectarse tanto en los fetos como en la sangre de la madre con concentraciones comparativamente mayores en los fetos respecto a la de las madres expuestas (Takahashi & Oishi, 2000), sugiriendo que el feto podría actuar como reservorio de este contaminante químico. Otros autores también han demostrado que BPA atraviesa sin problemas la barrera placentaria aunque para ello debe estar desconjugado (Uchida *et al.*, 2002; Ikezuki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008).

BPA no es considerado un compuesto químico persistente, sin embargo los datos obtenidos parecen indicar que la exposición crónica y continuada del mismo ralentizaría su metabolización y eliminación (Teeguarden *et al.*, 2005). El logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua de BPA (K_{ow}) se ha estimado en el rango de 2,2-3,82 (NTP, 2008), lo que indica que este compuesto tiene ciertas características lipofílicas y, potencialmente, podría acumularse en grasa o en tejidos con mayor contenido lipídico (Stahlhut *et al.*, 2009). El grupo de investigación liderado por Shanna Swan se planteaba recientemente el objetivo de comprobar si, efectivamente, la hipótesis mantenida por la mayoría de los investigadores en BPA tenía fundamentos sólidos; esto es, comprobar si BPA es rápidamente excretado una vez alcanza el organismo, y si la vía principal de exposición a BPA del ser humano es el consumo de alimentos contaminados por este compuesto. De forma notable, el tiempo de ayuno mantenido por los sujetos reclutados, se asociaba tan solo mínimamente con los niveles de BPA encontrados en las muestras de orina procedentes de la población general entrevistada en la encuesta NHANES (2003-2004) (Stahlhut *et al.*, 2009). Este hallazgo podría justificarse según los autores por varias razones: i) BPA tendría una vida media mayor de la descrita, favoreciendo su acumulación en compartimentos corporales con un tiempo de eliminación más largo, ii) la exposición a BPA procedente de otras vías, además de la dieta, sería mayor de lo esperado, o iii) ambas causas –vida media y vías no dietaria de exposición- estarían contribuyendo a las mayores concentraciones de BPA encontradas respecto a las esperadas. Los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral avalan los argumentos propuestos por Stahlhut y colaboradores, ya que el BPA acumulado en tejidos grasos actuaría

de reservorio para su liberación lenta y paulatina, pudiendo, teóricamente, producir un daño celular y tisular local y contribuir a la exposición interna de forma permanente.

Estas observaciones, unidas a nuestros propios datos de exposición (Fernández *et al.*, 2007a; Olea *et al.*, 2008) corroboran que una porción del BPA que entra en el organismo pueda distribuirse en compartimentos específicos de almacenamiento del cuerpo humano. El hecho de encontrar tanto BPA como derivados clorados en el tejido adiposo y en el suero de población infantil, tiene una relevancia especial. Estudios en animales de experimentación han puesto de manifiesto que BPA afecta tanto al metabolismo de la glucosa como al metabolismo lipídico, así como a la adipogénesis de los adipocitos (Alonso-Magdalena *et al.* 2006). Las concentraciones medias de BPA descritas en población adulta por Fernández y colaboradores (8,1 ng/ g de grasa para BPA y derivados clorados) son mucho mayores que las necesarias para reducir la producción de adiponectina en explantes de tejido adiposo humano o en células de grasa en cultivo (Hugo *et al.*, 2008). Además, BPA a dosis medioambientalmente relevantes inhibe la liberación de adiponectinas importantes implicadas en la protección de las secuelas derivadas del síndrome metabólico, ya que bajos niveles de adiponectinas se han asociado de manera consistente con resistencia a la insulina y con procesos antiinflamatorios, ambos mecanismos con consecuencias notables sobre la salud humana (Hugo *et al.*, 2008). Estos hechos ratifican los resultados encontrados por Lang y colaboradores, que mostraban que altas concentraciones de BPA están asociadas con una mayor prevalencia de diabetes, enfermedades cardiovasculares y toxicidad hepática en población adulta (Lang *et al.* 2008). Los nuevos datos de la encuesta NHANES 2005/2006 han proporcionado la oportunidad de replicar de manera independiente los resultados de Lang y colaboradores. Así, las mismas asociaciones han sido observadas por Melzer y colaboradores, analizando los datos de exposición a BPA de la muestra transversal NHANES 2005/2006 y los datos conjuntos NHANES 2003/2004 y 2005/2006, encontrando las mismas relaciones, excepto en el caso de diabetes en la muestra 2005/2006, que no alcanzó la significación estadística (Melzer *et al.*, 2010).

El momento del ciclo vital en que ocurre la exposición a contaminantes medioambientales que se comportan como hormonas- disruptores endocrinos- es crucial para determinar el efecto posterior. Los estudios experimentales realizados con animales adultos requieren de dosis bastante más altas para inducir una respuesta que las dosis necesarias para producir un efecto si se trata de embriones o animales en las primeras fases de desarrollo (Vandenberg *et al.*, 2009). La exposición intrauterina a xenoestrógenos se ha relacionado con anomalías en diferentes órganos diana observadas bastante tiempo después de producirse la exposición e, incluso, con efectos de organización permanente en tejidos u órganos implicados en la maduración sexual y función reproductiva en el individuo adulto (vom Saal & Moyer, 1985; Markey *et al.*, 2005; Muñoz del Toro *et al.*, 2005).

En definitiva, este trabajo de Tesis Doctoral describe la presencia de BPA y derivados clorados en dos matrices biológicas -suero y tejido adiposo- de una población infantil que acude a un centro hospitalario, con una edad media de 4 años de edad y un rango de edades comprendidas entre tan solo pocos meses y 11,08 años. La acumulación de estos contaminantes ambientales, caracterizados por su actividad estrogénica, antiandrogénica, así como disruptora de la función tiroidea y β pancreática, a concentraciones en el orden de las asociadas a efectos en salud evidentes en animales expuestos, demanda una revisión urgente de las medidas legislativas en vigor, especialmente en poblaciones de susceptibilidad particular, como es la infancia. Nuestros datos, además, podrán servir como referencia para identificar tendencias temporales en la exposición infantil a estos contaminantes, confirmando si, al igual que en la población americana, se esta produciendo una disminución de los niveles ambientales de BPA (Melzer *et al.*, 2010) como consecuencia de ciertas medidas preventivas de la exposición.

Estudios epidemiológicos y de biomonitorización poblacional deberían ser instaurados de manera rutinaria para poder analizar el riesgo para la salud asociado con la exposición a BPA, especialmente durante periodos críticos del desarrollo, lo que ayudaría a las distintas partes interesadas -políticos,

profesionales sanitarios, consumidores- a la toma de decisiones en medidas reguladoras, en cuanto a la calidad y los riesgos, de esta exposición infantil (Myers *et al.*, 2009).

VI. CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

La discusión de los resultados, a la luz de la evidencia científica disponible referente a la exposición infantil a bisfenol-A y sus derivados clorados, nos permite enunciar las siguientes conclusiones:

1.

Los niños estudiados están y han estado expuestos, durante periodos críticos de su desarrollo, a mezclas complejas de compuestos contaminantes, potencialmente adversos para el desarrollo reproductivo y neuro-conductual. La exposición a BPA y sus derivados clorados afecta a la totalidad de los individuos investigados, los cuales presentan uno o más de un residuo en sangre y/o tejido adiposo. El residuo de BPA fue más frecuentemente detectado en las muestras de tejido adiposo infantil que en el mismo tejido de población adulta de la misma procedencia geográfica (61 vs 55%). Además, su concentración media fue cuatro veces en los niños que en las mujeres adultas. Por su parte, los derivados clorados de BPA aparecen en el 100% de las muestras infantiles analizadas, frente al 80% de las muestras de la población adulta, y su concentración media también fue mayor.

2.

No se han encontrado fuertes asociaciones estadísticas entre las concentraciones tisulares -sangre y/o grasa- de BPA y posibles factores predictores como edad, género o IMC. Sin embargo, se ha

puesto de manifiesto que: i) los sujetos de menor edad presentan mayores concentraciones de BPA, tanto en muestras de tejido adiposo como de suero; ii) las niñas tienen mayores concentraciones de BPA, destacando la diferencia advertida en la matriz sérica, con una media geométrica de 92,06 ng/ml en suero, frente a los 51,18 ng/ml de la población masculina; y iii) que en ambas matrices biológicas se produce una disminución de los niveles de BPA con el incremento de IMC de los sujetos.

3.

Los residuos de BPA y sus derivados clorados presentan patrones de distribución distintos en las dos matrices biológicas estudiadas, lo que, a su vez, determina que los factores predictivos en ambas matrices sean diferentes. Así, el lugar ordinal que ocupa el sujeto de estudio entre sus hermanos, es predictor de los niveles de BPA en las muestras de tejido adiposo, lo que sugiere la transferencia madre-hijo para un compuesto que es potencialmente bioacumulable. Además, los niveles de BPA se asocian, de forma estadísticamente significativa, con el tratamiento odontológico con selladores dentales, corroborando resultados previos de nuestro grupo de investigación que consideran la resinas epoxi usadas en la práctica odontológica, una fuente de exposición sanitaria al BPA.

4.

La vía alimentaria se confirma como una de las principales formas de exposición a BPA en la población infantil. De acuerdo a los resultados obtenidos, la exposición se asocia con ciertos factores de la dieta, entre los que destacan el consumo de pescado blanco y de embutidos. Por otra parte, el consumo de agua embotellada se presenta como un factor protector de la exposición cuando se compara con el consumo de agua de la red de abastecimiento, lo que sugiere un papel

importante a la cloración del agua como origen de las especies halogenadas del BPA.

5.

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de BPA en tejido adiposo y la procedencia anatómica de la muestra grasa, sugiriendo que la distribución de BPA no es dependiente de ningún tejido graso en particular. Además, las muestras de suero de niños intervenidos de otras patologías distintas a hernias inguinales e hidrocele, presentaron valores superiores de BPA, estadísticamente distintos (media 149,43 ng/ml vs 43,09 ng/ml). Esta observación sugiere, que el motivo de la intervención está relacionado con una mayor exposición a este contaminante, o bien que los procedimientos médicos particulares y la estancia hospitalaria más prolongada condicionan una mayor exposición en el medio sanitario. Este fenómeno debería ser estudiado con más detenimiento, en una serie más amplia de individuos, con objeto de actuar preventivamente, evitando una exposición cuya responsabilidad recae sobre el propio sanitario.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

Aguayo S, Muñoz MJ, de la Torre A, Roset J, de la Peña E, Carballo M. **2004**. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci Total Environ* 328(1-3):69-81.

Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebaek NE, Leffers H. **2002**. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environ Health Perspect* 110(8):743-748.

Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripol C, Soria B. **2005**. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect* 113:969-977.

Analytical Methods Committee. **1994**. Is my calibration linear? *Analys* 119:2363-2366.

Arakawa C, Fujimaki K, Yoshinaga J, Imai H, Serizawa S, Shirahishi H. **2004**. Daily urinary excretion of bisphenol A. *Environ Health Prevent Med* 9:22-26.

Arenhold-Bindselv D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. **1999**. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Invest* 3:120-125.

Ariazi EA, Jordan VC. **2006**. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. *Curr Topo Med Chem* 6:203-215.

Ballesteros O, Zafra A, Navalón A, Vílchez JL. **2006**. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *J Chromatogr A* 1121(2):154-62.

Barker DJ. **1990**. The long-term outcome of retarded fetal growth. *Schweiz Med Wochenschr* 129:189-196.

Becker K, Göen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fub H, Müller J, Wittassek M, Schulz C, Kolossa-Gehring M. **2009**. GerEs IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 212(6):685-692.

Belfroid A, van Velzen M, van der Horst B, Vethaak O. **2002**. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* 49:97-103.

Benachour N, Aris A. **2009**. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 241(3):322-328

Biles JE, McNeal TP, Begley TH. **1997**. Determination of Bisphenol A migrating from epoxy can coatings to infant formula liquid concentrates. *J Agric Food Chem* 45:4697-4700.

Blake MJ, Castro L, Leeder JS, Kearns GL. 2005. **1999**. Ontogeny of drug metabolizing enzymes in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med* 10:123-138.

Botella B, Crespo J, Rivas A, Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Olea N. **2004**. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 96(1):34-40.

Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, Lanphear BP. **2009**. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect* 117(12):1945-1952.

Braunrath R, Podlipna D, Padlesak S, Cichna-Markl M. **2005**. Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 53:8911-8917.

Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H. **2003**. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling, and brushing. *Food Addit Contam* 20:684-689.

Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Olea N. **1995**. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 103:608-612.

Bruckner JV. **2000**. Differences in sensitivity of children and adults to Chemical toxicity: The NAS Panel Report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31(3):280-285.

Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham JL. **2005**. Urinary concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113:391-395.

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. **2008**. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 116(1):39-44.

Calafat MA, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, Huttner K, Hauser S. **2009**. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 117:639-644.

Cao LX, Corriveau J. **2008**. Migration of Bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *J Agric Food Chem* 56:6378-6381.

Cao XL, Dufrense G, Belisle S, Clement G, Falicki M, Beraldin F, Rulibikiye A. **2008**. Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *J Agric Food Chem* 56:7919-7924.

Cao XL, Corriveau J, Popovic S. **2009a**. Levels of bisphenol A in canned soft drink products in Canadian markets. *J Agric Food Chem* 57:1307-1311.

Cao XI, Corriveau J, Popovic S, Clement G, Beraldin F, Dufrense G. **2009b**. Bisphenol A in baby food products in glass jars with metal lids from Canadian markets. *J Agric Food Chem* 57(12):5345-5351.

Carrascosa A, Yeste Y, Copil A, Gussinyé M. **2004**. Aceleración secular del crecimiento. Valores de peso, talla e índice de masa corporal en niños, adolescentes y adultos jóvenes de la población de Barcelona. *Med Clin* 123(12):445-451.

Carson R. **1962**. Silent Spring. New York: Houghton Mifflin Company.

Carreño J, Rivas A, Granada A, Jose Lopez-Espinosa M, Mariscal M, Olea N, Olea-Serrano F. **2007**. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 103(1):55-61.

Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, Ye X, Calafat AM, Michels KB. **2009**. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect* 117(9):1368-1372.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **2001**. National Center for Environmental Health. National Report on Human exposure to Environmental Chemicals. NCEH Pub. No 01-0379. Atlanta, USA.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **2005**. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, USA. Disponible en: <http://www.cdc.gov/exposurereport/>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **2007a**. Chemicals measured in selected participants for NHANES 2003-2004. Disponible en:

<http://oehha.ca.gov/multimedia/biomon/pdf/CDCChemicalsListHandout.pdf>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **2007b**. NHANES 2003-2004 – Lab 24 Environmental Phenols. Disponible en:

http://www.cdc.gov/NCHS/data/nhanes/nhanes_03_04/l24eph_c_met_phenols.pdf

Cerrillo I, Granada A, López-Espinosa MJ, Olmos B, Jiménez M, Caño A, Olea N, Fátima Olea-Serrano M. **2005**. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood and human milk. *Environ Res* 98(2):233-239.

Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Ibarluzea J, Exposito J, Torne P, Laguna J, Pedraza V, Olea N. **2006**. Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 62(11):1917-1924.

Céspedes R, Lacorte S, Raldúa D, Ginebreda A, Barceló D, Piña B. **2005**. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, Spain). *Chemosphere* 61(11):1710-1719.

Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray LE, Hayward SW, Lees PS, McIntyre BS, Portier KM, Schnorr TM, Selevan SG, Vandenberg JG, Woskie SR. **2008**. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol. *A. Birth Defects Res. B Dev Reprod Toxicol* 83:157-395.

Chemical study on Bisphenol A. Report RIKZ/2001.027 Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat. Ministerie van Verkeer en Waterstaat. Den Haag, The Netherlands 2001. Tsai WT. **2006**. Human health risk on environmental exposure to bisphenol A: A review. *J Environ Sci Health, Part C* 24:225–255.

Cobellis L, Colacurci N, Trabucco E, Carpentiero C, Grumetto L. **2009**. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical Chromatography* 23(11):1186–1190.

Cohen HE, Moya J, Selevan S. **2008**. A lifestage approach to assessing children's exposure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 83:522-529.

Colborn T, Clement C. **1992**. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human connection. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. **1993**. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378-384.

Colerangle JB, Roy D. **1997**. Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *J Steroid Biochem Molec Bici* 60:153-160.

COM706. Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. **1999**.

Community Research & Development Information System. Food Quality and Safety. Disponible en: <http://cordis.europa.eu/food/home.html>

Coors A, Jones PD, Giesy JP, Ratte HT. **2003**. Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. *Environ Sci Technol* 37:3430-3434.

de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN. **1999**. Glucuronidation in humans-pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharm* 36:439-452.

del Río Paredes S. **2005**. Contaminación química en la infancia: bioacumulación y efectos potenciales. *Rev Esp Salud Publica* 79(2):221-228.

Dodds EC, Lawson W. **1936**. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.

Dolk H, Vrijheid M. **2003**. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *British Medical Bull* 68:25-45.

Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Muñoz del Toro M. **2007**. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 115:80-86.

EFSA. European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A). **2006**. Disponible en:

http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620772817.htm.

Elsby R, Maggs JL, Ashby J, Park BK. **2001**. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of Bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther* 297:103-113.

Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS. **2006**. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 21(1):110-112.

Environmental Protection Agency (USA). **2005**. Cross-species mode of action information assessment: a case study of bisphenol A. Govt Reports

Announcements & Index, Issue 26, National Center for Environmental Assessment.

European Commission. Risk assessment report of 4,4'-isopropylidenediphenol (BISPHENOL-A). Italy: Ispra; **2003**.

European Commission's Scientific Committee on Food on Bisphenol A ref. SCF/CS/PM/3936 Final – 3 May **2002** –. Disponible en:

<http://www.bisphenol-a.org/whatsNew/20020715EuropeanCommission.html>

European Union. European Environment and Health Strategy. Disponible en:

<http://ec.europa.eu/environment/health/strategy.htm>

European Union. Risk Assessment Report-4, 4'-isopropylidenediphenol (BisphenolA). **2003**. Disponible en:

http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/ExistingChemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/bispnenolareport325.pdf

European Union. Updated European Risk Assessment Report 4, 4'-Isopropylidenediphenol (bisphenol A). Environment Addendum of February **2008** (to be read in conjunction with published EU RAR of Bisphenol A, 2003)

Disponible en: http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/bisphenolareport325.pdf

Evaluation of alternatives for compounds under risk assessment in the EU, Bisphenol A. Environmental project no. 901/2004. Miljøprojekt. Danish Environmental Protection Agency. Copenhagen: Danish Ministry of the Environment. **2004**.

FDA. Food and Drug Administration. Cumulative Exposure Estimated for bisphenol A, Individually for Adults and Infants from Its Use in Epoxy-Based Can Coatings and Polycarbonate (PC) Articles, verbal request of 10-23-95, memorandum to G. Diachenki, Ph.D, Division of Product Manufacture and Use, HGS-245, from Allan B. Bailey, Ph.D., Chemistry Review Branch, HFS-245.

Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. **1996.**

Fernández MF, Pedraza V, Olea N. **1998.** Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection? *Cancer J* 11:11-17.

Fernández MF, Rivas A, Olea-Serrano F, Cerrillo I, Molina-Molina JM, Araque P, et al. **2004.** Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal Bioanal Chem* 379(1):163-170.

Fernández MF, Arrebola JP, Taoufik J, Navalón A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JI, Olea N. **2007a.** Bisphenol A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24:259-264.

Fernandez MF, Santa-Marina L, Ibarluzea JM, Exposito J, Aurrekoetxea JJ, Torne P, Laguna J, Rueda AI, Pedraza V, Olea N. **2007b.** Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: a biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *Eur J Cancer* 43(8):1290-1299.

Fernandez MF, Aguilar-Garduño C, Molina-Molina JM, Arrebola JP, Olea N. **2008.** The total effective xenoestrogen burden, a biomarker of exposure to xenoestrogen mixtures, is predicted by the (anti)estrogenicity of its components. *Reprod Toxicol* 26(1):8-12.

Fujimaki K, Arakawa C, Yoshinaga J, Watanabe C, Serizawa S, Imai H, Shiraishi H, Mizumoto Y. **2004.** Estimation of intake level of bisphenol A in Japanese pregnant women based on measurement of urinary excretion level of the metabolite. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 59(4):403-408.

Fukata H, Miyagawa H, Yamazaki N, Mori C. **2006.** Comparison of Elisa and LC-MS-based methodologies for the exposure assessment of bisphenol A. *Toxicol Mech Method* 16:427-430.

Fung EYK, Ewoldsen NO, St.Germain JrHA, Marx DB, Miaw C-L, Siew C, Chou HN, Cruninger SE, Meyer MT. **2000**. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc* 131:51-58.

García-Rodríguez J, García-Martín M, Nogueras-Ocaña M, de Dios Luna-del-Castillo J, Espigares García M, Olea N et al. **1996**. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a posible association. *Environ Health Perspect* 104:1090-1095.

Goldman, L.R. **2002**. Preventing pollution? U.S. toxic chemicals and pesticides policies and sustainable development. Informe Environmental Law Report News & Analysis; 32. Washington, DC (EE. UU.): Instituto de Ley Medioambiental.

Goodson A, Summerfield W, Cooper I. **2002**. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit Contam* 19:796-802.

Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, McDonnell DP, Gaido KW. **1998**. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 142:203-214.

Hanaoka T, Nawamura N, Hara K, Tsugane S. **2002**. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* 59:625-628.

Hansen LG. **1998**. Stepping backward to improve assessment of PCB congener toxicity. *Environ Health Perspect* 106(Suppl 1):171-189.

He Y, Miao M, Herrinton LJ, Wu C, Yuan W, Zhou Z, Li DK. **2009**. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res* 109(5):629-633.

Health Canada. **2008**. Government of Canada Takes Action on Another Chemical of Concern: Bisphenol A [Press Release]. Disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/2008/2008_59-eng.php

Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, Momoeda M, Ikezuki Y, Okamura A, Yokota H, Taketani Y. **2004**. Differences in serum bisphenol A concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. *Endocrine Journal* 51:595-600.

Hong YC, Park EY, Park MS, Ko JA, Oh SY, Kim H, Lee KH, Leem JH, Ha EH. **2009**. Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicol Lett* 184(2):139-144.

Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. **1999**. Environmental toxins: exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401:763-764.

Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. **2008**. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 116:1642-1647.

Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ. **2003**. Bisphenol A exposure cause meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology* 13:546-553.

Ibarluzea JJ, Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ et al. **2004**. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control* 15:591-600.

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. **2002**. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17:2839-2841.

Inoue H, Yuki G, Yokota H, Kato S. **2003**. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metabolism and Disposition* 31:140-144.

Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. **2000**. Determination of Bisphenol-A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 749:17-23.

Inoue K, Wada M, Higuchi T, Oshio S, Umeda T, Yoshimura Y, Nakazawa H. **2002**. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human serum. *Journal of Chromatography B* 773:97-102.

Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. **2006**. Exposure to Bisphenol A from bis-glycidylmethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc* 137:353-362.

Kaneko M, Okada R, Yamamoto K, Nakamura M, Mosconi G, Polzonetti-Magni AM, Kikuyama s. 2008. Bisphenol A acts differently from and independently of thyroid hormone in suppressing thyrotropin release from the bullfrog pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 155(3):574-580.

Kang J-H, Kondo F. **2002**. Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Research in Veterinary Science* 73:177-182.

Kang J-H, Kito K, Kondo F. **2003**. Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *Journal of Food Protection* 66:1444-1447.

Kang J-H, Kondo F, Katayama Y. **2006**. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226:79-89.

Katayama M, Matsuda Y, Shimokawa K-I, Ishikawa H, Kaneko S. **2003**. Preliminary monitoring of bisphenol A and nonylphenol in human serum by

sensitive high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis after proteinase K digestion. *Analytical Letters* 36:2659-2667.

Kawagoshi Y, Fujita Y, Kishi I, Fukunaga I. **2003**. Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *J Environ Monit* 5:269-274.

Kawaguchi M, Inoue K, Yoshimura M, Ito R, Sakui N, Okanouchi N, Nakazawa H. **2004**. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 805(1):41-8.

Kim Y-H, Kim C-S, Park S, Han SY, Pyo M-Y, Yang M. **2003**. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun* 312:441-448.

Kitamura S, Kato T, Iida M, Jinno N, Suzuki T, Ohta S, Fujimoto N, Hanada H, Kashiwagi K, Kashiwagi A. **2005**. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* 76(14):1589-1601.

Kodaira T, Kato I, Li J, Mochizuki T, Hoshimo M, Usuki Y, Oguri H, Yanaihara N. **2000**. Novel ELISA for the measurement of immunoreactive bisphenol A. *Biomed. Res* 21:117-121.

Kogevinas M, Andersen AM, Olsen J. **2004**. Collaboration is needed to coordinate European birth cohort studies. *Int J Epidemiol* 33:1172-1173.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. **2002**. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202-1211.

Krishnan AV, Starhis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. **1993**. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.

Kubo K, Arai O, Omura M, Wantanabe R, Ogata R, Aou S. **2003**. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neuroscience Res* 45:345-356.

Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ. **2009**. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottles liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam* 26(6):928-937.

Kuch HM, Ballschmiter K. **2001**. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* 35:3201-3206.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J-A. **1998**. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.

Kuo H-W, Ding W-H. **2004**. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1027:67-74.

Kurahashi N, Kasai S, Shibata T, Kakizaki H, Nonomura K, Sata F, Kishi R. **2005**. Parental and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Med Sci Monit* 11:274-83.

Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y. **2003**. Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 73:17-25.

Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. **2003**. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J Pharm Biomed Anal* 30(6):1743-1749.

Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. **2007**. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66:1160-1164.

Lakind JS & Naiman DQ. **2010**. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 1-8.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. **2008**. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300(11):1303-1310.

Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. **2008**. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic action of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett* 176:149-156.

Lee YJ, Riu hY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, Nam BH, et al. **2008**. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 25(4):413-419.

Liu ZS, Wolff MS, Moline J. **2005**. Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 819:155-159.

Long G, Winefordner J. **1983**. Limit of detection. A closer look to the IPAC definition. *Anal Chem* 55:712-724.

Lopez-Cervantes J, Paseiro-Losada P. **2003**. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam* 20:596-606.

Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, Salvatierra M, Olea-Serrano F, Olea N. **2007**. Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta* 28(7):631-8.

Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, Molin-Molina JM, Puertollano MC, Rivas A, Fernandez M, Cerrillo I, Olea Serrano F, Lopez C, Olea N. **2007**. Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit Contam* 24:95-102.

Lopez-Espinosa MJ, Lopez-Navarrete E, Rivas A, Fernandez MF, Nogueras M, Campoy C, Olea-Serrano F, Lardelli P, Olea N. **2008**. Organochlorine pesticide exposure in children living in southern Spain. *Environ Res* 106(1):1-6.

Lopez-Espinosa MJ, Kiviranta H, Araque P, Ruokojärvi P, Molina-Molina JM, Fernandez MF, Vartiainen T, Olea N. **2008b**. Dioxins in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere* 73(6):967-971.

Lopez-Espinosa MJ, Arrebola JP, Navea N, Taufiki J, Fernandez MF, Ballesteros O, Prada R, Olea N. **2009**. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere* 76(6):847-852.

Mahalingaiah S, Meeker JD, Pearson KR, Calafat AM, Ye X, Petrozza J, Hauser R. **2008**. Temporal variability and predictors of urinary Bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspect* 116(2): 173-178.

Maragou NC, Makri A, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA. **2007**. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Foods Additives and Contaminants* 25(3): 373-383.

Mariscal-Arcas M, Rivas A, Granada A, Monteagudo C, Murcia MA, Olea-Serrano F. **2009**. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol* 47:506-510.

Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM. **2001**. The mouse uterotrophic assay: a re-evaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 109:55-60.

Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, Morita M, Kawamoto T. **2003**. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 111:101-104.

Matsumoto H, Adachi S, Suzuki Y. **2005**. Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. *Arch Environ Con Tox* 48:459-466.

McDougall D, Amore F, Cox G, Crosby D. **1980**. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem* 52:2242-2249.

McLachlan JA. **1993**. Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspect* 101:386-387.

Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. **2010**. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol* 44(4):1458-1463.

Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. **2010**. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS ONE* 5(1): e8673.

Miller WR, Sharpe RM. **1998**. Environmental estrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related Cancer* 5:69-96.

Miyamoto K, Kotake M. **2006**. Estimation of daily bisphenol A intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. *Environ Sci* 13:15-29

Muncke J. **2009**. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Sci Total Environ* 407(16):4549-4559.

Munguía-López EM, Gerardo-Lugo S, Peralta E, Bolumen S, Soto-Valdez H. **2005**. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into fatty-food simulant and tuna fish. *Food Addit Contam* 22:892-898.

Muñoz de Toro MM, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. **2005**. Perinatal exposure to Bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146:4138-4147.

Murakami K, Ohashi A, Hori H, Hibiya M, Shoji Y, Kunisaki M, et al. **2007**. Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Blood Purif* 25:290–294.

Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM. **2007**. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23:383-390.

Myers JP, vom Saal FS, Akingbemi BT, Arizono K, Belcher S, Colborn T, Chahoud I, Crain DA, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hassold T, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Laufer H, Marcus M, McLachlan JA, Nadal A, Oehlmann J, Olea N, Palanza P, Parmigiani S, Rubin BS, Schoenfelder G, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Taylor JA, Vandenberg LN, Vandenberg JG, Vogel S, Watson CS, Welshons WV, Zoeller RT. **2009**. Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 117(3):309-315.

Mykkänen H, Tikka J, Pitkänen T, Hänninen O. **1997**. Fecal bacterial enzyme activities in infants increase with age and adoption of adult-type diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 25(3):312-6.

Nerín C, Fernandez C, Domeno C, Salafranca J. **2003**. Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by highperformance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 51:5647-5653.

New Cartagena LEXAN resin plant represents GE's largest investment in Spain. *Polym News* **2005**;30:158.

Nishi K, Takai M, Morimune K, Ohkawa H. **2003**. Molecular and immunochemical characteristics of monoclonal and recombinant antibodies specific to bisphenol A. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1358-1367.

Noda M, Komatsu H, Sano H. **1999**. HPLC analysis of dental resin composites components. *J Biomed Mat Res* 47:374-378.

NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A, NIH Publication No. 08-5994; National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services: Research Triangle Park, NC, **2008**.

Disponibile en: <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/bisphenol/bisphenol.pdf>

Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. **2001**. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42(8):917-922.

Ohi G. **1999**. Endocrine disrupting chemicals and carcinogenicity. *Gan To Kagaku Ryoho* 26:263-268.

Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima S, Shimohigashi Y. **2008**. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor γ . *Environ Health Perspect* 116:32-38.

Ohkuma H, Abe K, Ito M, Kokado A, Kambegawa A, Maeda M. **2002**. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol A in serum. *Analyst* 127:93-97

Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. **1996**. Estrogenicity of resin based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104(3):298-305.

Olea N, Pazos P, Expósito J. **1998**. Inadvertent exposure to xenoestrogens. *European J Cancer Prevention* 7 Suppl:S17-S23.

Olea N. **2000**. Bisphenol A and Dental Sealants: Olea's Response. *Environ Health Perspect* 108(12):A546.

Olea N, Fernández MF, Araque P, Olea-Serrano F. **2002**. Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit* 16:250-256.

Olea N, Arrebola JP, Taoufiki J, Fernández-Valades R, Prada R, Navea N, Molina-Molina JM, Fernández MF. Alkylphenols and bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue of children. Título libro: Environmental Toxicology II. Sección 4: Bioaccumulation of Chemicals. Editores: A.G. Kungolos, C.A. Brebbia, M. Zamorano. Editorial: WIT Press, **2008**.

del Olmo M, Zafra A, Suárez B, Gonzalez-Casado A, Taoufiki J, Vílchez JL. **2005**. Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 817(2):167-172.

Ouichi K, Watanabe S. **2002**. Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 780:365-370.

Ozaki A, Yamaguchi A, Fujita T, Kuroda K, Endo G. **2004**. Chemical análisis and genotoxicological safety assesement of paper and paperboard used for food packaging. *Food Chem Toxicol* 42:1323-1337.

Pacifici GM, Kubrich M, Giuliani L, de Vries M, Rane A. **1993**. Sulphation and glucuronidation of ritodrine in human foetal and adult tissues. *Eur J Clin Pharmacol* 44(3):259-264.

Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Jonson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kankan K. **2008**. Maternal bisphenol A levels at delivery: a looming problem?. *J Perinatol* 28:258-263.

Pazos P, Olea-Serrano MF, Zuluaga A, Olea N. **1998** .Endocrine disrupting chemicals: xenoestrogens. *Med Biol Environ Int J* 26:41-47.

Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN. **1998**. Differential activation by xenoestrogens of ER α and ER β when linked to different response elements. *J Endocrinol* 158:R11-R14.

Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V, Olea N. **1998**. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 106(3):167-174.

Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, Sunyer J, Ribas-Fitó N y el Grupo de Trabajo sobre Compuestos Tóxicos Persistentes y Salud del IMIM. **2002**. Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población española: el rompecabezas sin piezas y la protección de la salud pública. *Gac Sanit* 16(3):257-266.

Porta M, Ballester F, Ribas-Fitó N, Puigdomènech E, Selva J, Llop S. **2006**. Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población general española. Criterios para un diagnóstico de la situación actual. *Gac Sanit* 20:233-238.

Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fitó N, Domínguez-Boada L, Martín-Olmedo P, Olea N, Llop S, Fernández MF. **2008**. Studies conducted in Spain on concentrations in humans of persistent toxic compounds. *Gac Sanit* 22(3):248-266.

Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter Jr JM. **2000**. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 54:3-18.

Pritchett JJ, Kuester RK, Sipes IG. **2002**. Metabolism of Bisphenol A in primary cultured hepatocytes from mice, rats and humans. *Drug Metabolism and Disposition* 30:1180-1185.

Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. **2000**. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* 108(1):21–27.

Quitmeyer A, Roberts R. **2007**. Babies, bottles, and bisphenol A: the story of a scientist-mother. *PLoS Biol* 5(7):e200.

Ramón R, Ballester F, Rebagliato M, Ribas N, Torrent M, Fernández M, Sala M, Tardón A, Marco A, Posada M, Grimalt J, Sunyer J. **2005**. La Red de Investigación “Infancia y Medio Ambiente” (Red INMA): Protocolo de estudio. *Rev Esp Salud Pública* 79(2):203-220.

Reynolds CR, Kamphaus RW. **2002**. The clinician's guide to the Behavior Assessment System for Children, Guilford, New York.

Ribas-Fitó N, Ramón R, Ballester F, Grimalt J, Marco A, Olea N, Posada M, Rebagliato M, Tardón A, Torrent M, Sunyer J and on behalf of the INMA Study Group. **2006**. Child health and the environment: the INMA Spanish Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 20: 403–410.

Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. **2007**. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24:199-224.

Rivas A, Lacroix M, Olea-Serrano F, Laíos I, Leclercq G, Olea N. **2002**. Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82(1):45-53.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. **2001**. Perinatal exposure to low doses of bisphenol-A affects body weight, patterns of estrous cyclicity and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109:675-80.

Rubin BS, Lenkowsky JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Romsheim PM, Soto AM. **2006**. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147:3681-3691.

Rudel RA, Brody JG, Spengler JD, Vallarino J, Geno PW, Sun G, Yau A. **2001**. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogenesis in commercial and residential air and dust samples. *Journal of the Air and Waste Management Association* 51:499-513

Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Kom LR, Brody JG. **2003**. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* 37:4543-4555.

SACO 100EN. **1998**. Endocrine disrupting chemicals: A challenge for the EU?. European Parliament, Public Health and Consumer Protection Series, Strasbourg.

Safe S, Pallaroni L, Yoon K, Gaido K, Ross S, McDonnell D. **2002**. Problems for risk assessment of endocrine-active estrogens compounds. *Environ Health Perspect* 110(suppl 6):925-929.

Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo J. **1999**. Sensitive method for the determination of Bisphenol-A in serum using two system of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 736:255-261.

Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, Mori C, Yonekuno J, Hayakawa K. **2007**. Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food Addit Contam* 24:103-112.

Sasaki N, Okuda K, Kato T, Kakishima H, Okuma H, Abe K, Tachino H, Tuchida K, Kubono K. **2005**. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16:297-300.

Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. **2002**. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 110:A703-A707.

Sharpe RM, Skakkebaek NE. **1993**. Are oestrogens involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395.

Shimizu M, Ohta K, Matsumoto Y, Fukuoka M, Ohno Y, Ozawa S. **2002**. Sulfation of bisphenol A abolished in estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicol In Vitro* 16:549-556.

Skakkebaek NE, Meyts ER, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen A, Jensen TK, Andersson A, Muller J. **1998**. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* 106:3-12.

Slimani N, Kaaks R, Ferrari P, Casagrande C, Clavel-Chapelon F, Lotze G, Kroke A, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Lauria C, Bellegotti M, Ocké MC, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Agudo A, Larrañaga N, Mattisson I, Andren C, Johansson I, Davey G, Welch AA, Overvad K, Tjønneland A, Van Staveren WA, Saracci R, Riboli E. **2002**. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study: rationale, design and population characteristics. *Public Health Nutr* 5(6B):1125-1145.

Sonnenschein C, Olea N, Pasanen ME, Soto AM. **1989**. Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Res* 49(13):3474-3481.

Sonnenschein C, Soto AM, Fernández MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-López MD. **1995**. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem* 41(12 Pt 2):1888-1895.

Soto AM, Lin T, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. **1992**. An "In Culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN). Princetown, NJ: Princetown Scientific.

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernández MF, Olea N, Olea-Serrano MF. **1995**. The E-SCREEN assay as tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103:113-122.

Soto AM, Fernández MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C. **1997**. Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 3):647-654.

Stahlhut RW, Welshons W, Shanna SH. **2009**. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial non-food exposure, or both. *Environ Health Perspect* 117(5):784-786.

Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. **1997**. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology* 138:1780-1786.

Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. **1998**. The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 139:2741-2747.

Stokstad E. **2004**. Pollution gets personal. *Science* 304:1892-1894.

Strassburg CP, Strassburg A, Kneip S, Barut A, Tukey RH, Rodeck B, Manns MP. **2002**. Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut* 50:259-265.

Sugiura-Ogassawara M, Ozaki Y, Sonta S-I, Makino T, Suzumori K. **2005**. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 20:2325-2329.

Sun Y, Wada M, Al-Dirbashi O, Kuroda N, Nakazawa H, Nakashima K. **2000**. High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chlorine as a label. *Journal of Chromatography B* 749:49-56.

Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. **2004**. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 18:501-507.

Swan SH. **2000**. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. *APMIS* 108:793-804.

Takada H, Isobe T, Nakada N, Nishiyama H, Iguchi T, Irie H, Mori C. **1999**. Bisphenol A and nonylphenols in human umbilical cords. Proceedings of the

International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Monte Verita, Ascona (Suiza), 7-12 marzo de 1999.

Takahashi O, Oishi S. **2000**. Disposition of orally administered 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A) in pregnant rats and placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect* 108:931-935.

Takao Y, Lee HC, Kohra S, Arizono K. **2002**. Release of bisphenol from food can lining upon heating. *Journal of Health Science* 48:331-334.

Takeda Y, Liu X, Sumiyoshi M, Matsushima A, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. **2009**. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: predominant expression of type-1 ERR γ isoform. *J Biochem* 146(1):113-122.

Takeuchi T, Tsutsumi O. **2002**. Serum Bisphenol A concentration showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291:76-78.

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Takai Y, Taketani Y. **2004**. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol-A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine Journal* 51:165-169.

Tan BLL, Ali Mohd M. **2003**. Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer. *Talanta* 61:385-391.

Teeguarden JG, Waechter JM Jr, Clewell HJ, Covington TR, Barton HA. **2005**. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma binding protein, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci* 85:823-838.

Teitelbaum SL, Briton JA, Calafat AM, Ye X, Silva MJ, Reidy JA, Gálvez MP, Brenner BL, Wolff MS. **2008**. Temporal variability in urinary concentrations of phthalate metabolites, phytoestrogens and phenols among minority children in the United States. *Environ Res* 106(2):257-269.

Thomas P, Dong J. **2006**. Binding and activation of the seven-membrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:175-179.

Thomson BM, Cressey PJ, Shaw IC. **2003**. Dietary exposure to xenoestrogens in New Zealand. *J Environ Monit* 5:229-235.

Thomson BM, Grounds PR. **2005**. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit Contam* 22:65-72.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. **2005**. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7014-7019.

Todaka E, Mori C. **2002**. Necessity to establish new risk assessment and risk communication for human fetal exposure to multiple endocrine disruptors in Japan. *Congenit Anom (Kyoto)* 42:87-93.

Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Vaselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stroop GD, Waechter JM. **2002**. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 68:121-146.

Uchida K, Suzuki A, Kobayashi Y, Watanabe H, Katsu Y, Suzuki J, Asaoka K, Mori C, Arizono K, Iguchi T. **2002**. Bisphenol A administration during pregnancy results in fetal exposure in mice and monkeys. *Journal of Health Science* 48:579-582.

Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. **2006**. The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol* 101(4-5):263-74.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. **2007**. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24:139-177.

Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. **2008**. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 26(3-4):210-2199.

Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. **2009**. Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30(1):75-95.

Vidaeff AC, Sever LE. **2005**. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiological evidence. *Reprod Toxicol* 20:5-20.

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. **1995**. The E-screen assay: a comparison of different MCF-7 cell stocks. *Environ Health Perspect* 103(9):844-850.

Vinggaard AM, Corner W, Lund KH, Bolz U, Petersen JH. **2000**. Identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by an in vitro yeast estrogen screen and chemical analysis. *Chem Res Toxicol* 13:1214-1222.

Völkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser Jg, Dekant W. **2002**. Metabolism and kinetic of Bisphenol A in human at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15:1281-1287.

Völkel W, Bittner N, Dekant W. **2005**. Quantitation of Bisphenol A and Bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 33:1748-1757.

Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. **2008**. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett* 179(3):155-162.

vom Saal F & Moyer C. **1985**. Prenatal effects on reproductive capacity during aging in female mice. *Biol Reprod* 32:1116.

vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. **1998**. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14:239-60.

vom Saal FS, Hughes C. **2005**. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 113:926–933.

vom Saal FS, Welshons WV. **2006**. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research* 100: 50-76.

Wagner M, Oehlmann J. **2009**. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ Sci Pollut Res Int* 16(3):278-286.

Weinhold B. **2003**. Body of evidence. *Environ Health Perspect* 111:394A-399A.

Weiss B, Amler S, Amler RW. **2004**. Pesticides. *Pediatrics* 113(Suppl 4):1030-1036.

Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. **2003**. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111(8):994-1006. Review.

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. **2006**. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of Bisphenol A at level of human exposure. *Endocrinology* 147:S56-S69.

Wilson NK, Chuang JC, Lyu C, Menton R, Morgan MK. **2003**. Aggregate exposures of nine preschool children to persistent organic pollutants at day care and at home. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 13:187-202.

Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK, Lordo RA, Sheldon LS. **2006**. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res* 103(1):9-20.

Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK, Lordo RA, Sheldon LS. **2007**. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res* 103:9-20

Wolff MS, Teitelbaum SL, Windham G, Pinney SM, Britton JA, Chelito C, Godbold J, Biro F, Kushi LH, Pfeiffer CM, Calafat AM. **2007**. Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates and phenols in girls. *Environ Health Perspect* 115:116-121.

Wolff MS, Engel S, Berkowitz G, Ye X, Zhu C, Wetmur J, Calafat A. **2008**. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 116:1092-1097.

Wong KO, Leo LW, Seah HL. **2005**. Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. *Food Addit Contam* 22:280-288.

World Health Organization. **1995**. Physical Status: The use and interpretation of anthropometry. Report no. 854.

World Health Organization. Regional Office for Europe. Children's Health and Environment Action Plan for Europe (CEHAPE). Disponible en:

http://www.euro.who.int/eprise/main/WHO/Progs/CHE/Policy/20020724_2

World Health Organization. The Bangkok Statement: A pledge to promote the protection of Children's Environmental Health. Disponible en:

<http://www.who.int/docstore/peh/ceh/Bangkok/bangstatement.htm>

World Wildlife Fund (WWF). Bisphenol A: a known endocrine disruptor. Surrey, UK: WWF-UK; **2000**.

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S. **2002**. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reproductive Toxicology* 16:735-739.

Yamamoto T, Yasuhara A. **1999**. Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere* 38(11):2569-2576.

Yamamoto T, Yasuhara A. **2002**. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 46(8):1215-1223.

Yamano Y, Miyakawa S, Iizumi K, Itoh H, Iwasaki M, Tsugane S, Kagawa J, Nakadate T. **2008**. Long-term study of urinary bisphenol A in elementary school children. *Environ Health Prev Med* 13(6):332-337.

Yang MH, Kim SY, Lee SM, Chang SS, Kawamoto T, Yang JY, et al. **2003**. Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population. *Arch Environ Contam Toxicol* 44:546-551.

Yang MH, Kim SY, Chang SS, Lee IS, Kawamoto T. **2006**. Urinary concentrations of bisphenol A in relation of biomarkers of sensitivity and effect and endocrine-related health effects. *Environ Mol Mutagen* 47:571-578.

Yang YJ, Hong YC, Oh SY, Park MS, Kim H, Leem JH, Ha EH. **2009**. Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental Research* 109:797–801.

Ye X, Kuklennyik Z, Needham J, Calafat AM. **2006**. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 831 :110-115.

Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushira S, Yuasa A. **1999**. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 340:405-409.

Yonekubo J, Hayakawa K, Sajiki J. **2008**. Concentrations of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and their derivatives in canned foods in Japanese markets. *J Agric Food Chem* 56:2041-2047.

Yoshida T, Horie M, Hoshino Y, Nakazawa H. **2001**. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam* 18:69-75.

Yoshihara S, Mizutare T, Makishima M, Suzuki N, Fujimoto N, Igarashi K, Ohta S. **2004**. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* 78:50-59.

Zafra A, del Olmo M, Pulgar R, Navalón A, Vílchez JL. **2002**. Determination of bisphenol-A and related compounds in human saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 56:213-218.

Zafra A, del Olmo M, Suárez B, Hontoria E, Navalón A, Vílchez JL. **2003**. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Res* 37(4):735-742.

Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Ratahao E, Debrauwer L, Faure R, Cravedi JP. **2003**. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111:309-319.

VIII. ANEXO



ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

Hospital:	
Servicio:	
Identificación:	
Código:	
Entrevistador:	

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se le invita a participar en un estudio descriptivo sobre salud y factores ambientales. La participación es totalmente voluntaria.

Algunas preguntas podrían ser un poco difíciles de contestar pero le pedimos que conteste tan precisamente como le sea posible.

La información que usted da se mantendrá en completa confidencialidad y su nombre no será registrado junto con sus respuestas.

Es importante para los resultados del proyecto, que participe en la medida que le sea posible, por eso le rogamos su colaboración.

Lugar:

Fecha: ____/____/____

Firma del participante: _____

NO RESPUESTA:

Dirigido a quienes por diversos motivos no desean participar en el estudio.

¿Ha sido previamente informado del estudio?

Sí: _____ No. _____

Motivo de no participación:

No quiere: _____ NS/NC: _____

Encuestador:

A. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DEL PACIENTE (NIÑ@)			
1. ¿Cuándo nació?			
Día, mes, año: ____ / ____ / 19____		Edad*:	
2. Sexo*:			
3. ¿Dónde vive?			
Localidad:	Código postal:	Teléfono:	
4. ¿Cuánto tiempo llevan viviendo en ese lugar? Años			
5. ¿Está su residencia próxima a un lugar con invernaderos?			
1. Sí			
0. No (Ir a la pregunta 7)			
-9. NS/NC (ir a la pregunta 7)			
6. ¿A qué distancia? Metros			
7. ¿Está su residencia próxima a una zona con actividad agrícola?			
1. Sí			
0. No (Ir a la pregunta 9)			
-9. NS/NC (Ir a la pregunta 9)			
8. ¿A qué distancia? Metros			
9. ¿Está su residencia próxima a una zona con alguna actividad industrial?			
1. Sí			
0. No (Ir a la pregunta 12)			
-9. NS/NC (Ir a la pregunta 12)			
10. ¿Qué tipo de actividad industrial? (garaje, papelería,...)			
11. ¿A qué distancia? Metros			
12. ¿En qué lugares han vivido a lo largo de su vida?			
Localidad	Provincia	CP:	Tiempo:.....años
Localidad	Provincia	CP:	Tiempo:.....años
Localidad	Provincia	CP:	Tiempo:.....años
13. ¿Desde que nació su hij@ ha vivido cerca de un lugar con invernaderos?			
1. Sí			
0. No (Ir a la pregunta 16)			
-9. NS/NC (Ir a la pregunta 16)			
14. ¿A qué distancia metros			
15. ¿ Desde que nació su hij@ durante cuanto tiempo vivió allí? años			

16. ¿Estaba su residencia próxima a una zona con actividad agrícola?	
1. Sí	
0. No (Ir a la pregunta 19)	
-9. NS/NC (Ir a la pregunta 18)	
17. ¿A qué distancia?	Metros
18. ¿Estaba su residencia próxima a una zona con alguna actividad industrial?	
1. Sí	
0. No (Ir a la pregunta 23)	
-9. NS/NC (Ir a la pregunta 23)	
19. ¿Qué tipo de actividad industrial?	
20. ¿A qué distancia?	Metros
21. ¿Desde que nació su hij@ durante cuánto tiempo vivió allí?	Años
22. ¿Pasan parte del año viviendo cerca de invernaderos, zona agrícola o zona con actividad industrial?	
1. Sí	
0. No (Ir a la pregunta 27)	
-9. NS/NC (Ir a la pregunta 27)	
23. ¿Qué tipo de actividad?	
1. Invernaderos (Ir a pregunta 26)	
2. Zona agrícola (Ir a pregunta 26)	
3. Actividad industrial	
24. ¿Qué tipo de actividad industrial?	
25. ¿Cuánto tiempo pasan allí? (P.e. el verano,...)	meses
26. ¿A qué distancia se encuentra su segunda residencia de alguno de estos lugares?	Metros

27. ¿Podría indicar las ocupaciones en las que ha trabajado más de 12 meses? (esta pregunta es para ambos progenitores)			29. ¿Cuánto tiempo se dedicó a ellas?				
1. _____						meses	
2. _____						meses	
3. _____						meses	
4. _____						meses	
5. _____						meses	
28. ¿Podría decir cuál era la ocupación de la madre mientras estaba embarazada de su hij@?							
29. ¿Y la del padre en aquel momento?							
Por favor indique si estuvo personalmente en contacto con alguno de los siguientes productos en su <u>trabajo</u>, en su <u>hogar</u>, realizando <u>labores agrícolas</u> o de <u>jardinería</u>, etc (pregunta 32), y si es así, ¿dónde? (pregunta 33) y ¿durante cuántas horas semanales (pregunta 34)?							
30. Exposición			31. Lugar				32. Tiempo
1. Humos del plástico	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
2. Productos de limpieza (incluidos desinfectantes)	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
3. Disolventes orgánicos	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
4. Pinturas	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
5. Tinta de imprenta	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
6. Tintes y pigmentos	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
7. Cola	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
8. Herbicidas	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
9. Funguicidas	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
10. Acaricidas	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas

11. Insecticidas	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
12. Productos químicos fotográficos	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
13. Metales pesados (Pb, Hg, Cd)	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
14. Otros metales (Fe, Zn, Al)	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
15. Humos de soldar	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
16. Humos de fábrica	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
17. Humos de tubo de escape (diesel, gasolina)	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
18. Anestésicos	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
19. Citostáticos y antibióticos	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
20. Grano, papel, y polvo textil	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
21. Otros productos químicos	1.Sí	0.No	1.T	2.H	3.C	4.O	Horas
	-9. NS/NC				-9. NS/NC		-9. NS/NC

T = Trabajo; H = Hogar; C = Labores agrícolas o de jardinería; O = Otros

<p>33. ¿Cuál es su categoría profesional?</p> <ul style="list-style-type: none"> 0. Fuerzas armadas 1. Dirección de empresas y de administraciones públicas 2. Técnicos y profesionales científicos e intelectuales 3. Técnicos y profesionales de apoyo 4. Empleados de tipo administrativo 5. Trabajadores de los servicios de restauración, personales protección, vendedores de los comercios 6. Trabajadores cualificados en la agricultura y en la pesca 7. Artesanos y trabajadores cualificados de las industrias manufactureras, la construcción y la minería 8. Operadores de instalaciones y maquinaria y montadores 9. Trabajadores no cualificados -9. NS/NC 	<p>34. ¿Cuál es la categoría profesional de su cónyuge?</p> <ul style="list-style-type: none"> 0. Fuerzas armadas 1. Dirección de empresas y de administraciones públicas 2. Técnicos y profesionales científicos e intelectuales 3. Técnicos y profesionales de apoyo 4. Empleados de tipo administrativo 5. Trabajadores de los servicios de restauración, personales protección, vendedores de los comercios 6. Trabajadores cualificados en la agricultura y en la pesca 7. Artesanos y trabajadores cualificados de las industrias manufactureras, la construcción y la minería 8. Operadores de instalaciones y maquinaria y montadores 9. Trabajadores no cualificados -9. NS/NC
---	---

<p>35. ¿Qué estudios tiene usted?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No sabe leer ni escribir 2. Primaria incompleta 3. Primaria 4. Formación profesional o Bachiller 5. Diplomado 6. Licenciatura 7. Postgrado (doctor, master,...) -9. NS/NC 	<p>36. ¿Qué estudios tiene su cónyuge?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No sabe leer ni escribir 2. Primaria incompleta 3. Primaria 4. Formación profesional o Bachiller 5. Diplomado 6. Licenciatura 7. Postgrado (doctor, master,...) -9. NS/NC
--	---

B. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DEL PACIENTE (NIÑ@)	
37. ¿Cuánto mide?	cm
38. ¿Cuánto pesa?	kg
39. ¿Cree que ha perdido peso en los últimos 12 meses?	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 0. No (Ir a la pregunta 43) -9. NS/NC (ir a la pregunta 43) 	
40. ¿Cuánto?	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Menos de 4 kilos 2. Entre 4-6 kilos 3. Más de 6 kilos -9. NS/NC 	
41. ¿Cuál cree que ha sido la causa de la pérdida de peso?	

C. CONDICIONES DE SALUD DEL PACIENTE (NIÑ@)			
42. ¿Ha tenido alguna de las enfermedad? (MARCAR LO QUE PROCEDA) (En caso de respuesta negativa ir a la pregunta 45)			
1. Hipertensión	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
2. Artritis	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
3. Alergias	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
4. Diabetes	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
5. Úlcera gastrointestinal	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
6. Cataratas	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
7. Afección cutánea	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
8. Embolia	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
9. Afección cardíaca	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
10. Asma	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
11. Afección tracto urinario	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
12. Estreñimiento	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
13. Varices	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
14. Bronquitis crónica	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
15. Hipercolesterolemia	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
16. Depresión, Ansiedad	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
17. Otras: (especificar cuál)	1. Sí	0. No	-9. NS/NC
43. ¿Va su hij@ al dentista?, Con qué frecuencia?			
1. Ni siquiera 1 vez al año 2. 1 vez al año 3. 1 vez cada 6 meses 4. Más de 1 vez cada 6 meses			
44. ¿Le han puesto alguna vez un empaste, sellador?			
1. Sí 0. No (Ir a la pregunta 49) -9. NS/NC (Ir a la pregunta 49)			
45. Si contestó SÍ, por favor especifique:			
Tipo/Color	<u>Amalgama</u>	<u>Composite</u>	
Número de empastes, selladores			

46. ¿Cuándo le pusieron el empaste, sellador?		edades
47. ¿Ha consumido algún medicamento durante los 3 últimos meses?		
1. Sí 0. No (Ir a la pregunta 53) -9. NS/NC (Ir a la pregunta 53)		
Si contestó SÍ, por favor especifique:		
48. Nombre de la medicación:	51. Para qué enfermedad:	
49. ¿Ha consumido medicamentos, vitaminas o minerales en los 7 días anteriores al ingreso?		
1. Sí 0. No (Ir a la pregunta 55) -9. NS/NC (Ir a la pregunta 55)		
50. ¿Cuáles?		
D. HISTORIA REPRODUCTIVA DE LA MADRE		
51. ¿Tiene usted hij@s además de este?		
1. Sí 0. No (Ir a la pregunta 53) -9. NS/NC (Ir a la pregunta 53)		
52. En caso afirmativo, ¿Cuántos hij@s?		
53. ¿Cuántos embarazos ha tenido?		
54. ¿Cuál es el lugar que ocupa este hij@?		

<p>55. ¿Han tenido sus hij@s algún problema de salud al nacer?</p> <p>1. Sí</p> <p>0. No (Ir a la pregunta 70 las mujeres y a la 72 los hombres)</p> <p>-9. NS/NC (Ir a la pregunta 70 las mujeres y a la 72 los hombres)</p>
<p>56. En caso afirmativo, ¿podría especificar de qué tipo?</p>
<p>57. ¿Ha amamantado a sus hij@s?</p> <p>1. Sí</p> <p>0. No (Ir a la pregunta 59)</p> <p>-9. NS/NC (Ir a la pregunta 59)</p>
<p>58. En caso afirmativo, ¿Cuántos meses de promedio (sumar los meses por cada hijo) ? meses</p>
<p>D. ESTILOS DE VIDA</p>
<p>59. ¿Fuma usted y/o su marido actualmente?</p> <p>1. Sí</p> <p>0. No (Ir a la pregunta 61)</p> <p>-9. NS/NC (Ir a la pregunta 61)</p>
<p>60. En caso afirmativo, ¿con qué frecuencia?</p> <p>1. Muy pocas veces (1 cigarrillo al mes)</p> <p>2. Ocasionalmente (1-3 cigarrillos semanales)</p> <p>3. Moderadamente (2-4 cigarrillos diarios)</p> <p>4. Mucho (más de 10 cigarrillos diarios)</p>
<p>61. ¿Han fumado con anterioridad?</p> <p>1. Sí</p> <p>0. Nunca (Ir a la pregunta 63)</p> <p>-9. NS/NC (Ir a la pregunta 63)</p>
<p>62. En caso afirmativo, ¿Con qué frecuencia fumaba en el pasado?</p> <p>1. Muy pocas veces (1 cigarrillo al mes)</p> <p>2. Ocasionalmente (1-3 cigarrillos semanales)</p> <p>3. Moderadamente (2-4 cigarrillos diarios)</p> <p>4. Mucho (más de 10 cigarrillos diarios)</p>
<p>¿Podría decirme qué cantidad de las bebidas siguientes suelen consumir a la semana?</p>

63. Cerveza	nº _____ bebidas a la semana (1 tubo = 1 bebida)	-9. NS/NC
64. Vino	nº _____ bebidas a la semana (1 vaso = 1 bebida)	-9. NS/NC
65. Licores	nº _____ bebidas a la semana (1 cubata = 3 bebidas)	-9. NS/NC

E. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA DIETA

66. ¿Qué tipo de agua beben?

1. Agua no embotellada
2. Agua embotellada (Ir a la pregunta 81)
3. Ambas
- 9. NS/NC (Ir a la pregunta 82)

67. ¿Qué tipo de agua no embotellada?

1. Del grifo
2. De un pozo
3. De manantial/fuente
4. De lluvia

68. ¿Qué agua embotellada?

69. ¿Cuánta agua bebe?

vasos/día

70. ¿Qué tipo de agua utiliza para cocinar?

1. Agua no embotellada
2. Agua embotellada (Ir a la pregunta 85)
3. Ambas
- 9. NS/NC (Ir a la pregunta 86)

83. ¿Qué tipo de agua no embotellada?

1. Del grifo
2. De un pozo
3. De manantial/fuente
4. De lluvia

84. ¿Qué agua mineral?

85. ¿Con qué frecuencia semanal come pescado y marisco?

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

86. ¿Qué tipo de pescado consume mas frecuentemente?

1. Pescado azul
2. Pescado blanco
3. Indistintamente
- 9. NS/NC

87. ¿Con qué frecuencia consume productos lácteos? (no queso)

1. Nunca
2. Dos veces por semana o menos
3. Mas de dos veces por semana
4. Todos los días
- 9. NS/NC

88. ¿Qué tipo de leche consume?

1. Entera
2. Semidesnatada
3. Desnatada
- 9. NS/NC

89. ¿Cuánta leche toma al día?

vasos/día

90. ¿Con qué frecuencia come queso?

1. Nunca
2. Dos veces por semana o menos
3. Más de dos veces por semana
4. Todos los días
- 9. NS/NC

91. ¿Qué tipo de queso consume mas frecuentemente?

1. Fresco
2. Curado/Semicurado
3. Indistintamente
- 9. NS/NC

92. ¿Con qué frecuencia consume embutidos y fiambres?

1. Nunca
2. Dos veces por semana o menos
3. Más de dos veces por semana
4. Todos los días
- 9. NS/NC

93. ¿Qué consume con mayor frecuencia?

- 1. Embutido**
- 2. Fiambre**

94. ¿Con qué frecuencia come carne?

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

95. ¿Qué tipo de carne consume más frecuentemente?

1. Pollo
2. Cerdo
3. Vacuno
4. Ovino
5. Indistintamente
6. Otros
- 9. NS/NC

96. ¿Con qué grasa cocina habitualmente?

1. Aceite de oliva
2. Otros aceites vegetales
3. Grasa animal
4. Indistintamente
- 9. NS/NC

97. ¿Consume mantequilla y/o margarina?

1. Mantequilla
2. Margarina
3. Indistintamente
4. Nunca
- 9. NS/NC

98. ¿Con que frecuencia consume mantequilla y/o margarina?

1. Nunca
2. Una vez por semana
3. Tres-cuatro veces por semana
4. Una vez al día
5. Mas de una vez al día
- 9. NS/NC

99. ¿Con qué frecuencia come legumbres? (lentejas, garbanzos,....)

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

100. ¿Con qué frecuencia come verduras cocinadas?

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

101. ¿Con qué frecuencia come vegetales crudos?

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

102. ¿Con qué frecuencia come fruta?

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

103. ¿Con qué frecuencia come huevos? (fritos, en tortilla, cocidos...)

1. Nunca
2. Menos de una vez por semana
3. Una vez por semana
4. Dos veces por semana
5. Mas de dos veces por semana
- 9. NS/NC

104. ¿Con qué frecuencia come pan?

1. Nunca
2. Una vez por semana
3. Tres-cuatro veces por semana
4. Una vez al día
5. Mas de una vez al día
- 9. NS/NC

105. ¿Con qué frecuencia consume pastas? (macarrones, espaguetis,...)

1. Nunca
2. Una vez por semana
3. Tres-cuatro veces por semana
4. Una vez al día
5. Mas de una vez al día
- 9. NS/NC

106. ¿Consume comida enlatada?

1. Sí
0. No (Ir a la pregunta 109)
- 9. NS/NC (Ir a la pregunta 109)

107. En caso de respuesta afirmativa, ¿Cuántas latas de conserva consumen en su casa a la semana?

latas/semana

108. ¿Ha variado su dieta considerablemente en los últimos doce meses?

- 1. Sí
- 0. No (pasar a la pregunta 111)
- 9. NS/NC (pasar a la pregunta 111)

109. En caso afirmativo, indicar en qué medida:

110. ¿Come comida ecológica?

- 1. Sí
- 0. No (fin)
- 9. NS/NC (fin)

111. En caso afirmativo ¿Qué proporción de su dieta proviene de alimentos ecológicos?

INFORMACIÓN QUE DEBERÁ RECOGERSE DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS

Identificación: _____

1er Apellido: _____

2º Apellido: _____

Nombre: _____

Servicio donde esté ingresado

Cirugía general Cirugía digestiva Cirugía vascular Cirugía mama
Traumatología Otros

Número de Historia: _____

Diagnóstico

principal: _____