

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ANÁLISIS DE SUSTANCIAS ESTROGÉNICAS

EN TEJIDO ADIPOSO:

MARCADOR DE EXPOSICIÓN

EN CÁNCER DE MAMA

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en
Farmacia la Licenciada ANA M^ª. RIVAS VELASCO**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi más profundo agradecimiento y afecto a Fátima Olea Serrano, mi directora, que a lo largo de estos años ha sido mi "maestra", mi compañera y mi amiga. He tenido la suerte de compartir con ella muchas horas de trabajo donde ha mostrado en todo momento su noble perfil humano y profesional, su espíritu de entrega, su dedicación y su generosidad; por todo ello y por el cariño que siempre me ha brindado ¡Gracias! ¡ Muchas gracias!

A Nicolás Olea Serrano, por su incondicionalidad, por su gran apoyo y su crítica constructiva que han facilitado enormemente la evolución de este trabajo y de mi propia persona. Por compaginar su capacidad de trabajo con un envidiable sentido del humor, y contagiar a todos los que le rodeamos de su entusiasmo por la investigación.

A Don Vicente Pedraza Muriel, paradigma de profesor universitario cuya trayectoria docente de honradez profesional sirve de guía a generaciones de estudiantes. Gracias por la ayuda y el apoyo que continuamente me ha dado.

A Mariano Ruíz de Almodóvar, por la ayuda que me ha brindado. Así como a Mercedes Villalobos por su colaboración.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su ayuda en el plano científico y porque hicieron mucho más gratas las jornadas de trabajo. El laboratorio no hubiera funcionado igual sin Maribel, Rosa, Blanca, Manolo, Eva y Rafa. No hubo persona más solícita para mis problemas informáticos que Teresa. Todo hubiese sido más aburrido sin Conchi, Conchi y Paqui que han dado pie a agradables discusiones "filosóficas".

A Patricia por haberme "adoptado" en su familia y enriquecer mi castellano con aportaciones argentinas. A Marieta porque sin su ayuda no hubiese sido posible

la realización de esta tesis. A ambas ¡gracias! por todos los buenos ratos que hemos vivido juntas.

A Paqui Gutierrez por su apoyo en todo momento, en especial, por todos esos consejos que me llegaban en la distancia y que más de una vez hicieron que se me escapara una lagrimilla.

A Arancha, Rosa, Begoña, Jorge, Marga y Adela por su colaboración en este trabajo. Y al nuevo fichaje, Chabela por su ayuda en el diseño final de esta tesis.

A todos los profesores, compañeros y amigos del Departamento de Nutrición y Bromatología, por la ayuda que siempre me han brindado.

A los profesores Ana Soto y Carlos Sonnenschein de la Universidad de Tufts por la acogida que me dieron en su laboratorio. A el profesor Guy Lecqlerq y a todo su equipo por su colaboración en esta tesis y por hacer que una parte de mis buenos recuerdos queden para siempre en Bruselas.

A todos mis amigos por su apoyo en todo momento y su confianza en mí aún cuando yo misma dudaba. En especial a Antonio por soportar con infinita paciencia a la autora de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mi familia que durante estos años han seguido conmigo el desarrollo de esta tesis. A mi padre por ser mi corrector, editor y sobre todo mi enciclopedia. A mi madre, porque sólo ella y yo sabemos lo que me ha animado y la fuerza que me ha transmitido para seguir adelante a pesar de los obstáculos. A mi hermana M^a José, que más que nadie ha estado a mi lado a lo largo de estos años, apoyándome en todo momento, y, en especial, al nuevo miembro de mi familia Jesús por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A todos, ¡ GRACIAS!

A mis padres, por haberme dado todo

A M^a José, por todo lo que hemos compartido

ÍNDICE

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Disruptores hormonales	3
1.2 Actividad hormonal estrogénica	9
1.2.1 Estructura de los estrógenos naturales	11
1.2.2 Xenobióticos estrogénicos	13
1.2.3 Presencia de xenoestrógenos en seres vivos	33
1.3 Disruptores endocrinos estrogénicos y enfermedad	38
1.3.1 El síndrome DES	39
1.3.2 Alteraciones del tracto genital urinario	41
1.3.3 Cáncer de mama	43
1.4 Test de actividad hormonal estrogénica	47
1.4.1 Tests <i>in vivo</i>	47
1.4.2 Tests <i>in vitro</i>	49
1.5 Metodología químico-analítica. Antecedentes	53
II OBJETIVOS	57
III MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1 Instrumentación	59
3.2 Material fungible	67
3.3 Reactivos	69
3.4 Identificación de la población	74
3.5 Metodología cromatográfica	78
3.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa	78
3.5.2 Cromatografía de gases (CG)	79
3.5.3 Análisis cualitativo	79
3.5.4 Análisis cuantitativo	83
3.6 Metodología biológica	133
3.6.1 Test E-SCREEN	136
3.6.2 Test MVLN	138
3.6.3 Cuantificación de pS2	139
3.6.4 Medida de ARNm: "Northern Blot"	139
3.7 Extracción de xenoestrógenos en muestras de tejido adiposo	142
3.8 Evaluación de la estrogénicidad de las fracciones alfa y beta	151
3.9 Determinación de lípidos totales	152

IV RESULTADOS	154
4.1 Estudio del efecto hormonal estrogénico.....	154
4.1.1 Test E-SCREEN.....	154
4.1.2 Cuantificación de pS2.....	181
4.1.3 Test MVLN.....	184
4.1.4 Medida de ARNm: "Northern Blot".....	192
4.2 Evaluación cuantitativa de la actividad hormonal estrogénica.....	199
4.3 Análisis de moléculas organocloradas en tejido adiposo humano.....	215
V DISCUSIÓN	261
VI CONCLUSIONES	292
VII BIBLIOGRAFÍA	295

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que anualmente se producen alrededor de quinientos nuevos compuestos químicos de síntesis, que al ser liberados al medio ambiente pueden interaccionar con los seres vivos. Muchos de ellos no han sido evaluados en su capacidad potencial de actuar sobre los sistemas biológicos, probablemente porque los criterios de evaluación actualmente existentes son muy estrictos y están sometidos a múltiples restricciones. Algunas de estas sustancias actúan sobre los sistemas biológicos a las dosis y concentraciones en que se encuentran en los medios naturales, por lo que es presumible un cierto efecto sobre el organismo expuesto.

Desde los años cuarenta en que comenzó su producción masiva, se han diseñado más de 600 productos químicos básicos para combatir insectos, malas hierbas, roedores y otros muchos organismos "perjudiciales" en agricultura. El uso de los productos químicos en las actividades agrícolas ha supuesto un beneficio

sustancial en la producción agraria, incrementándose el rendimiento de las cosechas a la vez que se ha elevado la calidad de los alimentos. No obstante frente al beneficio que supone la destrucción sistemática de parásitos que afectan a la salud de las plantas animales y a la salud humana se debe tener presente la interacción de los distintos principios activos con las especies animales y el propio hombre (Olea y cols., 1995).

Por otra parte, desde la Segunda Guerra Mundial se han liberado al medio ambiente, en grandes cantidades, productos químicos derivados de actividades industriales y cada año se introducen en el mercado 1.000 nuevos productos de síntesis (Castillo y Barceló, 1997).

La idea de que estas sustancias tienen un efecto adverso sobre la salud humana y animal no es un tema nuevo. A comienzos de los años 60, Raquel Carson (Carson, 1962) advirtió que ciertos productos químicos de síntesis se habían difundido por todo el planeta, contaminando prácticamente a todos los seres vivos hasta en las tierras vírgenes más remotas. Carson no sólo describió el modo en que la naturaleza se estaba impregnando con productos químicos sino que, además, puso en evidencia el proceso en virtud del cual dichas sustancias se iban acumulando en los organismos vivos. Su trabajo tuvo un gran impacto sobre la opinión pública y atrajo la atención de políticos y científicos que reforzaron la investigación sobre el efecto de los contaminantes químicos sobre la salud humana y animal y su impacto medio ambiental.

1.1 DISRUPTORES HORMONALES

Entre los efectos que se han atribuido a sustancias químicas introducidas en el entorno de la actividad humana se encuentra la perturbación de la homeostasis hormonal tanto de los animales como de los seres humanos. Las consecuencias de esta alteración pueden ser graves debido al papel decisivo que desempeñan las hormonas en el control del desarrollo y en numerosas funciones fisiológicas específicas. Recientemente, se ha acuñado el término de disruptores endocrinos (Endocrine Disrupting Chemicals / EDCs) para definir el conjunto de compuestos químicos que interactúan con el sistema endocrino, sobre el que inducen efectos potencialmente debidos a su capacidad para: 1) mimetizar la acción de las hormonas endógenas; 2) antagonizar la acción de las hormonas; 3) alterar su patrón de síntesis y metabolismo; o bien 4) modular los niveles de los receptores correspondientes (Fernández y cols., 1998).

El rango de compuestos químicos disruptores endocrinos es muy amplio y crece día a día, comprendiendo desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos. La diversidad estructural de los EDCs hace imposible predecir *a priori* si una molécula estará dotada de capacidad hormonal. La tabla 1.1 muestra los compuestos cuya actividad disruptora endocrina está bien documentada.

Tabla 1.1: Compuestos químicos disruptores endocrinos

Grupo	Disruptores Endocrinos
Organohalogenados	Dioxinas, Furanos, PCBs, PBBs, Octacloroestireno, Hexaclorobenzeno, Pentaclorofenol, Bromobisfenol, etc..
Pesticidas	2,4,5-T, 2,4-D, Alocloro, Aldicarb, Amitrole, Atrazina, Benomil, β -HCH, Carbaril, Clordano, Cipermetrín, DBCP, DDT y metabolitos, Dicofol, Dieldrín, Endosulfán, Esfenvalerato, Etilparatión, Fenvalerato, Lindano, Heptacloro, H-epóxido, Keltano, Kepona, Malation, Mancozeb, Maneb, Metomil, Metoxicloro, Metiran, Metribuzin, Mirex, Nitrofen, Oxiclordano, Permetrín, Piretróides sintéticos, Toxafeno, Transnonacloro, Tributilin, Trifluralin, Vinclozolina, Zineb, Ziram
Metales pesados	Cadmio, Mercurio, Plomo
Ftalatos	Di-etilhexilftalato, Butilbenzilftalato, Di-n-butilftalato, Di-n-pentilftalato, Di-hexilftalato, Di-propilftalato, Diciclohexilftalato, Dietilftalato
Bisfenoles	Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol AF, BADGE, Bis-DMA
Alquilfenoles	Penta - dodecilfenol
Otros	Estirenos, Benzopirenos, Acido amsiónico, Fenilfenol, Butilhidroxianisol, Parabenes

La capacidad de los contaminantes químicos medio ambientales para interferir en la función endocrina fue establecida hace más de 30 años. El hecho inicial fue la constatación de que la población de pájaros piscívoros había declinado en los Estados Unidos debido a problemas reproductivos graves. Tales observaciones permitieron la identificación del p,p'-DDE, un metabolito del pesticida organoclorado DDT, como agente causante de las alteraciones reproductivas observadas (Hickey y Anderson, 1968; Heath y cols., 1969). El problema fue parcialmente resuelto con la retirada del pesticida en 1972, aunque observaciones posteriores indican que el DDT y otros pesticidas organoclorados continúan impregnando a las poblaciones expuestas debido a su persistencia en el medio ambiente, su bioacumulación tisular y la transmisión del mismo dentro de la cadena alimentaria.

Otras observaciones medio ambientales relacionadas con la exposición masiva de poblaciones animales, han ayudado a entender el problema de la disrupción hormonal. Los casos recogidos en la literatura científica son múltiples. Sirva de ejemplo lo ocurrido con la población de caimanes del lago Apopka en Florida, que se expusieron al pesticida dicofol (Keltano) tras un vertido accidental en 1980. Diez años más tarde, la población de caimanes había descendido significativamente, había aumentando la mortalidad en los huevos y la mitad de las crías nacidas languidecían y morían antes de los diez días y se encontraron, además, hembras adolescentes que tenían anomalías severas en los ovarios y presentaban niveles de estrógenos en sangre dos veces más altos de lo normal. Por otro lado los caimanes jóvenes machos estaban fuertemente feminizados, presentaban penes anormalmente pequeños y tenían niveles de estrógenos más altos en su sangre que los normales. Las investigaciones llevadas a cabo sirvieron para concluir que los productos químicos que fueron vertidos al lago habían alterado el sistema endocrino de los embriones, limitando la capacidad de los caimanes para reproducirse y dando lugar a las malformaciones descritas (Woodward y cols., 1993; Guillette y cols., 1995).

En 1993, se publicó por primera vez la observación experimental relativa a los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces. En efecto, los peces machos capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentaron características sexuales masculinas y femeninas. Se observó también la producción de vitelogenina en el hígado de los peces macho, una proteína sintetizada normalmente por las hembras como respuesta a una señal estrogénica. Varias sustancias químicas, especialmente los alquilfenoles encontrados en detergentes y plásticos se identificaron como responsables de causar estos efectos feminizantes (Jobling y Sumpter, 1993).

En nuestro país se ha documentado recientemente un fenómeno denominado *imposex*, que consiste en la superposición de caracteres sexuales masculinos sobre hembras de gasterópodos (Gibbs y cols., 1987). Se trata de uno de los pocos ejemplos de relación causa-efecto, dosis-dependiente, que se conocen en toxicología y resulta altamente específico ante la contaminación por TBT (tributiltin, compuesto organoestáñoico lixiviado de las pinturas anti-algas). Durante el verano de 1996 se desarrolló una campaña de muestreo a lo largo de la costa de Galicia con el fin de estudiar la situación de la contaminación por derivados del TBT, escogiéndose como especie bioindicadora al prosobranquio marino *Nucella lapillus* por ser la segunda especie más sensible y en todas las muestras examinadas se registró la presencia de imposex en las poblaciones estudiadas (Barreiro y cols., 1998).

En resumen, en numerosos estudios se han asociado las patologías observadas en distintas especies animales con la exposición a contaminantes medio ambientales con actividad hormonal (Colborn y cols., 1993; Ahlborg y cols., 1995; Colborn y cols., 1996; Short y Colborn, 1999). Entre los efectos evidenciados figuran: 1) alteraciones de la función tiroidea en aves y peces, 2) disminución de la fertilidad en aves, peces, moluscos y mamíferos, 3) disminución de la eficacia en el proceso de incubación en peces, aves y tortugas, 4) desmasculización y feminización de peces machos, aves y mamíferos, 5) desfeminización y masculización de peces hembras, gasterópodos y aves y, finalmente, 6) alteraciones del sistema inmune en aves y

mamíferos

Aunque las pautas de presentación de los efectos varían de una especie a otra y son específicas de cada sustancia química, pueden formularse cuatro enunciados generales (Colborn y cols., 1993):

1. Los efectos de los contaminantes pueden ser distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto.
2. Los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto.
3. El momento de la exposición del organismo en desarrollo es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto.
4. Aunque la exposición crítica tenga lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones pueden no ser evidentes hasta la madurez del individuo.

En lo que respecta a la incidencia sobre la salud humana, los resultados experimentales no son concluyentes, pero la sospecha de asociación entre exposición a determinados compuestos con actividad hormonal y la génesis de diferentes enfermedades o disfunciones es cada vez más fuerte. Un modelo de exposición humana a compuestos químicos con actividad hormonal y su relación con la enfermedad es el proporcionado por el tratamiento de mujeres embarazadas con dietilestilbestrol (DES), un estrógeno sintético utilizado en medicina entre 1948 y 1971 para prevenir los abortos espontáneos, de cuya administración se derivan alteraciones funcionales en los órganos reproductivos, embarazos anormales, reducción de la fertilidad, desórdenes en el sistema reproductivo y periodos de depresión en la progenie (Palmlund y cols., 1993).

Durante los últimos años varias reuniones científicas de carácter nacional e internacional han servido para mostrar la evidencia y concluir que los compuestos químicos presentes en el medio ambiente pueden estar ejerciendo un efecto adverso sobre la salud reproductiva humana en la misma forma que está ocurriendo sobre poblaciones animales. Sirvan de ejemplo las reuniones sobre estrógenos y medio ambiente que de forma continua y espaciada celebra el Instituto Nacional de la Salud y Medio Ambiente

Americano, las reuniones de la Smithsonian Foundation en Washington (1996), la reunión de Weybridge de 1996 auspiciada por la Agencia de Medio Ambiente inglesa y la Unión Europea.

Las Administraciones Americana, Europea y Japonesa han participado en la promoción del conocimiento de este problema. La Agencia Americana del Medio Ambiente (EPA) ha establecido un comité de expertos (EDSTAC) para asesorar en los programas de estudio de toxicidad química relativos a disrupción endocrina. La Unión Europea a través de las Direcciones Generales VI, XI, XII y XXIV, ha efectuado un censo de actividades nacionales en el continente e incluido el tema en sus agendas de trabajo. Finalmente el gobierno japonés, consciente del problema en un país tan fuertemente industrializado, ha desarrollado un programa especial de investigación, el Strategic Program on Environmental Endocrine Disruptors 98 (SPEED 98), para analizar las consecuencias del mismo.

Entre las actividades institucionales realizadas destaca la promovida por la Organización para el Desarrollo Económico y la Cooperación (OECD) que reunió en París a expertos de países integrantes de la organización con objeto de desarrollar un plan estratégico de "screening" de nuevos compuestos químicos, previo el desarrollo de una encuesta entre los países integrantes para conocer la opinión de la administración y de otras partes implicadas en el tema de la disrupción hormonal. El plan de actuación propuesto por la OECD tiene como objetivo regular de forma más efectiva, en el curso de los próximos años, el empleo de los compuestos químicos responsables de la disrupción endocrina.

A pesar de que se han descrito mimetizadores y competidores endocrinos de diferentes tipos hormonales, tales como estrógenos, andrógenos y hormonas tiroideas, la información disponible, hoy, sobre los xenobióticos estrogénicos o xenoestrógenos es muy superior a las demás. Por esta razón desarrollamos a continuación, de forma resumida, la hipótesis estrogénica, que hace referencia al cuerpo de información existente sobre la naturaleza de los xenoestrógenos, su identificación y sus efectos sobre la salud humana.

1.2 ACTIVIDAD HORMONAL ESTROGÉNICA

Las hormonas sexuales femeninas son los estrógenos y los progestágenos. Los estrógenos guían el desarrollo de los caracteres secundarios en la hembra. En relación con ello, se sabe desde hace años que tras la extirpación de los ovarios, no vuelven a hacerse patentes en la vagina de las hembras castradas ciertos cambios morfológicos, como la cornificación del epitelio, típicos de la estimulación hormonal estrogénica (fase *estro*) y nunca presentes en el animal inmaduro. Esta observación experimental ha servido para atribuir carácter estrogénico a cualquier sustancia química esteroidea o no esteroidea, capaz de inducir el *estro*, independientemente de su estructura química o mecanismo de acción (Hertz, 1985).

Allen y Doisy demostraron, en 1923, que un extracto de tejido ovárico podía reproducir en la hembra ovariectomizada los fenómenos observados durante el *estro* (Allen y Doisy, 1923). Poco tiempo después, se descubrió que la orina de las mujeres embarazadas constituía una buena fuente de estrógenos, siendo la estrona el primer estrógeno cristalino aislado. Más tarde, se aislaron y caracterizaron el estradiol-17 β y el estriol, que completan la triada de estrógenos principales en la mujer (Witiak y Miller, 1991).

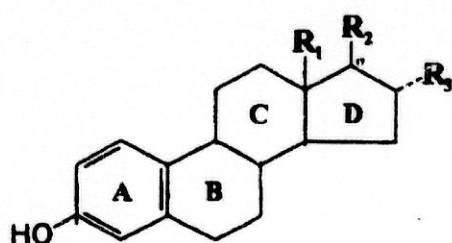
De los tres estrógenos humanos principales, el estradiol-17 β es el más potente y el principal producto de secreción del ovario, se oxida fácilmente a estrona, que a su vez puede hidratarse y pasar a estriol. Estas transformaciones tienen lugar principalmente en el hígado, donde hay interconversión libre entre la estrona y el estradiol (Murad y Haynes, 1986).

Los estrógenos se sintetizan especialmente en las células de la granulosa por aromatización de los andrógenos secretados por las células tecaes de los folículos en formación y del cuerpo amarillo. En la fase de máxima actividad del ciclo ovulatorio se alcanzan niveles secretores de estrógenos próximos a los 20 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{kg}$ peso, mientras que en el resto del ciclo la secreción es mucho más baja (1 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{kg}$ peso).

La formación de estrógenos no se limita a las gónadas, la placenta y las suprarrenales, pues tejidos periféricos como el hígado, tejido adiposo, el músculo esquelético y los folículos pilosos pueden generar cantidades significativas de estrógenos, particularmente estrona, a partir de androstendiona y testosterona. No es despreciable la producción de estrona en el tejido adiposo, sobre todo si se tiene en cuenta que este fenómeno aumenta con la edad del individuo y es de especial significación en personas obesas (Fernández y cols., 1998). La transformación de los precursores en estrona alcanza cifras de hasta 0,8 mg/día por Kg de peso en mujeres postmenopáusicas. En los adipocitos, el estradiol-17 β puede ser almacenado formando ésteres con los ácidos grasos de cadena larga. Adicionalmente, ha sido demostrada la presencia de receptores de estrógenos en este tipo de células, aunque su densidad es mucho más pequeña que en las gónadas (Szafran y Smielak-Korombel, 1998).

La producción de estriol se ve elevada durante el embarazo, siendo la unidad feto-placentaria la responsable de este proceso. Esto se debe, en parte, a la hidroxilación de estrona y estradiol-17 β en posición 16 α y a la conversión de la dihidroepiandrosterona y su sulfato en estriol (Kellie, 1971).

1.2.1 Estructura de los estrógenos naturales



	R ₁	R ₂	R ₃
Estradiol 17-β	-H	-OH	-CH ₃
Estrona	-H	=O	-CH ₃
Estriol	-OH	-OH	-H

Estructuralmente, los estrógenos naturales tienen en común un anillo insaturado (plano) con una función fenólica en la posición 3, que se identifica como anillo A, y otros tres anillos de seis (B y C) y cinco (D) carbonos que recuerdan la conformación básica del ciclopentanoperhidrofenantreno.

Clásicamente, se ha considerado que los requerimientos estructurales necesarios para que un compuesto químico tenga actividad estrogénica se resumen en: 1) un anillo fenólico insaturado A, con el carbono de posición 3 ligado a un grupo hidroxilo, 2) la existencia de un grupo cetónico o hidroxilo en el carbono 17 del anillo D y 3) un grupo metilo en posición angular unido al carbono 13, entre los anillos C y D (Leclercq y Heuson, 1979).

La importancia de la estructura de los anillos C y D es, sin embargo, menor ya que su ruptura, o la presencia de cadenas alifáticas saturadas, no conlleva pérdida de la actividad biológica (Allen y cols., 1936).

Es interesante resaltar que en distintas moléculas químicas con actividad estrogénica conocida se mantiene la distancia entre los carbonos 3 y 16-17. Así, a pesar de su aparente diversidad estructural, los potentes estrógenos sintéticos hexestrol o dietilestilbestrol (DES) muestran dicha similitud (Leclercq y Heuson, 1979), presentando dos grupos fenólicos, llamados anillo φ y φ', separados por una cadena hidrocarbonada. Estudios cristalográficos han demostrado, así mismo, la gran

similitud de los estrógenos sintéticos en configuración "trans" con el estrógeno natural estradiol-17 β . Posiblemente, esta estereoquímica es obligada para la unión del estrógeno a sus receptores específicos o proteínas celulares de interacción (Lewis y cols., 1995).

Las hormonas estrogénicas se metabolizan principalmente en el hígado y se excretan en su mayor parte como glucurónidos conjugados hidrosolubles. Pueden intervenir en este proceso catabólico otros tejidos, como el riñón e intestino, pero a diferencia del hígado, no contienen aparentemente sulfoquinasas esteroideas. Especial atención se ha prestado, por otra parte, a los derivados hidroxílicos, en posición 2 y 4, del estradiol-17 β y la estrona, que se conocen como catecolestrógenos (Lottering y cols., 1992), debido a su similitud estructural con las catecolaminas. Estos compuestos, que se transforman fácilmente en éteres metílicos por la acción del enzima catecol α -metiltransferasa, mantienen su carácter estrogénico en determinados modelos en cultivo (Schutze y cols., 1993), presentándose con mayor actividad mitógena que estradiol-17 β . Por otra parte, el derivado metílico 2-MeO-estradiol-17 β adquiere peculiares características que lo hacen tóxico para células estrógeno-dependientes (Lottering y cols., 1992).

Algunos compuestos no esteroideos sintéticos como los triarilalquenos y triarilalcanos, entre los que se encuentra el trifeniletileno o tamoxifén, han sido estudiados por su actividad antagonista estrogénica. El trifeniletileno une a su carácter de estrógeno débil, atribuido a su especial afinidad por el receptor del estradiol-17 β , un carácter antagonista probablemente debido a la presencia de la cadena lateral.

Se ha postulado, finalmente, que la actividad agonista y antagonista estrogénica está determinada por la inserción de cadenas sobresalientes en la estructura planar de la molécula del estradiol-17 β (Murphy y Sutherland, 1985). En este sentido la presencia de cadenas laterales alquil amino éter se acompaña casi invariablemente de la aparición de efecto antiestrogénico en el compuesto que la presenta.

1.2.2 Xenobióticos estrogénicos

Una de las acciones hormonales mejor documentadas atribuidas a algunos de los compuestos químicos disruptores endocrinos es la capacidad de mimetizar el efecto de los estrógenos, es decir la posibilidad de actuar como el estradiol- 17 β , la estrona y el estriol. A los compuestos químicos que mimetizan a los estrógenos naturales, identificados como contaminantes en tejidos y fluidos biológicos diversos de los seres vivos, se les denomina "xenobióticos estrogénicos" o "xenoestrógenos".

Los grupos químicos xenoestrógenicos mejor caracterizados son, hasta el momento presente, los siguientes:

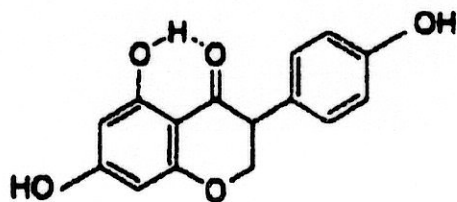
1.2.2.1 Fitoestrógenos y microestrógenos

A esta clase de disruptores endocrinos corresponde un grupo de sustancias naturales que se encuentran en algunas plantas superiores (fitoestrógenos) y en hongos (microestrógenos) y que presentan acción estrogénica en diferentes modelos experimentales y sobre la fauna.

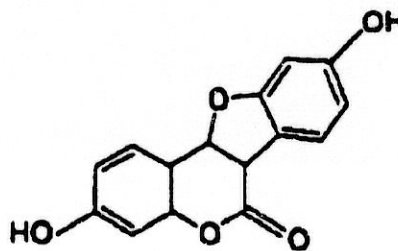
La potencia hormonal de estos compuestos naturales se conoce desde hace décadas (Bradbury y White, 1954) y está ilustrada por numerosos casos en los cuales su ingestión ha causado una alteración de la reproducción, a veces irreversible, en animales como es el caso de la "enfermedad del trébol" en ovejas, el "síndrome del maíz mohoso" en cerdos, y afecciones diversas en el guepardo y la codorniz (Kaldas y Hughes, 1989, Setchell, 1995).

Los fitoestrógenos presentan filiación química muy diferente: 1) cumestanos, como el cumestrol, 2) isoflavonas, como la genisteína, 3) dihidrochalconas, como el floretín, 4) lactonas del ácido resorcílico, como la zearalenona, y 5) otros compuestos como las saponinas de algunas plantas (diosgeninas), los esteroides (sitosteroides) y varios ácidos orgánicos (ácido podocárpico y giberélico) (Farsworth y cols., 1975).

La exposición humana a fitoestrógenos, y en menor grado a micoestrógenos, es significativa (Setchel, 1985; Adlercreutz 1995). La fuente más rica de fitoestrógenos para los humanos es la soja y los productos derivados de ésta, aunque otras legumbres son también una fuente potencialmente importante, sobre todo, en individuos vegetarianos (Knight y Eden, 1986).



CUMESTROL



GENISTEÍNA

La exposición a fitoestrógenos puede tener efectos en los humanos, entre los que destacan las alteraciones observadas en el ciclo menstrual de mujeres que consumen una dieta rica en soja (Cassidy y cols., 1994).

Adlercreutz (1995) ha publicado el posible papel de los fitoestrógenos en la protección frente a algunos tipos de cáncer, fundamentalmente los tumores estrógeno-dependientes, al observar una menor incidencia de cáncer estrógeno-dependiente en aquellas poblaciones que consumen una dieta rica en derivados de soja.

La diversidad estructural de los fitoestrógenos ha hecho necesaria la recopilación de observaciones medio ambientales y el uso de tests *in vivo* e *in vitro* para identificar su actividad hormonal. Diferentes tests *in vitro* han demostrado, por ejemplo, que algunos fitoestrógenos presentan una actividad estrogénica agonista a bajas concentraciones estimulando la proliferación de células de cáncer de mama y

la expresión de genes *reporter* bajo el control de elementos de respuesta a los estrógenos. A altas dosis por el contrario antagonizan el efecto de las hormonas naturales (Dees y cols., 1997).

En otro orden de cosas, Verna y cols. (1998) han mostrado, recientemente, la acción inhibitoria de las isoflavonas sobre el crecimiento de células de cáncer de mama inducido por xenoestrógenos tales como el o,p'-DDT y los alquilfenoles. Tales estudios han sugerido que los fitoestrógenos podrían ser inhibidores de la acción hormonal de los xenobióticos estrogénicos.

Otros efectos de los fitoestrógenos parecen no estar mediados por la interacción con el receptor estrogénico sino por su capacidad para intervenir en sistemas enzimáticos. Así por ejemplo, se ha demostrado la capacidad de los lignanos e isoflavonas de inhibir la aromatasas, que es la enzima que convierte la andostrenodiona en estrona, reduciendo la cantidad de estrógenos circulantes (Adlercreutz y Mazur, 1997). Además, estos fitoestrógenos parecen estimular la síntesis en el hígado de la proteína transportadora de las hormonas sexuales SHBG. Esto traería consigo una reducción en el efecto hormonal puesto que el incremento de SHBG implica una disminución en el porcentaje de estradiol libre circulante y por tanto una disminución de la actividad biológica de las hormonas sexuales (Adlercreutz y cols., 1987).

Por otra parte, la genisteína ha resultado ser un inhibidor de la tirosina quinasa (Akiyama y cols., 1987). Debido a que esta proteína juega un importante papel en la proliferación y transformación celular y en la expresión de oncogenes en los procesos de transformación maligna, debe tenerse en cuenta su acción cuando se estudian los efectos anticarcinogénicos de la genisteína y otros fitoestrógenos.

Recientemente, se han descrito otras propiedades para los fitoestrógenos como son su acción como antioxidantes, actividad antiangiogénica y la capacidad para inhibir la diferenciación celular inducida por xenoestrógenos diversos (Pazos y cols., 1998).

1.2.2.2 Pesticidas organoclorados

La actividad hormonal de algunos pesticidas organoclorados fue sugerida hace años al demostrarse mediante ensayos *in vivo* la capacidad de algunos de estos compuestos para interactuar con los receptores hormonales (Etgen, 1982; Williams y cols., 1989). Más tarde, fueron las observaciones sobre poblaciones animales las que ayudaron a identificar un efecto específico ligado a la acción hormonal, efecto probado en modelos animales y en bioensayos específicos de acción hormonal. El conocimiento de esta actividad hormonal ha fortalecido la hipótesis que liga la exposición a plaguicidas organoclorados y enfermedades estrógeno-dependientes (Wolff y Toniolo, 1995).

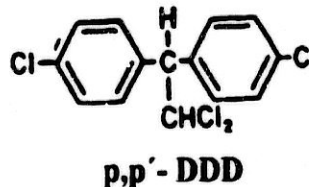
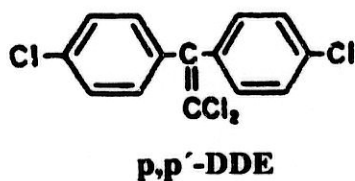
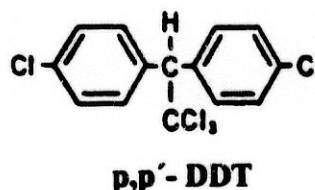
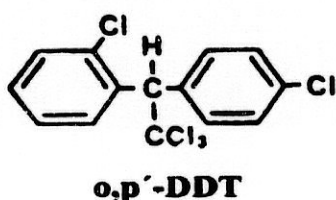
Cuando Paul Müller descubrió en 1933 las propiedades insecticidas del DDT se inició una revolución en el campo de la lucha contra las plagas y se abrió el camino para la incorporación a los tratamientos insecticidas de nuevos productos derivados de la síntesis orgánica (reducida hasta entonces a los productos "clásicos" y a unos pocos derivados de la química orgánica, con indicaciones muy limitadas). Aunque en este largo camino de la aportación de la química de síntesis puedan citarse bastantes precursores, lo cierto es que el advenimiento del DDT fue decisivo para el uso de tales derivados.

Probablemente, el carácter clorado del DDT indujo la búsqueda de materias activas con propiedades y estructuras similares, potenciándose así el uso de un conjunto de productos que ocupan un lugar de gran importancia en el total de pesticidas empleados. Propiedades notables de este grupo de pesticidas son su bajísima tensión de vapor ($1,5 \times 10^{-7}$ mm Hg) y una volatilidad muy escasa, lo cual unido a su poca sensibilidad a la luz ultravioleta, explica su notable persistencia ambiental.

Cuando en 1972 se prohibió el DDT para todo uso, excepto para la salud pública y algunas aplicaciones menores de protección de cosechas donde no había

INTRODUCCIÓN

otra alternativa, se habían empleado varios cientos de miles de toneladas del mismo en agricultura, silvicultura y usos específicos en programas de salud pública para el control del mosquito del tifus, la malaria y la fiebre amarilla. Actualmente, el DDT se emplea en países en vías de desarrollo, principalmente en programas de erradicación de la malaria. Estas indicaciones justifican por sí solas el hecho de que la producción mundial de DDT sea mayor en la actualidad que en el pasado (Sharpe, 1995).



El DDT comercial no es un producto puro sino que es una mezcla de isómeros entre los cuales el más abundante es el *p,p'*-DDT seguido del *o,p'*-DDT y cantidades variables de impurezas de síntesis. En relación con su composición, los datos experimentales publicados hasta la fecha no ofrecen lugar a dudas sobre la estrogenicidad del *p,p'*-DDT (Welch y cols., 1969; Bitman y Cecil, 1970; Soto y cols., 1995; Dees y cols., 1997) y del *o,p'*-DDT (Johnson y cols., 1988; Arnold y cols., 1996; Zava y cols., 1997; Brown y Lamartinieri, 1995; Alm y cols., 1998; Celius y Walther, 1998) aunque recientemente se ha atribuido al isómero *o,p'*-DDT propiedades antiandrogénicas (Sohoni y Sumpter, 1998).

El p,p'-DDT es el isómero más abundante a nivel medio ambiental (Shekhar y cols., 1997). Se metaboliza lentamente en los mamíferos a p,p'-DDE, p,p'-DDA y p,p'-DDD. También se ha identificado el p,p'-DDE como metabolito del p,p'-DDD en extractos de hígado de ratas alimentadas con p,p'-DDD (Fox y cols., 1998).

El p,p'-DDE es un metabolito del DDT al cual se le ha atribuido actividad estrogénica en organismos superiores (Soto y cols., 1995; Ren y cols., 1996) al igual que al isómero o,p'-DDE (Bitman y Cecil, 1970; Johnson y cols., 1992; Soto y cols., 1995). Por otra parte el p,p'-DDE aparece como un excelente competidor en el desplazamiento de la dihidrotestosterona por su enlace al receptor androgénico (Kelce y cols., 1995).

El DDT se degrada muy lentamente en el ambiente y se almacena en la grasa de los animales, debido a su liposolubilidad, por lo que sufre un proceso de biomagnificación en la cadena alimentaria acumulándose cantidades cada vez mayores del mismo en la materia grasa de los individuos. Debido a este proceso de magnificación, las especies en la cima de la cadena alimentaria deben verse más adversamente afectadas por su utilización.

Como el DDT atraviesa la placenta y su concentración en la sangre del cordón umbilical alcanza los mismos niveles que en la sangre de la madre expuesta al compuesto (Saxena y cols., 1981), parece claro que todos los nacidos desde mediados de la década de 1940 de mujeres expuestas al pesticida pueden haberlo acumulado en tejido adiposo.

Los niveles de DDE encontrados en los tejidos humanos pueden reflejar tanto la exposición temprana a DDT como la exposición directa al DDE medio ambiental, por ejemplo, a través de la comida. Cuando se analizan los niveles en sangre de DDT/DDE, expresados como cociente de ambas concentraciones, se obtiene un índice útil para evaluar el tiempo de exposición. Valores altos indican una exposición reciente al pesticida no degradado y valores bajos indican una exposición temprana o una exposición crónica a través de la cadena alimentaria. En general los niveles en

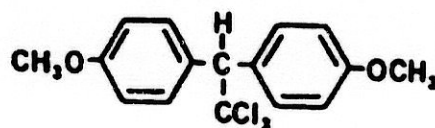
INTRODUCCIÓN

tejidos humanos de DDT/DDE están determinados por la exposición a través de la dieta, aunque la edad, el sexo, antecedentes de enfermedad y la lactancia son también elementos de influencia (Ahlborg y cols., 1995).

Debido a su fuerte lipofilidad se encuentran niveles altos de DDT y sus derivados en el tejido adiposo. Una serie de estudios han mostrado diferencias raciales en los niveles de DDT/DDE, con cantidades sustancialmente mayores en personas de raza negra, tanto en sangre como en tejido adiposo o leche (Ahlborg y cols., 1995). Las diferencias raciales no parecen estar relacionadas con los antecedentes de exposición y parecen reflejar otros factores medio ambientales no identificados o diferencias genéticas en el almacenamiento o metabolismo del DDT. Se ha sugerido, además, una diferencia significativa en los niveles circulantes de DDT entre hombres y mujeres siendo éstos más elevados en el género masculino, fenómeno que puede reflejar la excreción, vía lactancia del compuesto y otras diferencias sexuales entre almacenaje o metabolismo (Kutz y cols., 1991).

Es interesante hacer notar que ya en 1949, Singer estableció la primera asociación conocida entre la exposición de trabajadores expuestos a pesticidas y disfunciones reproductoras, al presentar la sospecha de relación de causalidad entre la oligospermia observada en aviadores-fumigadores y el empleo habitual de DDT entre los productos de uso habitual en su trabajo diario (Singer, 1949). En numerosos estudios se ha buscado, por otra parte, una asociación significativa entre exposición a DDT y/o sus metabolitos y un mayor riesgo de padecimiento de cáncer de mama siendo contradictorios en sus conclusiones (Krieger y cols., 1994; Hunter y cols., 1997; van't Veer y cols., 1997; López Carrillo y cols., 1997; Olaya-Contreras y cols., 1998).

El Metoxicloro es otro pesticida organoclorado de interés en este trabajo que tiene un espectro de toxicidad para los insectos más limitado que el DDT y presenta la ventaja de ser menos tóxico para los mamíferos. El metoxicloro ha demostrado ser útil para el control de las plagas domésticas, tales como mosquitos, moscas y polillas, las plagas del ganado como moscas y piojos, el escarabajo mejicano de las judías, y una gran variedad de insectos que atacan las frutas, verduras y cosechas de forraje.



METOXICLORO

Una ventaja adicional del empleo del metoxicloro sobre otros pesticidas es su más rápido metabolismo y mayor biodegradabilidad en los organismos animales. En el caso concreto de los animales de sangre caliente, el metoxicloro se detoxifica por desmetilación, lo cual parece contribuir a la reducción de los efectos crónicos inducidos por respecto de los observados para otros hidrocarburos clorados.

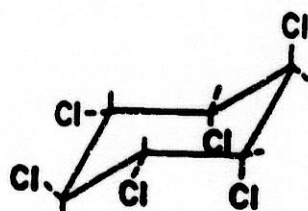
El metoxicloro presenta actividad proestrogénica, es decir necesita ser activado *in vivo* o alternativamente *in vitro* usando microsomas hepáticos (Stresser y cols., 1998) para la génesis del metabolito activo. Su actividad hormonal estrogénica ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* (Bulger y cols., 1978; Cummings y Metcalf, 1994, 1995; Vom Saal y cols., 1995). Cuando se administra *in vivo* produce efectos adversos sobre la fertilidad y sobre la actividad uterina en hembras (Ousterhout y cols., 1981). También se han descrito efectos adversos en animales machos (alteración del comportamiento sexual) expuestos intraútero (Cummings, 1997).

Debido a que no está completamente determinado si los efectos en la función reproductora del metoxicloro son debidos a una acción agonista o antagonista hormonal, Hall y colaboradores (1997) estudiaron los efectos de este pesticida sobre la implantación y el desarrollo del embrión en ratones y llegaron a la conclusión de que el metoxicloro actúa como agonista estrogénico a nivel del útero y oviducto pero presenta una acción antiestrogénica en el ovario. Por otra parte, parece que el metoxicloro altera la preimplantación normal, por lo que se sugiere la necesidad de más estudios para conocer su mecanismo de acción.

El hexaclorociclohexano o HCH sigue en historia y popularidad al DDT entre los pesticidas organoclorados. Fue desarrollado en 1940 y usado en el control de la malaria. El HCH técnicamente empleado no es un producto puro, ya que contiene entre un 65-70% de α -HCH, 7-10% de β -HCH, 14-15% de γ -HCH y un 10% de otros isómeros y compuestos. El valor insecticida del HCH radica en el contenido en su isómero γ y que es 100-1000 veces más tóxico para los insectos que cualquier otro de los isómeros. No obstante, α -HCH y β -HCH aunque menos potentes son más estables por lo que permanecen como contaminantes medio ambientales durante más largo tiempo.

El lindano contiene un 99 % de γ -HCH y fue introducido en 1950 como insecticida de amplio espectro (Ahlborg y cols, 1995). El empleo del lindano reporta ciertas ventajas frente a los otros isómeros. Por ejemplo, es más deseable porque no tiene el olor a moho y es menos tóxico para los mamíferos que los demás isómeros. Es activo contra una amplia variedad de insectos, garrapatas y ácaros y generalmente es eficaz a dosis menores que el DDT. El lindano se emplea también en aerosoles domésticos, en polvos para animales y para el control de plagas en las frutas y verduras. Tanto la pomada como la loción de lindano son oficiales en la farmacopea

de Europa y los Estados Unidos (U.S.P.XX) con aplicaciones pediculicidas y escabicidas.



LINDANO

La exposición humana a lindano ocurre a través de inhalación, absorción dérmica e ingestión. Dick y cols. (1997) han estudiado la absorción percutánea y la distribución en piel del lindano encontrando altos niveles del producto en la *stratum corneum* después de 6 horas de exposición, tiempo transcurrido el cual decrece la concentración cutánea del compuesto (90 % del valor máximo a las 24 horas). La causa de este descenso fue atribuida a la absorción a través de la piel, y paso a la circulación sistémica.

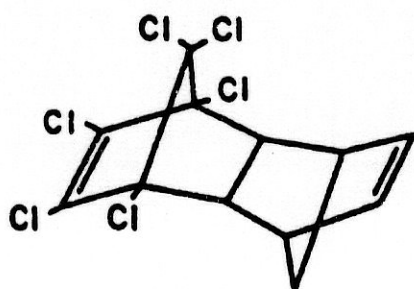
La estrogenicidad del lindano se ha demostrado en diferentes ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Cooper y cols., 1989; Soto y cols., 1995; Celius y Walther, 1999). Recientemente, se ha demostrado también su actividad como antagonista de la progesterona (Jin y cols., 1997).

Los derivados del dimetanonaftaleno son un grupo de pesticidas muy homogéneos entre sí que están formados por los predecesores, aldrín y isodrin y sus epóxidos, dieldrin y endrin.

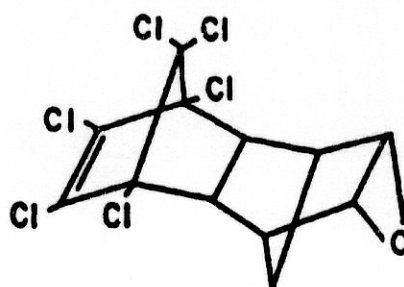
Propiedad común a todos ellos es su gran persistencia y su identidad de comportamiento biológico al ser transformados en epóxidos. Se trata de compuestos muy solubles en lípidos, que se almacenan en el tejido adiposo, se degradan

INTRODUCCIÓN

lentamente y persisten en el medio sufriendo biomagnificación a través de la cadena alimentaria de los animales. Su presencia en forma de residuo en alimentos y medio ambiente ha sido perfectamente comprobada después de algunos años de uso, señalándose la circunstancia de que los suelos orgánicos retienen mayor cantidad de compuestos que los arenosos (Valenzuela, 1996). En el momento actual no aparecen formulas comerciales en nuestro país que contengan estos principios activos.



ALDRÍN



DIELDRÍN

Diferentes estudios han documentado los efectos hormonales *in vitro* del aldrín (Soto y cols., 1995), dieldrín (Sonnenschein y cols., 1995; Soto y cols., 1995; Arnold y cols., 1996; Ramamoorthy y cols., 1997) y endrín (Soto y cols., 1995). En un estudio reciente (Lamai y cols., 1999) se han ensayado los efectos *in vivo* del dieldrín en *Clarias gariepinus*, que es un tipo de pez africano, demostrándose que la exposición de los individuos adultos durante 30 días ocasiona acumulación en los tejidos, especialmente en el hígado, obteniéndose un factor de bioconcentración relativo a la concentración inicial de 900. La exposición crónica disminuye el crecimiento de los animales expuestos y presenta un claro efecto negativo sobre el potencial reproductivo de las hembras maduras.

Los derivados del biciclohepteno presentan una doble relación con el anterior grupo de organoclorados debido a que se conserva en ellos la estructura del anillo bicíclico hexagonal no saturado y por obtenerse a través de síntesis diénica (Soto y cols., 1994). Dentro de este grupo se encuentran el clorbiclen, bromociclen, isobenzán y endosulfán. Este último es el único que ha alcanzado un amplio uso como producto fitosanitario, siendo el pesticida más vendido actualmente dentro del grupo de los organoclorados. La producción de endosulfán en 1992 fue de 10.000 toneladas métricas. La figura 1.1 ofrece un resumen de las vías de transformación de este pesticida en medio ambiente, plantas y microorganismos y animales superiores.

El efecto hormonal del endosulfán se sospechó al observar atrofia testicular y una caída de los niveles de testosterona en ratas y ratones expuestos al mismo (Maier-Bode, 1968; Gupta y Gupta, 1979). El endosulfán tiene efecto estrogénico en líneas celulares humanas estrógeno-sensibles (Soto y cols., 1994). También se ha demostrado que el endosulfán se une al receptor de estrógenos e induce la síntesis y secreción de proteínas estrógeno-inducidas (Soto y cols., 1995) y mimetiza el efecto estrogénico en muy diversos modelos *in vitro* e *in vivo* (Andersen, 1999). Un estudio más reciente ha probado que el tratamiento con endosulfán induce actividad beta-galactosidasa en levaduras transfectadas con el receptor estrogénico humano y de ratón (Ramarmoorthy y cols., 1997). Se han atribuido también al endosulfán actividades hormonales distintas de la estrogenicidad, al ser un buen competidor para el receptor de progesterona (Vonier y cols., 1996). Otro estudio reciente ha sugerido que el endosulfán disminuye la actividad de la progesterona por un mecanismo independiente del receptor (Jin y cols., 1997).

INTRODUCCIÓN

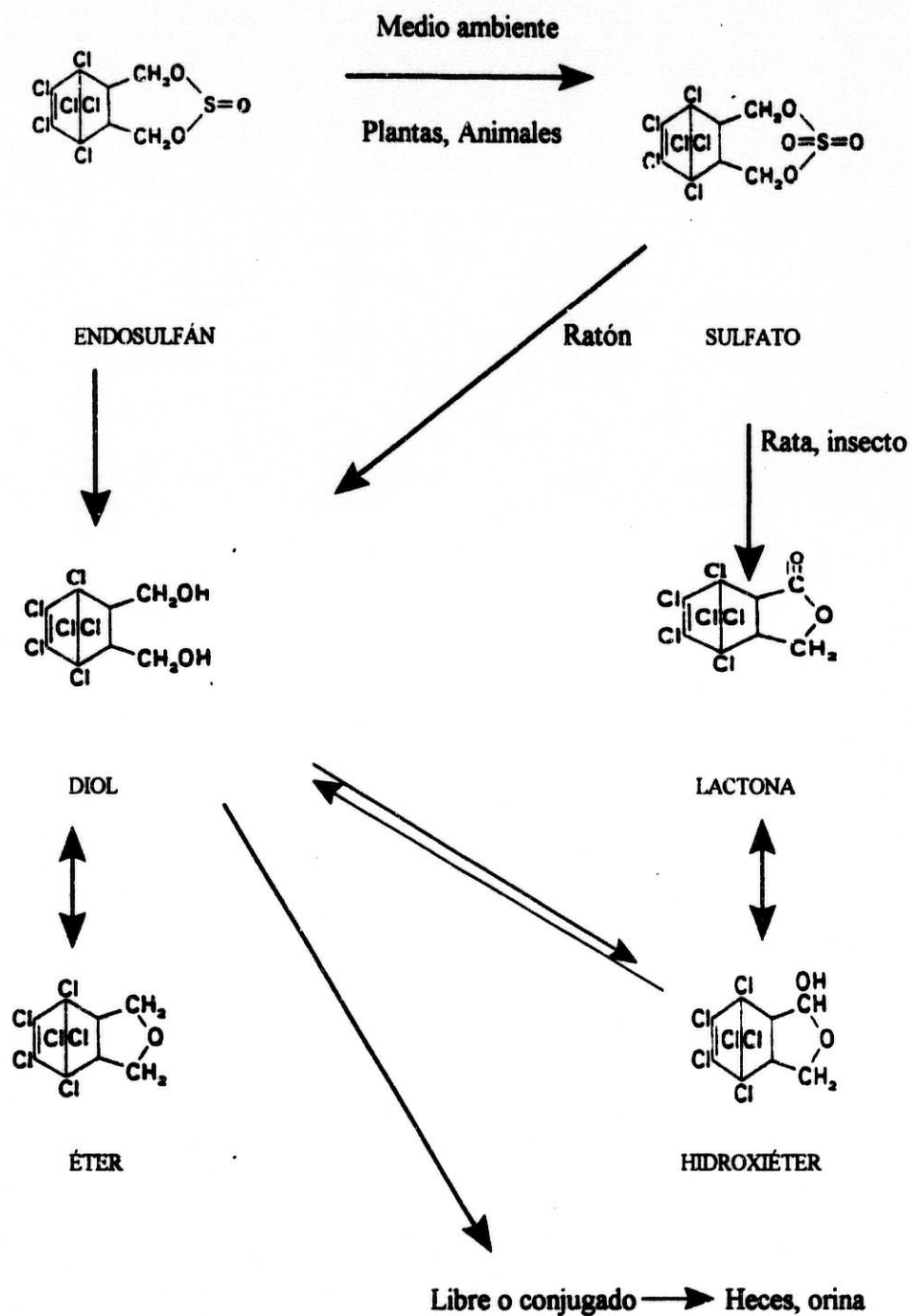
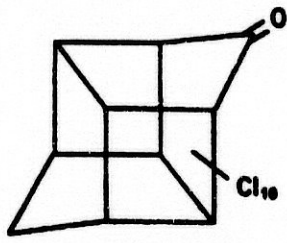
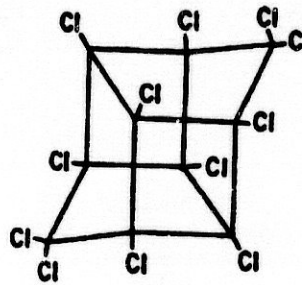


Fig 1.1: Metabolismo de endosulfán

Los derivados del pentaclorociclododecano constituyen otro grupo de pesticidas organoclorados de interés para este trabajo de los cuales la kepona y el mirex han sido utilizados en EEUU y otros países, aunque actualmente están restringidos.



KEPONA



MIREX

Pequeñas cantidades de kepona pueden encontrarse en el mirex como impurezas. Ambos compuestos son altamente estables, lipofílicos y se excretan lentamente y sin modificaciones metabólicas. Por lo tanto, se trata de insecticidas que sufren biomagnificación y se concentran miles de veces en la cadena alimentaria (Ahlborg y cols., 1995). Probablemente, el mirex se oxida a kepona. El principal metabolito de este último es el alcohol kepona, que aparece en la bilis humana en forma de conjugado de ácido glucurónico. La vía principal de eliminación de la kepona son las heces. En el hombre, únicamente del 5 al 10 % de la kepona que se excreta por la bilis aparece en las heces, lo cual indica la gran reabsorción intestinal (Ahlborg y cols., 1995).

El comportamiento biológico de los pesticidas kepona y mirex ha sido estudiado ampliamente (Brown y cols., 1991; Soto y cols., 1994; Flouriot y cols., 1995). La kepona es incluso más potente que el *o,p'*-DDT en la unión al receptor de estrógenos *in vitro* y tiene actividad uterotrópica *in vivo*, actuando además sobre el proceso de implantación embrionaria en ratas preñadas (Johnson y cols., 1992). Se ha demostrado, además, que la kepona produce un estado de *estro* permanente en ratones hembra, suprime la espermatogénesis en ardillas macho y produce

hipertrofia de los oviductos en la ardilla hembra (Hammond y cols., 1979), entre otros efectos estrogénicos.

Existen datos interesantes acerca de los efectos sobre la reproducción en humanos de la kepona procedentes de accidentes industriales con exposición masiva al pesticida. Así en Hopewell (Virginia, EEUU) 76 trabajadores de una fábrica de kepona sufrieron trastornos neurológicos además de una disminución significativa en la calidad y cantidad del semen eyaculado que presentaba espermatoцитos con una motilidad reducida. La contaminación del área vecina a la planta de fabricación tuvo consecuencias medio ambientales fundamentalmente sobre los peces y mariscos del río James que se extendieron paulatinamente a toda la bahía de Chesapeake (Taylor y cols., 1978).

1.2.2.3 Bisfenoles

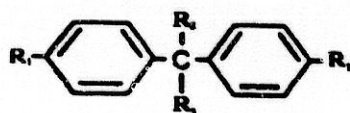
Otro grupo de compuestos químicos de interés para los objetivos de este estudio son los monómeros de plásticos y polímeros sintéticos. Estos compuestos fueron descritos como mimetizadores estrogénicos en 1936 cuando Dodds y Lawson demostraron que la administración de bisfenoles a ratas ovariectomizadas ocasionaba cornificación vaginal e incremento del peso uterino (Dodds y Lawson, 1936). Con posterioridad, Reid y Wilson (1944) confirmaron estas observaciones, que fueron definitivamente presentadas en diferentes trabajos experimentales (Krishnan y cols., 1993; Brotons y cols., 1995; Sumpter y Jobling, 1995; Olea y cols., 1996; Feldman, 1997). La tabla 1.2 presenta la estructura química de algunos de los bisfenoles analizados en este trabajo.

El uso de los bisfenoles en el sector industrial está generalizado. La producción global de bisfenol-A (BFA) en 1996 fué de más de 600.000 Tm, siendo la producción europea del orden de 200.000. Uno de los polímeros mencionados, conocido como resina epoxi y que contiene entre sus componentes BFA, se utiliza en

gran variedad de productos. Se trata de polímeros transparentes, que presentan buena resistencia mecánica y conservan la forma en un margen de temperaturas comprendido entre -60° C y +150 °C. Se emplean en la elaboración de bolsas esterilizables, en el recubrimiento de latas de conserva, como finalizadores de material de albañilería, material marino, envoltura para estructuras, cobertura de tanques, barnices de maderas y suelos, tintas de impresión, como base del composite dental y en numerosas aplicaciones ortopédicas. También se emplean como aditivos de otros materiales plásticos como resinas vinílicas y acrílicas y en gomas naturales y sintéticas. Por último los bisfenoles se utilizan como materia prima para la elaboración de otros plásticos como el policarbonato (que ha llegado a ser el líder en la ingeniería del plástico). Se ha demostrado, también, la presencia de BFA en alimentos, productos manufacturados (Brotons y cols., 1995) y fármacos (Olea y cols., 1996, Pulgar y cols., 1999), por lo que el riesgo de exposición humana es considerable.

La estrogenicidad *in vitro* de un amplio grupo de bisfenoles ha sido estudiada recientemente. De forma resumida se ha podido enunciar que : 1) la presencia de grupos cetónicos en el carbono central y el enlace éter y éster en los grupos hidroxilo terminales se acompaña de una pérdida importante de estrogenicidad, 2) la sustitución de los hidrógenos del carbono central por cadenas hidrocarbonadas (p.e., propilo) origina un aumento importante de la capacidad hormonal estrogénica. (Pérez y cols., 1997). BFA y su dimetacrilato han mostrado ser igualmente eficaces en una batería de tests de estrogenicidad (Andersen, 1999), por lo que no cabe duda de su consideración como xenobióticos estrogénicos.

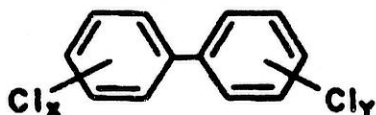
Tabla 1.2: Estructura de los bisfenoles



Producto	R ₁	R ₂	R ₃
BFA	-OH	-CH ₃	-CH ₃
BFF	-OH	-H	-H
Bis-GMA	-OCH ₂ CHCHOH- CH ₂ OOC-C(CH ₃)=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃
Bis-DMA	-OOC-C(CH ₃)=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃
BFACF	-OOCCL	-CH ₃	-CH ₃
BADGE	-OCH ₂ -CH-CH ₂ O	-CH ₃	-CH ₃
BFA-EDA	-OCH ₂ -CH ₂ -COO- CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃
E-BFA	-OCH ₂ -CH ₂ OH	-CH ₃	-CH ₃
P-BFA	-OCH ₂ -CHOH-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
MM1	-OH	-CH ₃	-H
MM2	-OH	-C ₂ H ₅	-H
MM3	-OH	-C ₂ H ₅	-CH ₃
MM4	-OH	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅
MM5	-OH	-C ₃ H ₇	-C ₃ H ₇
MM6	-OH	-CH ₃	-CH ₃
MM7	-OH	-CF ₃	-CF ₃
MM8	-OH	=O	-
MM9	-OH	-CH ₂ OH	-CH ₃

1.2.2.4 Bifenilos policlorados (PCBs)

Los bifenilos policlorados son una serie de 209 congéneres de hidrocarburos clorados aromáticos que fueron diseñados para uso comercial en 1930 (Ahlborg y cols., 1995). Dichos compuestos no son inflamables y son sumamente estables, siendo resistentes a los ácidos, a las bases, al agua, a altas temperaturas y a la corriente eléctrica. Debido a estas propiedades, los PCBs encontraron un importante mercado en la industria eléctrica. Otras industrias empezaron a utilizar PCBs como lubricantes, fluidos hidráulicos, aceites aislantes y líquidos selladores. Con el tiempo, estas sustancias han encontrado aplicación en una gran cantidad de productos de consumo. Por ejemplo los PCBs hacen ignífugos la madera y el plástico, protegen y conservan el calzado de goma y han entrado a formar parte de los ingredientes de pinturas, barnices, tintas y plaguicidas.



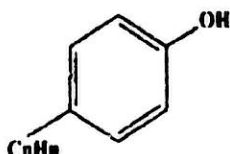
PCBs

En 1976, se prohibió en EE.UU. la fabricación de PCBs. Otros países siguieron el ejemplo algo más tarde. Sin embargo, en medio siglo de producción, la industria química mundial ha generado más de un millón y medio de toneladas de PCBs una gran parte de las cuales se ha liberado ya al medio ambiente. La prohibición, por otra parte, no se aplicó a los PCBs ya existentes cuyo uso ha continuado hasta nuestros días formando parte de sistemas "cerrados" como transistores, aislamientos eléctricos y otros aparatos pequeños.

La toxicidad de los PCBs, considerados individualmente, es dependiente de la estructura química y alguno de sus congéneres ha demostrado poseer actividad mutagénica o antiestrogénica (Bitman y Cecil, 1970; Ecobichon y Mackenzie, 1974; Soto y cols., 1995; Netsaretman y cols., 1996; Topari y cols., 1996; Shekhar y cols., 1997). El metabolismo de los PCBs comienza con la hidroxilación, la cual origina hidroxibifenilos que son estrógenos más potentes *in vitro* que los PCBs nativos (Korach y cols., 1988).

1.2.2.5 Alquilfenoles y derivados

Este grupo de xenoestrógenos se viene empleando ampliamente desde el decenio de 1940. Los alquilfenoles polietoxilatos se clasifican como surfactantes no iónicos y tienen una amplia utilización en la formulación de detergentes. Los compuestos más utilizados son los nonilfenol etoxilatos (White y cols., 1994).



ALQUILFENOL

Mediante la biodegradación medio ambiental, incluidos los tratamientos de aguas se producen alquilfenoles y alquilfenoletoxilatos de cadena corta, que son más persistentes que los compuestos de los cuales proceden y se pueden acumular en la cadena alimentaria. Este hecho ha dado lugar a que este tipo de surfactante sea el más estudiado en los análisis medio ambientales (Voogt y cols., 1997). Otro uso de esta clase de compuestos es su empleo como aditivos de plásticos. Ejemplo de ello es la adición de nonilfenol al poliestireno con objeto de dar a éste mayor estabilidad y prevenir su decoloración. Los alquilfenoles se utilizan también como aditivos del

petróleo, espermicidas en condones, material inerte en pesticidas y en la formulación de algunos champús y cosméticos (Miller y Sharpe, 1998).

Los alquilfenoles con cadena alquílica de C-4 a C-12 presentan efecto estrogénico. Este hecho se describió a partir de la identificación del nonilfenol como componente de los tubos de plásticos utilizados en laboratorio para contener muestras biológicas (Soto y cols., 1991). El nonilfenol se reveló pronto como inductor de proliferación celular de líneas estrógeno- dependientes (MCF-7) y manifestó, además, efecto mitótico en útero de ratas. De otra parte, grupos de investigación ingleses (Jobling y cols., 1995; Sumpter y Jobling, 1995) han demostrado la capacidad de estos derivados para estimular la expresión génica de la vitelogenina de los hepatocitos de truchas y ratas. El más potente de estos productos muestra un efecto similar al estradiol-17- β en niveles de concentración 1000 veces superiores a los de la hormona. La relación entre estrogénicidad y posición y ramificación de la cadena alquílica se ha establecido usando un sistema de screening *in vitro* (Routledge y Sumpter, 1997).

Los alquilfenoles son contaminantes habituales, en concentraciones elevadas y persistentes, en el agua de los ríos (Nimrod y Benson, 1996; Castillo y Barceló, 1997) y, en concentraciones menores, en el agua de bebida (Clark y cols., 1992; Castillo y Barceló, 1997).

1.2.2.6. Otros

Recientemente se ha descrito actividad estrogénica para algunos ftalatos. Esta clase de productos químicos se usan como plastificantes para dar durabilidad y flexibilidad a materiales plásticos como los PVCs. Además pueden ser empleados como ingredientes en muchas formulaciones de productos tales como pinturas, tintas, adhesivos y perfumes.

Entre los ftalatos con actividad estrogénica encontramos el butilbencilftalato (Soto y cols., 1995; Sharpe y cols., 1995), difenilftalato (Jobling y cols., 1995; Soto y cols., 1995) y di-n-butilftalato (Jobling y cols., 1995; Soto y cols., 1995). Publicaciones recientes han demostrado que este último compuesto puede ejercer efectos antiandrogénicos en crías macho de ratas expuestas durante la gestación y lactación (Wine y cols., 1997).

Entre los compuestos con actividad estrogénica recientemente descubierta se encuentran antioxidantes como el butilhidroxianisol (Jobling y cols., 1995; Soto y cols., 1995) y conservantes como los parabenos (Routledge y cols., 1998). Ambos se emplean en el procesado de alimentos y los segundos también en perfumería.

1.2.3 Presencia de xenoestrógenos en seres vivos

Las formas de exposición y las vías de entrada de los contaminantes hormonales son muy diversas, pero debido a su acumulación en la cadena alimentaria, la vía digestiva es la principal ruta de exposición para el hombre. Tanto es así que la composición de las mezclas lipofílicas encontradas en los tejidos humanos varía de acuerdo con las diferencias regionales en el uso de estos compuestos y con los hábitos dietéticos de las poblaciones expuestas (Woodruff y cols., 1994).

Para la mayoría de los productos químicos descritos hay un patrón de incremento de la carga corporal con la edad. Ello es probablemente la consecuencia de tres factores (Ahlborg y cols., 1995):

1. La acumulación de los productos a través del tiempo.
2. La mayor exposición en personas de mayor edad debido a que vivieron en periodos de gran uso de derivados organoclorados.
3. El metabolismo más lento y la imposibilidad de detoxificación a través de lactancia o embarazo en individuos de mayor edad.

Los estudios epidemiológicos y medio ambientales necesarios para determinar la exposición humana y animal a xenoestrógenos utilizan dos aproximaciones: 1) medida directa y 2) la medida indirecta de la exposición. La medida de exposición con carácter retrospectivo en estudios epidemiológicos se ha basado, tradicionalmente, en métodos indirectos tales como el uso de cuestionarios, o la revisión de datos de archivo que reconstruyen la exposición en el pasado a las sustancias en estudio. Un ejemplo de esta situación son los trabajos que relacionan la exposición a DDT con el cáncer de páncreas, realizados mediante el análisis de los datos recogidos en archivos y entrevistas personales (Garabrant y cols., 1992).

Mediante la medida directa se determina la presencia de los productos químicos o de sus metabolitos en muestras de tejido. Como la mayor parte de los xenoestrógenos presentan carácter lipofílico y son relativamente persistentes, la medida directa puede ser utilizada con confianza para estimar exposiciones pasadas. La evaluación de la relación existente entre contenido de organoclorados en el tejido adiposo y cáncer de mama es un buen ejemplo de ello (Falck y cols., 1992; Mussalo-Rauhamaa y cols., 1990; Wolf y cols., 1993; Krieger y cols., 1994; Hunter y cols., 1997; Van't Veer y cols., 1997; López Carrillo y cols., 1997; Güttes y cols., 1998; Olaya-Contreras y cols., 1998; Moysich y cols., 1998; Helzlsouer y cols., 1999)

La elección del compartimento tisular que debe ser utilizado para la medida directa tiene que considerar la toxicocinética del compuesto a investigar. En general, el tejido de origen de la muestra biológica objeto de estudio debe ser accesible, ésta debe contener niveles del producto químico representativos de la carga corporal acumulada y el compuesto analizado debe estar presente en todas las personas estudiadas. Por otra parte, el compartimento biológico elegido debe ser consistente con la patogenia establecida en el desarrollo de la enfermedad subyacente (Woodruff y cols., 1994).

Debido a la lipofilia de muchos de los xenoestrógenos descritos, los compartimentos comunmente empleados para estimar la carga corporal de los mismos son los que tienen un significativo componente lipídico: tejido adiposo (80%), suero (1%) y leche (2-4%). Otros compartimentos como fluidos de quistes mamarios (Blackwood y cols., 1998), cordón umbilical (Rhainds y cols., 1999), hígado y pulmón (Weistrand y cols., 1997) han sido investigados como medios potenciales de medida. En general, los niveles de contaminantes lipofílicos son cerca de 10 veces más altos en el tejido adiposo que en la leche y de 100 a 350 veces más altos en tejido adiposo que en sangre, razón que justifica que el tejido adiposo sea el compartimiento de elección para la medida de estos productos.

El tejido adiposo ha sido usado para determinar niveles de organoclorados en estudios epidemiológicos de morbilidad y mortalidad por cáncer (Wassermann y cols., 1976; Unger y cols., 1984; Mussalo-Rauhamaa y cols., 1990, Falck y cols., 1992; Dewailly y cols., 1994; Van't Veer y cols., 1997; Stellman y cols., 1998). La distribución de los organoclorados desde el tejido adiposo a otros tejidos se realiza a través del torrente circulatorio, siendo las concentraciones en cada tejido dependientes de su contenido en lípidos (Brown y Lawton, 1984; Needham y cols., 1990; Kahn y cols., 1988). La tabla 1.3 muestra de forma resumida los niveles de organoclorados encontrados en el tejido adiposo humano.

El suero es el compartimento corporal más accesible para cuantificar la carga global de organoclorados. Como consecuencia de la exposición se produce una absorción inicial de los distintos compuestos que hace que en sangre sean más elevados que en el tejido adiposo (Woodruff y cols., 1994). Una vez alcanzado el equilibrio, los niveles en sangre reflejan el contenido en contaminantes del tejido adiposo, pues una vez liberados de éste pasan al torrente sanguíneo y resultan metabolizados en el hígado o reabsorbidos por la grasa (Jones y cols., 1989).

Tabla 1.3: Niveles de pesticidas organoclorados en tejido adiposo humano

Referencia	Lindano	Dieldrin	Mirex	p,p'-DDE	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Endosulfán
Tite y cols., 1982 (µg/g muestra)	0,0862	-	-	3,5393	0,2670	0,9316	-
Okond'Aboka y cols., 1984	0,0400	-	-	9,6500	0,7000	4,1100	-
Guy y cols., 1986 (µg/g lípido)	ND	0,0036	0,0027	3,2560	-	0,0159	-
	ND	0,0043	0,0011	2,5570	-	0,0128	-
Frank y cols., 1988 (µg/g lípido)	ND	0,0250	-	2,2400	-	-	ND
	ND	0,0320	-	2,9200	-	-	ND
Williams y cols., 1991 (µg/g muestra)	-	-	-	-	-	-	-
Dewailly y cols., 1994 (µg/g muestra)	-	-	-	0,7650	-	-	-
	-	-	-	0,6080	-	-	-
	-	-	-	2,1320	-	-	-
López-Carrillo y cols., 1996 (µg/g lípido)	-	-	-	0,0060	-	-	-
van't Veer y cols., 1997 (µg/g muestra)	-	-	-	1,3500	-	-	-
	-	-	-	1,5100	-	-	-
Weistrand y cols., 1997 (µg/g lípido)	-	-	-	0,7070	-	-	-
Gütes y cols., 1998 (µg/g muestra)	-	-	-	0,8280	-	0,0350	-
	-	-	-	0,5580	-	0,0240	-

* ND: no detectado * -: no mencionado en el trabajo * ER+: receptor estrogénico positivo * ER-: receptor estrogénico negativo

No obstante, el empleo de muestras de suero para la determinación de organoclorados tiene algunas limitaciones, la más importante de las cuales es que su bajo porcentaje en lípidos reduce la concentración de los productos lipofílicos a valores cercanos, en ocasiones, al límite de detección del método analítico. En cualquier caso, el cálculo del contenido corporal de xenoestrógenos debe ser realizado tomando como base la concentración de lípidos en la muestra sérica con objeto de estandarizar la estimación de la carga corporal y mejorar la comparación entre las medidas de tejido adiposo, sangre y suero (Akins y cols., 1989).

Es importante hacer notar, a este respecto, que la correlación entre los niveles de pesticidas organoclorados y la mayoría de los PCBs medidos en suero y tejido adiposo alcanza frecuentemente una alta significación estadística. Por esta razón, tanto el suero como el tejido adiposo pueden ser utilizados para hacer una estimación directa de exposición (Archibeque y cols., 1997; Stellman y cols., 1998). En resumen, la mayor limitación viene impuesta por la dificultad de obtención de la muestra de tejido para el caso del tejido adiposo y la presencia de niveles bajos de contaminantes en sangre respecto a grasa si la medida se realiza sobre la muestra sérica.

La leche materna puede ser también un indicador útil de exposición de la madre y el niño. Su contenido en lípidos es mayor que el de otros compartimentos corporales y la obtención de una muestra biológica para la medida es relativamente fácil (Sim y McNeil 1992). Estas ventajas han servido para que, en numerosos estudios, se utilice la presencia de contaminantes en leche materna como marcador de exposición a xenoestrógenos (Ejobi y cols., 1998; Schade y cols., 1998).

Por último, es necesario resaltar que con objeto de obtener una medida correcta de exposición, es necesario considerar los resultados experimentales obtenidos dentro del marco de factores que afectan a la toxicocinética de las sustancias a medir. Estos factores deben estar presentes tanto en el diseño del estudio como en el método de análisis de los datos. Por ejemplo, la edad del sujeto estudiado, cambios importantes en el peso corporal (adelgazamiento y ganancia de peso

rápidos), la vida media del compuesto o compuestos a estudiar y la exposición profesional son elementos que deben ser tomados en cuenta a la hora de la determinación junto a otros factores de riesgo propios de la enfermedad.

1.3 DISRUPTORES ENDOCRINOS ESTROGÉNICOS Y ENFERMEDAD

En la etiología de determinadas enfermedades como el criptorquidismo, la esterilidad o determinados cánceres hormono-dependientes, se ha identificado un importante componente hormonal. A pesar de que el mecanismo exacto de intervención de las hormonas en la patogenia de estas enfermedades no es bien conocido, lo cierto es que tanto los estudios epidemiológicos como los datos generados en la clínica asignan a las hormonas un papel capital tanto en la génesis del del proceso como en su evolución una vez establecido éste.

La hipótesis de los disruptores endocrinos como posible causa de algunas enfermedades es difícilmente demostrable debido a múltiples razones, entre las que destacan (Miller y Sharpe, 1998) : 1) la baja potencia hormonal de estos agentes comparada con la de las hormonas naturales, 2) la falta de información sobre los efectos combinados de los disruptores, 3) el desconocimiento de la actividad biológica de los disruptores endocrinos sobre distintos órganos, y 4) el intento de asociarlos con enfermedades de causa multifactorial y presentación transgeneracional, manifestadas, en muchos casos, en forma de fracaso funcional parcial de alguna actividad orgánica.

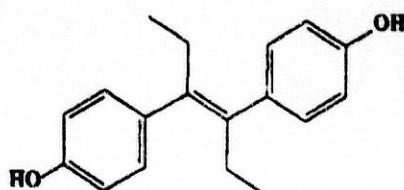
Entre las enfermedades humanas en las que se sospecha el papel etiológico de los contaminantes medio ambientales se encuentran el cáncer, los defectos congénitos, las alteraciones del sistema inmune, la disminución del coeficiente de inteligencia, la disminución de la fertilidad, la alteración del balance de las hormonas sexuales, las alteraciones de diversa índole del metabolismo y las disfunciones hormonales, en general.

La exposición a compuestos químicos con actividad hormonal no tiene por qué originar idéntica repercusión sobre todos y cada uno de los individuos expuestos. De hecho, la edad del individuo en el momento de la exposición a los contaminantes hormonales es crítica para el desarrollo de las alteraciones enunciadas (Colborn y cols., 1993). Entre todas las fases de la vida del individuo, la etapa embrionaria y la primera infancia son críticas para los efectos de la exposición. En efecto, la exposición uterina, transplacentaria tiene consecuencias de gran magnitud que no es posible poner en evidencia en estudios realizados sobre individuos adultos (Olea y Olea-Serrano, 1996). Al menos, así lo han demostrado la experimentación animal y algunos casos muy concretos de investigación sobre humanos.

La exposición del feto a agentes con actividad endocrina --agonista o antagonista-- puede alterar profundamente el proceso de diferenciación de órganos. Así, el desarrollo de anomalías en la descendencia, atribuible a la exposición materna, afecta a órganos con receptores para hormonas sexuales como son la glándula mamaria, las trompas de Falopio y el útero, cervix, vagina, próstata, vesículas seminales, epidídimo y testículo, genitales externos, cerebro, esqueleto, tiroides, hígado, riñón y sistema inmune, entre otros (Miller y Sharpe, 1998).

1.3.1 El síndrome DES

Un modelo para la exposición medio ambiental a compuestos químicos con actividad hormonal es, como ya se ha comentado, el proporcionado por el tratamiento de mujeres embarazadas con diestilbestrol (DES), un estrógeno sintético utilizado en terapéutica entre 1948 y 1971 para prevenir los abortos espontáneos.



DES

Los sujetos expuestos a DES durante la vida intrauterina sirven de ejemplo para la predicción de la exposición embrionaria y fetal a compuestos químicos con actividad estrogénica agonista. En este sentido, es bien sabido que el marco ideal para evidenciar la actividad hormonal estrogénica es la estimulación de la actividad mitótica de los tejidos del tracto genital femenino tanto en el desarrollo ontogénico temprano, como en la pubertad o en el individuo adulto (Olea y cols., 1998) y se sabe que el efecto de los estrógenos se ejerce, asimismo sobre otros tejidos masculinos y femeninos. Así, las hijas de madres que tomaron DES (mas de un millón en USA durante el periodo 1960-70) tienen mayor probabilidad de sufrir alteraciones funcionales en los órganos reproductivos, embarazos anormales, reducción de la fertilidad, desórdenes globales en el sistema reproductivo y periodos de depresión que las hijas de mujeres no expuestas al estrógeno (Colborn y cols., 1993).

Por otra parte, cuando las niñas expuestas en útero se convierten en adolescentes presentan una mayor incidencia de cáncer de vagina de células claras, hecho fuertemente llamativo pues este tumor suele presentarse en mujeres de más de 50 años y que es raro en mujeres en la segunda década de vida descendientes de madres no sometidas al riesgo estrogénico. Un asunto aún más preocupante es que cuando estas mujeres que se expusieron en la época embrionaria alcanzan la edad en que los tumores del tracto reproductivo son más frecuentes mostrarán, probablemente, una mayor incidencia de cáncer que aquellas no expuestas (Colborn y cols., 1993).

Existe una gran información en la literatura científica sobre los efectos nocivos de la exposición a DES durante el periodo de diferenciación orgánica en estudios experimentales en roedores. Los estudios animales han corroborado los hallazgos en humanos (Dodds y cols., 1983; Luster y cols., 1984; Kalland, 1985; Luster, 1986; Luster y cols., 1985). Por ejemplo, los cambios displásicos de la próstata de los roedores son equivalentes a los observados en las próstatas de los descendientes de mujeres tratadas con DES y, en la ratona, la exposición a DES durante los periodos iniciales de vida conduce a la cornificación permanente del epitelio, efecto que puede ser independiente de la acción sobre el eje cerebro-hipófisis-ovario.

También han sido observadas, tras exposición temprana a DES, alteraciones significativas del sistema inmune, particularmente del sistema de células T, así como un incremento de enfermedades autoinmunes en las mujeres (Luster y cols., 1984; Kalland, 1980; Kalland, 1985; Noller y cols., 1988; Luster y cols., 1985). Estas alteraciones a menudo no son detectadas en el nacimiento, ni antes de alcanzar la madurez. Como, al tratar ratas machos con DES durante el primer mes de vida los órganos reproductivos accesorios aún están desarrollándose, no aparecen enfermedades malignas a los 6-8 meses de edad, sino que es a los 20 meses cuando se manifiestan tumores de células escamosas en la próstata dorsolateral. Por otra parte en ratonas tratadas precozmente con DES se ha descrito un aumento de la susceptibilidad a los carcinógenos mamarios (Dean y cols., 1980; Kalland y Forsberg, 1981).

1.3.2 Alteraciones del tracto genital urinario

Los datos epidemiológicos actualmente existentes parecen demostrar que, en el hombre, los desórdenes de carácter reproductivo se han incrementado durante los últimos cuarenta años. Una caída significativa, próxima al 50%, del conteo espermático se ha descrito para el periodo 1930 y 1990 por Carlsen y colaboradores

(1992). Se trata de un estudio de revisión que incluye 14.947 individuos de los cuales se tienen datos sobre calidad y número de espermatozitos y que ha servido para hacer una llamada de atención sobre el significado biológico de tales cambios en vista de la incidencia creciente de trastornos como el cáncer de testículo, el criptorquidismo y el hipospadias. Este estudio ha servido también para atraer la atención sobre el problema de la fertilidad humana. Mientras que los estudios de calidad del conteo espermático parecen confirmar los hallazgos de Carlsen (Auger y cols., 1995; Van Waelegem y cols., 1996; Swan y cols., 1997), lo cierto es que la polémica desatada sobre el problema hace difícil aceptar una generalización de los hechos descritos (Fisch y Goluboff, 1996; Swan y cols., 1997).

Por otra parte, resulta interesante considerar que durante el mismo periodo de tiempo en que ha ocurrido el descenso del conteo espermático se ha incrementado la exposición humana a compuestos químicos muy diversos con actividad desconocida sobre los sistemas hormonales, por lo que la hipótesis de los disruptores endocrinos no ha podido dejar de tomarse en consideración (Sharpe y Skakkeber, 1993; Lancet, 1995).

El criptorquidismo es la alteración de los órganos reproductivos más frecuente en el hombre. En el nacimiento, la prevalencia de la enfermedad es de un 3-5% y del 1% a los tres meses. Se asocia con cáncer de testículo y con infertilidad. Tres causas diferentes pueden encontrarse en la base etiológica de este proceso: causa hormonal, genética y traumática (Berkowitz y cols., 1993). Entre las razones de orden hormonal se encuentra la administración materna de preparados farmacológicos conteniendo estrógenos, como puede ser el tratamiento con anticonceptivos o con el estrógeno sintético DES, al que previamente se ha hecho referencia (Vorherr y cols., 1979; Grocock y cols., 1988). La criptorquidia se trata con cirugía o con hormonas (HCG y LHRH). En el primer caso, la intervención conocida como orquidopexia no modifica el riesgo de cáncer testicular pero permite un seguimiento preciso de cualquier signo de degeneración tisular (Olea y cols., 1996).

Con objeto de explorar la hipótesis medio ambiental en la génesis de enfermedades como el criptorquidismo se han puesto en marcha algunos trabajos. Así, en el Hospital Clínico de Granada se ha analizado la distribución de la frecuencia de orquidopexia como elemento indicativo de la incidencia de criptorquidismo en jóvenes menores de 16 años en la provincia de Granada (García-Rodríguez y cols., 1996). El objetivo de la investigación realizada fue determinar si existía un patrón de distribución geográfico de los casos que pudiera hacer pensar en determinados hábitos o formas de vida que favorecieran la presentación de la enfermedad. Para ello se estudiaron un gran número de casos de orquidopexia entre los años 1980 y 1993.

Los resultados experimentales del estudio han demostrado que es posible asociar la mayor incidencia de esta patología testicular con la actividad agrícola del área geográfica de estudio. De esta forma, el trabajo reveló que la mayor parte de los casos provenían de municipios dedicados a la actividad en agricultura intensiva, en los cuales el consumo de pesticidas y productos químicos agrícolas es mayor. Las tierras del interior presentaban, por otra parte, la menor incidencia de orquidopexia. En estos municipios la actividad agrícola predominante es el cereal y el olivar y el consumo de fitosanitarios y agroquímicos es sensiblemente inferior (García-Rodríguez y cols., 1996). Un artículo reciente ha corroborado esta hipótesis al encontrar un mayor riesgo de criptorquidismo en hijos de mujeres expuestas ocupacionalmente a pesticidas (Sloth y cols., 1998).

1.3.3. Cáncer de mama

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres, representando el 25% de las muertes no accidentales en mujeres entre 35 y 54 años. En 1996, se habían estimado 910.000 casos nuevos en todo el mundo (Fernández y cols., 1997). La incidencia ha sufrido un aumento dramático en los últimos

cincuenta años en el mundo industrializado llegando a alcanzar una tasa de incidencia superior a 100 casos por cada 100.000 mujeres en algunos países (IARC, 1997).

Las causas o razones, si fueran varias, de este fenómeno no son bien conocidas, aunque se sospecha que algunos factores medio ambientales puede que tengan algo que ver en el origen de la enfermedad, puesto que las diferencias regionales de presentación de la enfermedad y los cambios de incidencia observados en poblaciones de emigrantes respecto de las que presentan sus países de origen son muy notables (Moysich y cols., 1998).

En el informe sobre cáncer de mama publicado por la revista Science en 1993 (Marshall, 1993), se resume en pocas líneas lo que sabemos sobre cáncer de mama en el día de hoy. En dicho informe se presenta un "retrato robot" de la mujer de alto riesgo de padecer cáncer de mama. Aparecen juntos la nuliparidad, la menarquia precoz y la menopausia tardía, la estructura corporal en la menopausia y la obesidad. Variables de los hábitos reproductivos y dietéticos parecen identificarse en la base del proceso morboso. Durante los últimos quince años se ha dedicado mucho esfuerzo e invertido mucho dinero en el estudio de la asociación existente entre hábitos alimentarios y cáncer de mama. Los resultados obtenidos no han sido tan concluyentes como se esperaba. No obstante, hoy día podemos afirmar que no es tan importante la cantidad como la calidad en la ingesta de grasa (Willett y cols. 1993; Cassidy y cols., 1994). Y es más, podemos dirigir nuestra atención a la alimentación como vehículo de compuestos químicos extraños al organismo, esto es, xenobióticos estrogénicos que podrían participar de algún modo en la carcinogénesis mamaria. Al encontrarse el hombre en la cima de la cadena alimentaria el riesgo de bioacumulación de productos lipofílicos es, sin duda, mayor y mayores son, por lo tanto, las consecuencias derivadas del mismo.

Algunos indicios permiten asociar de forma significativa la presencia de xenobióticos estrogénicos en los medios biológicos (sangre, suero) con la mayor

frecuencia de presentación de ciertas enfermedades. Así el trabajo de Wolff y cols. (1993), sugirió una asociación significativa entre niveles de pesticidas organoclorados en sangre y cáncer de mama, en el área de New York, asociación sospechada años atrás cuando algunos trabajos ecológicos denunciaron que la exposición a ciertos pesticidas podía conducir a la presentación del cáncer mamario. Los estudios disponibles hasta la llegada del trabajo de Wolff estaban limitados en sus conclusiones por la cortedad del grupo de casos y controles empleados, pero ya advertían la presencia de determinados organoclorados en los casos de cáncer mamario (Mussalo-Rauhamaa y cols. 1990).

Estudios más recientes han mostrado alguna contradicción en sus resultados. Por ejemplo, Krieger y cols (1994) no han encontrado niveles significativamente mayores de PCBs y DDE en las pacientes con cáncer de mama incluidas en una serie de enfermas de la Costa Oeste de EE.UU. cuando se compararon con los encontrados en los grupos control. No obstante, cuando se analizaron por separado los grupos étnicos estudiados, los niveles de DDE se consideran factor de riesgo en mujeres afro-americanas y blancas. Mas adelante, Hunter y cols. (1997) no han observado, en cambio, una asociación significativa entre exposición a PCBs y DDE e incremento del riesgo de padecimiento de cáncer de mama. A idéntica conclusión han llegado Van't Veer y cols. (1997) que investigaron los niveles de DDE en grasa de mujeres europeas postmenopáusicas con cáncer de mama. En un estudio realizado en Méjico, López Carrillo y cols. (1997) han descrito que los valores de DDE no son significativamente diferentes en pacientes con cáncer de mama de los encontrados en los grupos de mujeres control, pero no excluyen la posibilidad de que un nivel más alto de exposición juegue un papel en la etiología de esta enfermedad. Gütes y cols. (1998) tampoco han observado una diferencia significativa en la concentración de organoclorados en tejido adiposo de mujeres con patología mamaria benigna con respecto a pacientes con patología maligna y Heizlsouer y cols. (1999), no han

encontrado asociación entre altas concentraciones de DDE y PCBs en suero y un incremento del riesgo de cáncer de mama.

Algunos estudios epidemiológicos han añadido aun más confusión a la hipótesis, al demostrarse la existencia de una asociación significativa entre la exposición a determinados organoclorados y un mayor riesgo de padecimiento de cáncer de mama, si bien éste es más evidente para productos químicos concretos y poblaciones con características peculiares. Así, por ejemplo, Olaya-Contreras y cols. (1998) sostienen que existe una relación causa-efecto entre los niveles en suero de DDE y cáncer y Moysich y cols. (1998) han sugerido que la exposición medio ambiental a organoclorados puede ser un factor de riesgo en mujeres que nunca han lactado, detectándose un mayor nivel de PCBs y mirex en el suero de las pacientes con patología mamaria cuando se compara con sus respectivos controles apareados.

Uno de los mayores inconvenientes en el diseño experimental de los estudios epidemiológicos conducentes a la medida de exposición, es que los individuos no están expuestos a un solo producto, sino a una compleja mezcla de sustancias. Sería necesario por tanto, para dar una solución a este problema: 1) cuantificar un mayor número de compuestos químicos, haciendo extensible la medida a xenoestrógenos no organoclorados, 2) estudiar las interacciones existentes entre diversos compuestos químicos, evaluando el efecto resultante de la exposición conjunta a agonistas y antagonistas hormonales, 3) definir biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto para los compuestos hormonalmente activos.

En lo concerniente a este último punto, el empleo de biomarcadores de exposición a xenoestrógenos permitiría establecer la relación entre exposición y enfermedades con largo periodo de latencia y carácter multifactorial. En principio la estrategia de trabajo necesaria para la aplicación de los biomarcadores debería considerar dos aspectos metodológicos de diferente orden: 1) el desarrollo de un test biológico mediante el que verificar la actividad hormonal responsable del efecto, y 2)

la adecuación de la muestra en términos de accesibilidad, limpieza y preparación para poder ser utilizada en el bioensayo definido. Ambos aspectos serán considerados a continuación, haciéndose referencia tanto a la información disponible sobre el procesamiento de las muestras biológicas de individuos sometidos a estudio como a la elección de un bioensayo de actividad hormonal apropiado.

1.4 TESTS DE ACTIVIDAD HORMONAL ESTROGÉNICA

El reconocimiento de compuestos químicos con actividad hormonal se ha visto dificultado durante años, fundamentalmente, por la complejidad de los tests predictivos y la imposibilidad de atribuir a un compuesto químico actividad de tipo hormonal tomando como base la simple observación de su estructura molecular.

A pesar del enorme interés que suscita la identificación de los compuestos químicos dotados de actividad estrogénica, son pocos los bioensayos que se reconocen en la actualidad como instrumentos útiles para la identificación de sustancias químicas con dicha actividad hormonal (Andersen y cols., 1999). Entre ellos disponemos:

1.4.1 Tests *in vivo*

1.4.1.1 Test de cornificación vaginal

Consiste en la medida de la capacidad de una sustancia química de inducir la fase de *estro* cuando se administra a un animal, generalmente ratón o rata hembra, previamente castrado. La técnica del test ha permanecido casi invariable desde su descripción en 1923 por Allen y Doisy (Allen y Doisy, 1923), siendo el examen microscópico del epitelio vaginal la forma usual de evaluar la transformación estrogénica del animal tratado. Habitualmente, la actividad de la sustancia ensayada

se expresa en unidades internacionales, entendiéndose por la U.I. en el ratón la cantidad de estrógeno natural capaz de inducir el *estro*, que para la estrona corresponde a una dosis de 0,1 µg.

1.4.1.2 Test de incremento del peso uterino

El test de evaluación del peso uterino identifica aquellos estrógenos, capaces de inducir el *estro* mediante la evaluación del incremento del peso uterino, tras la aplicación subcutánea de la sustancia estrogénica a un animal hembra inmaduro u ovariectomizado (Astwood, 1938).

Recientemente, se ha realizado una actualización de dicho test que consiste, básicamente, en administrar tres dosis consecutivas, durante tres días, de la sustancia a ensayar a ratas que son mantenidas con comida y agua *ad libitum*, y en régimen de 12 horas de luz oscuridad en condiciones normales de temperatura y humedad. Se utiliza un control positivo proporcionado por el tratamiento de un grupo de animales con etinilestradiol y un control negativo, grupo que recibe tan sólo el vehículo de inyección. La inoculación se lleva a cabo, por inyección subcutánea en la región dorsal del animal.

Los animales se sacrifican transcurridos 20 horas después de dislocación cervical y tras ser pesados se disecan y se separan los ovarios, oviductos y la vagina del útero bicórneo. Los órganos se pesan separadamente antes de proceder a una fijación e inclusión en parafina para el estudio histológico complementario. Este consiste en la realización de secciones transversales y longitudinales del útero sobre las cuales se procede a estimar la densidad volumétrica del epitelio luminal uterino, del epitelio glandular, del tejido estromal conectivo y muscular y la altura de las células epiteliales lumbinales mediante, microscopia óptica.

1.4.2 Tests *in vitro*

1.4.2.1. Test de proliferación celular: *E-SCREEN*

La capacidad de los estrógenos para inducir proliferación celular en sus órganos diana ha sido considerada el método de referencia para medir la actividad estrogénica. Basándose en esta observación, Soto y cols. pusieron a punto, en 1992, un ensayo biológico apoyado en este principio y basado en la estimación de la capacidad proliferativa de células en cultivo al ser tratadas con estrógenos. Este ensayo utiliza la línea celular humana MCF-7 establecida a partir de un carcinoma de mama humano, y compara la proliferación tras 6 días de subcultivo en ausencia (control negativo) o presencia (control positivo) de estradiol-17 β . El test exige el mantenimiento celular continuo en medios específicos (DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) bajo condiciones adecuadas: 37°C, 5% CO₂, y atmósfera saturada de humedad. Las células se siembran en un medio rico en nutrientes y factores de crecimiento. Una vez adheridas las células, el medio se reemplaza por otro carente de hormonas esteroideas endógenas (para lo cual el suero humano utilizado como suplemento del cultivo se trata con carbón dextrano) al que se añaden las sustancias químicas puras o mezclas a ensayar, o los extractos de muestras biológicas obtenidos tras la purificación adecuada de diferentes muestras. El ensayo finaliza a las 144 horas, con la fijación de las células, la tinción del tapiz celular con sulforrodamina-B, siguiendo la técnica descrita por Villalobos en 1995 (Villalobos y cols., 1995) y la cuantificación posterior de la proliferación celular obtenida con respecto a los controles negativo y positivo.

El límite de detección descrito para el test se ha establecido en 1 pM de estradiol-17 β por lo que el bioensayo descrito está considerado como uno de los más sensibles para el análisis de la estrogénicidad de compuestos cualesquiera (Andersen y cols., 1999). Por otra parte, el hecho de que no se hayan encontrado diferencias

cualitativas al comparar los resultados de ensayos en animales con los del E-SCREEN (Soto y cols., 1995), hace que el ensayo sea biológicamente equivalente al basado en la medida del incremento de la actividad mitótica del endometrio de roedores.

1.4.2.2 Test de enlace competitivo con el receptor estrogénico

Como la actividad hormonal de los estrógenos naturales es dependiente de su unión inicial al receptor de estrógenos, esta propiedad ha sido utilizada para evaluar la actividad hormonal de compuestos químicos bajo sospecha de mimetizar el efecto estrogénico. Mediante este ensayo se trata de cuantificar la capacidad de los xenobióticos estrogénicos para desplazar al estrógeno natural en su unión al receptor específico. Se utiliza generalmente para ello, el receptor hormonal aislado a partir de células en cultivo (MCF-7) o de útero de ratas prepúberes. Una vez obtenida la fracción citosólica, se realiza un test de enlace competitivo para estimar la concentración del receptor estrogénico (RE) y la constante de afinidad del proceso de enlace. En el ensayo de cuantificación del RE se emplea como hormona marcada el [2,4,6,7-³H]estradiol-17 β , el competidor a evaluar y estradiol no marcado. Tras el periodo de incubación (4-18 h) se separa la fracción libre de la ligada, mediante el tratamiento con una suspensión de carbón α extrano y se mide una alícuota de la fracción sobrenadante en un contador- β . El cálculo de las afinidades entre la hormona y el RE se realiza mediante la estimación de la capacidad máxima de enlace y la constante de afinidad del proceso siguiendo el método de Scatchard. Finalmente se representan las concentraciones ensayadas de cada producto, incluido el estradiol-17 β , frente al porcentaje de inhibición del enlace entre el receptor y el estradiol marcado.

La estimación de la concentración de cada compuesto para inhibir el 50% del enlace se expresa como la afinidad relativa o RBA (relative binding affinity). Entre las desventajas que presenta este ensayo se encuentran la no detección de compuestos

que requieren una activación metabólica y los falsos positivos que pueden obtenerse al ensayar algunos compuestos antagonistas que se unen también al receptor estrogénico.

1.4.2.3 Inducción de expresión de proteínas/actividad enzimática

Bioensayos basados en la inducción de proteínas específicas del efecto hormonal, algunas de ellas con actividad enzimática, han sido utilizados como marcadores de actividad estrogénica. Entre ellos encontramos la expresión de pS2, de receptor de progesterona (RPg), catepsina D, prolactina, la globulina que se une a hormonas sexuales (SHBG), ovalbumina, ceruloplasmina, tubulina y vitelogenina (Soto y cols., 1995; Andersen y cols., 1999).

Algunos trabajos experimentales han puesto de manifiesto que el estradiol-17 β y otros estrógenos naturales, así como algunos xenobióticos estrogénicos, actúan sobre las células MCF-7 estimulando la síntesis y secreción activa de la proteína pS2 que se acumula en el medio extracelular (Villalobos y cols., 1995; Soto y cols., 1995; Olea y cols., 1996; Pérez y cols., 1998). Debido al control estrogénico de su síntesis y secreción, se ha demostrado que pS2 es un buen marcador de dependencia hormonal en cáncer de mama. Más recientemente, se ha propuesto que además de la medida del producto proteico, la cuantificación del ARN mensajero de esta proteína podría ser utilizada también, para la evaluación de actividad hormonal estrogénica (Borrás y cols., 1994; Jin y cols., 1995).

1.4.2.3 Test de expresión génica en células transfectadas

Está demostrado que determinados genes son regulados por los estrógenos mediante la interacción del complejo estrógeno-receptor y ligando, con zonas específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta estrogénica (ERE).

Dichos genes pueden codificar proteínas con actividad enzimática de fácil identificación como β -galactosidasa, cloroanfenicol acetiltransferasa o luciferasa (Pons y cols., 1990; Gagne y cols., 1994; Jausons-Loffreda y cols., 1994; Jobling y cols., 1995; Miksicek, 1995; Zacharewski y cols., 1995).

Tanto células aisladas de organismos superiores (líneas celulares establecidas) como especies unicelulares pueden ser transfectadas con las secuencias de ADN que contienen los elementos de respuesta estrogénica (ERE) y un gen *reporter* dependiente de los anteriores. De hecho, los primeros ensayos de transfección se hicieron utilizando levaduras que incorporan el gen de la vitelogenina, proteína estrógeno-dependiente que se expresa en hígado de peces y otros animales bajo estímulo hormonal. El test de vitelogenina en levaduras ha sido empleado como instrumento de screening de xenoestrógenos por numerosos grupos de trabajo y para múltiples compuestos químicos (Andersen, 1999).

También se utilizan para tal fin clones de la línea celular MCF-7 transfectados con plásmidos que contienen el elemento ERE ligado al gen de la luciferasa. El ensayo así concebido es de corto periodo de realización, en el cual la respuesta estrogénica está significativamente amplificada. Por su sencillez y rápida ejecución, los bioensayos de células MCF-7 transfectadas se presentan hoy como una alternativa al E-SCREEN (Dees y cols., 1997; Lobaccaro y cols., 1997; Le Bail y cols., 1998).

1.5 METODOLOGÍA QUÍMICO-ANALÍTICA. ANTECEDENTES

El análisis de xenobióticos estrogénicos en muestras humanas requiere el establecimiento de un sistema de garantía y control de calidad que asegure la fiabilidad, la precisión y la reproductibilidad de las medidas experimentales. Resulta necesaria, además, la ejecución de un protocolo apropiado tanto en la obtención y almacenamiento de la muestra, como en el mantenimiento de la integridad de la matriz biológica objeto de análisis (Woodruff y cols., 1994).

Una gran parte de los trabajos publicados y revisados en esta introducción van dirigidos a la determinación de xenobióticos estrogénicos, tipo organoclorado, en muestras medio ambientales y se centran en el desarrollo de métodos universales, rápidos y dotados de alta capacidad, útiles para analizar un gran número de contaminantes en matrices muy diferentes (técnica multiresiduos- multimatrices). La tendencia de otras publicaciones, se centra en el análisis cualitativo de uno o unos pocos contaminantes, aunque tal procedimiento se está abandonando paulatinamente ya que los resultados experimentales proporcionados por la aplicación de esta metodología han aportado una información escasa y altamente discutida (Longnecker y cols., 1997).

El paso inicial en el análisis de cualquier muestra biológica es la preparación, que tiene por objeto eliminar las impurezas que puedan interferir en la identificación y determinación de las moléculas de interés en el estudio. Debido a la lipofilidad de muchos de los xenoestrógenos organoclorados conocidos la técnica de aislamiento más frecuentemente utilizada es la extracción simple con uno o varios disolventes orgánicos. Las cualidades lipofílicas de los organoclorados se incrementan al aumentar el número de átomos de cloro en la molécula, lo que a su vez favorece la bioacumulación. Por otra parte, su solubilidad en agua depende de su acidez, de tal manera que, por ejemplo, las sales de sodio y potasio son cuatro veces más

hidrosolubles que los compuestos originales. Estas peculiaridades deben ser aprovechadas en el planteamiento del procedimiento de análisis.

Los disolventes empleados en muestras de suero que han proporcionado mayor rendimiento de extracción son el dietiléter:hexano (Wolff y cols., 1991, Shannon y cols., 1997; Hunter y cols., 1997) y hexano (Luo y cols., 1997; Moysich y cols., 1998). En el análisis de organoclorados en leche humana han sido utilizados con éxito cloroformo/metanol (Krauthacker, 1991) y acetonitrilo (Duarte-Davidson y cols., 1991).

En la extracción de xenoestrógenos de muestras de tejido adiposo se emplean habitualmente técnicas mixtas, mecánica-química, basadas en la agitación o trituración de la muestra con un disolvente apropiado. Entre los disolventes comunmente empleados se encuentran el diclorometano/ciclohexano (Williams y Lebel, 1991), acetona/hexano (Guy y cols., 1986), hexano (Okond'Ahoka y cols., 1984; Shannon y cols., 1997) y el hexano/2-propanol (Weistrand y Norén, 1997).

Por otra parte, los métodos de purificación o limpieza (clean-up) utilizan normalmente materiales muy diversos como florisil (Frank y cols., 1978; Saaáy y Poklis, 1990; Williams y Lebel, 1991; Wolff y cols., 1993; Moysich y cols., 1998), sílice (Burse y cols., 1990; Weistrand y Norén, 1997) o alúmina (Okond'Ahoka y cols., 1984; Gütes y cols., 1998). Se trata en la mayor parte de los casos de material desechable, aunque en algunas ocasiones se ha propuesto la recuperación de la columna.

De acuerdo con la polaridad de los materiales escogidos para la medida, se ha propuesto una variedad más o menos amplia de disolventes de elución como n-hexano, n-pentano, éter etílico, éter de petróleo, acetonitrilo, bien solos o en mezclas miscibles, cuya finalidad es optimizar el rendimiento de los ensayos, situado en la mayoría de los trabajos publicados en valores superiores al 80% (Shanon y cols., 1997; Singh y cols., 1998).

Los métodos de análisis utilizados para la determinación de xenoestrógenos organoclorados hacen uso corriente de las técnicas cromatográficas, fundamentalmente la cromatografía de gases y el detector de captura de electrones, cuyos límites de detección son suficientemente bajos y su reproductibilidad muy elevada (Frank y cols., 1988; Saady y Poklis, 1990; Burse y cols., 1990; Williams y Lebel, 1991; Wolff y cols., 1991, 1993; Weistrand y Norén 1997; Shannon y cols., 1997; Hunter y cols., 1997; Moysich y cols., 1998; Paumgarten y cols., 1998; Gütes y cols., 1998).

Por último, junto a la tendencia a la puesta a punto de "técnicas multiresiduo" se ha realizado un gran esfuerzo en la adecuación de la metodología analítica al estudio de muestras con baja concentración de algunos de los organoclorados de mayor interés biológico. Por esta razón, es interesante comentar la insistencia con la que se especifica en los trabajos consultados la efectividad del método analítico propuesto, tanto en lo que respecta a la especificidad de la técnica como a la indicación de la sensibilidad y límite de detección. Wolff y cols. (1991), han establecido, a este respecto los límites de detección para pesticidas organoclorados en suero humano, trabajando en cromatografía de gases con detector de captura de electrones e inyección automática, entre 0,15 y 0,30 ng/ml. Recientemente Moysich y cols. (1998) han situado los límites entre 0,06 para mirex y 0,09 ng/g lípido para DDE y Krauthacker (1991) considera como límites aceptables en leche humana para DDT los comprendidos en torno a 1 mg/l y para PCBs en 2 mg/l. En muestras de tejido adiposo, Dewailly y cols. (1994) han definido para pesticidas organoclorados unos límites comprendidos entre 0,2 µg/Kg y 7 µg/Kg. Shanon y cols. (1997) han establecido los límites de cuantificación de pesticidas organoclorados en suero y tejido adiposo de forma tal que el nivel más bajo corresponde al α -HCH, con 5 pg/mg en grasa y 0,6 pg/mg en suero y el más alto corresponde al p,p'-DDT con un valor de 50 pg/mg en grasa y 6,3 pg/mg en suero.

En definitiva, durante la pasada década se ha producido un incremento notable en la sofisticación y accesibilidad de las herramientas analíticas que pueden ser utilizadas para la detección de bajos niveles de xenoestrógenos en muestras biológicas en orden a la obtención de datos de exposición que permitan investigar sus efectos adversos en salud humana (Woodruff y cols., 1994). La revisión de la literatura científica al respecto junto a la experiencia particular de nuestro propio grupo (Brotons JA., Tesis Doctoral 1994; Valenzuela B., Tesis Doctoral 1996; Pulgar R., Tesis Doctoral 1996; Perez P., Tesis Doctoral, 1996; Nieto R., Tesis Doctoral 1998) nos ha servido para desarrollar la metodología analítica que se propone en este trabajo.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se encuadra dentro de un estudio epidemiológico de tipo casos:control, de base hospitalaria, cuyo objetivo general es el análisis de posibles factores de influencia en la carcinogénesis mamaria: antecedentes familiares, hábitos alimentarios, historia ginecológica, historia expositiva y otros. Entre estas variables destaca por su novedad y singularidad la medida de la carga hormonal estrogénica, entendida como la expresión cuantitativa de la actividad estrogénica atribuible a xenoestrógenos bioacumulados en el organismo humano.

Los objetivos específicos del trabajo de investigación propuesto son, por otra parte los siguientes:

1. Desarrollar una metodología analítica que permita la extracción de xenobióticos estrogénicos a partir de muestras de tejido adiposo y que proporcione un extracto susceptible de análisis mediante un ensayo biológico adecuado.
2. Definir las condiciones generales de utilización del mejor test de estrogenicidad *in vitro* basado en el empleo de las células MCF-7, utilizando para ello compuestos químicos de capacidad estrogénica conocida que puedan ser empleados rutinariamente en la estimación de la carga estrogénica.
3. Evaluar cuantitativamente la actividad hormonal de los extractos obtenidos de las muestras de tejido adiposo y estimar la carga hormonal estrogénica inducida por los mismos.
4. Analizar los contaminantes químicos presentes en las muestras biológicas

responsables de la estrogenicidad en el bioensayo hormonal, mediante el análisis cualitativo y cuantitativo de las mismas por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE).

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTACIÓN

3.1.1 Estufa para cultivos celulares

Se ha utilizado la estufa incubadora REVCO ÚLTIMA (Revco Scientific, EE.UU.). Las experiencias de cultivo se llevaron a cabo a la temperatura de 37°C, en una atmósfera constituida por aire con 5% de CO₂ saturada de humedad.

La temperatura se reguló mediante un termostato electrónico con exactitud situada en torno a $\pm 0,05^\circ\text{C}$. La regulación de la presión parcial de CO₂ se llevó a cabo mediante un sistema de medida de la conductividad térmica de la mezcla de gases que permite detectar cambios en la concentración de CO₂ superiores a un $\pm 0,1\%$.

3.1.2 Estufa de alta temperatura

Se ha empleado una estufa P-Selecta con termostato y selector de temperatura de hasta 250°C.

3.1.3 Cámara fría y congeladores.

Para el almacenamiento de reactivos y tampones así como para la realización de experimentos a baja temperatura se han utilizado una cámara frigorífica (Pedro y López S.A.) con temperatura regulada a 4°C, además de frigoríficos y congeladores convencionales.

Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un congelador, marca Forma Scientific, con temperatura fijada a -70°C.

3.1.4 Contenedor de nitrógeno líquido

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

3.1.5 Baño termostaticado

Para calentar líquidos se utilizó un baño termostaticado compuesto de un contenedor abierto de agua, con capacidad de 15 l y un termostato para regular la temperatura en el intervalo de 0 a 100°C .

3.1.6 Cámaras de flujo laminar

Para evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares se han utilizado cabinas de flujo laminar vertical modelo Gelaire, Laminar Airflow, suministradas por Flow Laboratories (Escocia). Su funcionamiento se basa en hacer circular corrientes de aire (en este caso en dirección vertical) con una velocidad máxima de 0,46 m/s a través de un sistema de filtros antes de entrar en la cabina de trabajo. La filtración del aire y el rendimiento del proceso de filtración (99,997% de retención de todas las partículas mayores de $0,3\ \mu$ de diámetro) garantizan el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

3.1.7 Microscopios

Hemos utilizado para el análisis de los cultivos un microscopio invertido Olympus IMT/201 dotado de tres objetivos (x10, x20 y x40), doble ocular y ocular con

posibilidad de aplicación de un dispositivo fotográfico.

Se ha utilizado también un microscopio óptico convencional, Olympus CHB con aumentos x10, x40, x100, doble ocular y dispositivo automático de precisión para el desplazamiento de las muestras. Este microscopio se ha empleado para efectuar los contajes celulares con la cámara de Neubauer.

3.1.8 Cámara de Neubauer

Para el contaje de elementos celulares en suspensión, una vez teñidos éstos con un colorante vital tipo Tripan Blue, se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro convencional.

3.1.9 Bomba de vacío

Para presurizar recipientes a presión en operaciones de filtración de líquidos se ha utilizado una bomba de vacío suministrada por Millipore (EE.UU.). La bomba proporciona un caudal de aire regulado a 24 l/min. para un vacío de 127 mm de Hg y va conectada a un matraz de vacío de 0.5 l de capacidad. Este matraz lleva un tubo de vacío que se aplica sobre la unidad de filtración directamente o bien mediante la ayuda de pipeta Pasteur.

3.1.10 Centrífugas

Se ha empleado de modo general una centrífuga Heraeus mod. Universal Junior IS y una centrífuga refrigerada convencional Beckman TJ/6 (Beckman Instruments Inc.), dotada con una unidad adicional de refrigeración que permite centrifugar muestras a baja temperatura (4-6°C). Esta última unidad posee un rotor con cuatro

soportes intercambiables para la centrifugación simultánea de un número de muestras variable (de 4 a 120). Cuando el protocolo experimental así lo requirió se utilizó una ultracentrifuga Beckman L8 70.

3.1.11 pHmetro y Balanza de precisión

Hemos utilizado para medidas de pH el equipo suministrado por la firma Orion Research, modelo 501, cuya precisión se estima en 0,01 unidades de pH. Como balanzas de precisión se han empleado los sistemas Mettler 300 y H 35-AR, capaces de medir céntesimas y décimas de miligramo, respectivamente.

3.1.12 Unidad de esterilización por Autoclave

Para conseguir unas condiciones óptimas de esterilidad se ha utilizado material de la unidad de esterilización general del Hospital Clínico San Cecilio. Dicho material una vez esterilizado se almacenó tras ser marcado con la fecha máxima aconsejada para su uso.

3.1.13 Unidad de esterilización por filtración

Se han utilizado sistemas de filtración Millipore XX11 047 10 esterilizables en autoclave. Las unidades de filtración constan de dos receptáculos: uno superior, de 250 ml de capacidad, en el se deposita la disolución a esterilizar y otro inferior, de igual capacidad, en el que se recoge el líquido una vez filtrado y estéril. Ambos receptáculos se encuentran separados por un filtro Millipore GSWP 047 00 desechable, de 47 mm de diámetro y 0,22 μ de tamaño de poro. Alternativamente se han empleado unidades de filtración de un solo uso y filtros de 0.22 μ m de poro

Gelman Sciences (EE.UU.).

3.1.14 Espectrofotómetro de placas de pocillos múltiples

Para los experimentos de proliferación celular se ha utilizado un espectrofotómetro o lector automático de densidad óptica (Titertek Multiskan MK11, ICN Flow) adaptado a placas de cultivo de 96 pocillos.

3.1.15 Pipetas automáticas

Para manipular los medios de cultivo se han utilizado pipetas con succión y expulsión automática de fluido de la marca Tecnomar (Suiza), modelo R301. Para la realización de los ensayos químicos y bioquímicos se emplearon pipetas de volumen variable de 0-10 μ l y 20-100 μ l, modelo Microtransferpettor Digital Brand

Para la preparación de las muestras se utilizó una micropipeta, marca Socorex Isba S.A.(Suiza), de volumen variable comprendido entre 0 y 100 μ l.

3.1.16 Cromatógrafos

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

Hemos utilizado, asimismo, un cromatógrafo de gases Varian-3350 (EE.UU) con detector de captura de electrones (^{63}Ni) y el sistema Millennium Chromatography

Manager como software.

3.1.17 Columnas para cromatografía

Para las diferentes técnicas cromatográficas se han empleado diversas columnas:

- Columna de vidrio para cromatografía Pyrex con 6 mm de diámetro interno rellena con Alumina de Merck (Alemania) [90 (70-230) n°. 1097].
- Columna modelo Lichrocart de Merck para HPLC rellena de Lichrospher (Si-60) con tamaño de partícula interno de 5 μm .
- Columna de metil silicona, para cromatografía de gases (longitud 30 m) de Quadrex (EE.UU.).

3.1.18 Colector de fracciones

En serie con la unidad de cromatografía líquida se ha empleado un colector de fracciones modelo LKB Bromma.

3.1.19 Equipo de filtración para HPLC

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

3.1.20 Rotavapor

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

3.1.21 Microjeringas

Se han utilizado dos tipos de microjeringas para CG y HPLC, modelo SGE, con 1, 20 y 500 µl de capacidad, respectivamente.

3.1.22 Célula de electroforesis

Para realizar la electroforesis de ARN se ha utilizado un equipo de electroforesis horizontal para DNA Hoefler modelo HE99X (Hoefler Instruments). La electroforesis se realizó a 65 V durante 5 horas. El gel se preparó utilizando el soporte que acompaña a la cubeta y los pocillos de depósito de las muestras se prepararon usando peines apropiados.

3.1.23 Sistema de reproducción fotográfica

Los filtros de transformación del gel se expusieron a películas de autorradiografía (Kodak XAR-5 film, Eastman Kodak, EE.UU.), utilizando pantallas amplificadoras Dupont (Alemania).

3.1.24 Densitometría

La cuantificación de los geles autorradiografiados se realizó mediante

densitometría utilizando un densitómetro Hoefer GS300 y el sistema procesador GS370 de análisis densitométrico 3.0 de Macintosh.

3.1.25 Tratamiento estadístico de los datos

Para el tratamiento estadístico efectuado en orden a valorar la significancia de los datos obtenidos se ha empleado el programa STADTQUICK versión 3.

3.1.26 Tratamiento de textos. Representaciones gráficas.

Para el tratamiento de textos hemos usado el procesador de textos Word Perfect en su versión 6.1. y para la elaboración de los gráficos se ha empleado el programa Microsoft Excel.97.

3.1.27 Otro material

Se han utilizado, por último, diversos equipos de laboratorio entre los que cabe destacar: picadores de hielo, vortex, agitadores mecánicos y otros.

3.2 MATERIAL FUNGIBLE

3.2.1 Material de plástico para cultivos celulares

Se han utilizado cajas de cultivo de poliestireno de 25 (T-25) y 75cm² (T-75) de superficie suministradas por Nunc (Dinamarca), de un solo uso, estériles y de buena calidad óptica, diseñadas para conseguir una buena adherencia y preparar, por tanto, cultivos de distribución celular.

Los experimentos de crecimiento celular se realizaron en placas de cultivo de 24 pocillos, también de poliestireno, suministradas por ICN (Irvine, Escocia). Se han utilizado también tubos de plástico estériles, tipo universal de fondo cónico (Nunc), viales para congelación en nitrógeno líquido (Nunc), así como tubos de plástico de diferentes tamaños, estériles y no estériles.

En los experimentos de actividad luciferasa se utilizaron placas Petri suministradas por Falcon (EE.UU.) de distintos diámetros (6-10 y 15 cm).

3.2.2 Pipetas

Se han utilizado pipetas de plástico estériles, de un sólo uso, empaquetadas individualmente y con capacidad de 1-2 y 5 ml. También se han utilizado pipetas tipo Pasteur de vidrio, Labclinics ppv/9 y ppv/6, convenientemente esterilizadas y almacenadas.

3.2.3 Filtros

Para la esterilización de pequeños volúmenes de disoluciones o de medios de cultivo se han utilizado filtros Millipore HAWR 02500 de un sólo uso, con diámetro

de poro 0,22 μ y 25 mm, respectivamente.

3.2.4 Otro material fungible

Para la realización de los distintos experimentos se ha empleado, entre otro tipo de material fungible:

- Bolsas de hibridación (GibcoBrl, EE.UU.).
- Membranas Hybond- N (Amersham, Inglaterra).
- Tubos de polipropileno con tapón de rosca y fondo cónico, de 13 ml de volumen, estériles.
- Erlenmeyers, probetas, matraces, vasos de precipitado, embudos y otro material habitual de laboratorio.

3.3 REACTIVOS

3.3.1 Líneas celulares

Se han utilizado las siguientes líneas celulares de cáncer humano cultivadas todas ellas en monocapa:

3.3.1.1 MCF-7:

Establecida por Soule y colaboradores (Soule, 1973) a partir de un carcinoma de mama humano. Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuido a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo (Horwitz, 1978) que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos (Lippman, 1975).

La línea celular MCF-7 presenta, además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre los cuales se encuentran los andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D3, hormonas tiroideas, prolactina, insulina, calcitonina y factores estimuladores del crecimiento celular (Lippman, 1986).

En el presente estudio, se ha empleado el stock de las células MCF7 BUS cedidas por el Dr. C. Sonnenschein (Tufts University, Boston, EE.UU.) y clonadas como C₇MCF7 a partir del pase 173 de la MCF-7 original cedida por el Dr. McGrath de la Michigan Cancer Foundation.

3.3.1.2 MVLN:

Esta línea celular fue establecida por Pons y colaboradores (Pons y cols., 1990) con objeto de desarrollar un modelo celular sencillo y rápido de caracterización de moléculas estrogénicas o antiestrogénicas. Se utilizaron para ello clones de la línea celular MCF-7 transfectados de modo estable con un gen *reporter* que permite la

expresión de la enzima luciferasa bajo el control del elemento regulador de estrógenos del gen A2 de *Xenopus vitelogenina*. Desde su creación, esta línea, ha sido utilizada en bioensayos de estrogenicidad como un modelo alternativo a las líneas celulares clásicas (Dees y cols., 1997; Lobaccaro y cols., 1997; Le Bail y cols., 1998).

3.3.2 Medios de cultivo

Para el mantenimiento de las células MCF-7 y MCF-7 transfectadas o MVLN, se ha utilizado Medio Mínimo Esencial suplementado con sales de Earle modificado por Dulbecco (DME) (PAA Labor and Forschungs Ges, MBH, Austria). Cuando el diseño experimental así lo exigió se utilizó el mismo medio sin la adición del indicador de pH rojo fenol DME (-RF) (BioWhitaker, Inglaterra).

3.3.3 Suero

Los medios de cultivo empleados para el mantenimiento de las células MCF-7 y MVLN se suplementaron con un complemento variable (5-10%) de suero de procedencias diferentes: 1) suero bovino fetal (FBS) (PAA Labor und Forschungs Ges, MBH, Linz, Austria) y 2) suero humano (HuS) obtenido a partir de sangre fresca extraída a voluntarios sanos (Merck). Alternativamente se ha empleado suero humano (Irvine Scientific, EE.UU.), desprovisto de estrógenos endógenos.

3.3.4 Enzimas

Para la obtención de una suspensión monocelular homogénea a partir de la monocapa celular se ha utilizado una solución de tripsina-EDTA al 0,05% y 0,025%, respectivamente (ICN Flow Laboratories, Escocia).

3.3.5 Dextrano T-70

Se ha utilizado una suspensión de carbón y dextrano para la preparación del suero libre de estrógenos. El dextrano T-70 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia) es una macromolécula que tiene la capacidad de formar un complejo con el carbón y por adsorción extraer del suero los estrógenos endógenos así como otras moléculas de bajo peso.

3.3.6 Carbón activado

El carbón activado (Charcoal Activated, Sigma) se ha utilizado junto con el Dextrano T-70 en el proceso de eliminación de los estrógenos endógenos del suero.

3.3.7 Hormonas

Como compuesto estrogénico patrón se ha empleado el estradiol-17 β (E₂) (Sigma). Se preparó para ello una solución stock en etanol a una concentración de 1 mM. La concentración final de etanol en los cultivos no superó el 0,1%.

3.3.8 Reactivos para el test de sulforrodamina-B

La tinción de la monocapa celular se llevó a cabo tras la fijación de las células con tricloroacético (Merck) y su posterior tinción con una solución al 0.4% de sulforrodamina-B (Sigma) en 1% de ácido acético (Merck).

3.3.9 Reactivos para cuantificación de actividad luciferasa

Para la cuantificación de la actividad luciferasa se utilizó el kit Luciferasa Assay System suministrado por Promega (EE.UU.).

3.3.10 Reactivos para pS2

Para la cuantificación del contenido en el medio de cultivo extracelular de la proteína pS2 se ha utilizado el kit comercial ELSA-PS2 (CIS Bio International, Francia).

3.3.11 Reactivos para cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas tisulares, citosólicas y del medio de cultivo celular se efectuó mediante la técnica y reactivos del BioRad Protein Assay y Coomassie Protein Assay (BioRad, EE.UU.).

3.3.12 Disolventes y otros reactivos

Se han utilizado n-hexano, metanol y 2-isopropanol (UV-IR-HPLC preparativa- PAR) para análisis instrumental de Panreac (España), bromuro de etidio, glicerol, cloroformo, ácido clorhídrico y etanol suministrados por Merck; Trizol de GibcoBrl, cloroformo, isopropanol, etanol, cloruro sódico, formaldehído, formamida, rojo fenol, ADN de esperma de salmón, azul de dextrano y sulfato de dextrano proporcionados por Sigma; dietilpirocarbonato de Aldrich y agarosa y azul de bromofenol de Boehringer Mannheim (Alemania), respectivamente.

3.3.13 Compuestos químicos patrones

Como compuestos químicos patrones hemos utilizado: lindano, aldrín, dieldrín, endrín, mirex, o,p'-DDT, p,p'-DDT, metoxicloro, endosulfán I y endosulfán II suministrados por Sulpeco (EE.UU.); o,p'-DDD y p,p'-diclorobenzofenona del Lab. Dr. Ehrenstorfer (Alemania); p,p'-DDE de Chem Service (EE.UU.) y kepona de Ultra Scientific (EE.UU.). Los compuestos Endosulfán-éter, endosulfán-lactona, endosulfán-diol y endosulfán-sulfato fueron donados por Agrevo, los diferentes derivados bisfenoles, identificados como MM1, MM2, MM3, MM4, MM5, MM6, MM7, MM8, MM9, fueron donados por el Dr. M. Metzler (Universidad de Kaiserslautern, Alemania), y el antiestrógeno RU 58,668 fué donado por Roussel Uclaf (Romainville, Francia).

3.3.14 Tampones y soluciones

En el trabajo experimental desarrollado han sido utilizados los siguientes tampones y soluciones:

- Denhardt's 50 x (BSA 1%, Ficoll 400 1% y polivinilpirrolidina 1%).
- MOPS/EDTA buffer (MOPS 0,2 M, acetato de sodio 50mM, EDTA 10 mM, pH 7).
- PBS (NaCl 0,14M, KCl 2,6mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Na₂HPO₄ 10mM, pH 7,4).
- SDS 10%.
- SSC 20 x (NaCl 3M, citrato sódico 0,3M, pH 7,0).
- Solución de prehibridación (ADN de esperma de salmón 10 mg/ml, sulfato de dextrano 50%, formamida 50%, SDS 10%, trisbuffer, Denhardt's 50 x, SSPE 20 x).

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN

3.4.1 Sujetos de estudio

El presente trabajo se encuadra dentro de un estudio epidemiológico de cáncer de mama de base hospitalaria. Los hospitales participantes han sido el Hospital Clínico "San Cecilio" y el Hospital "Virgen de las Nieves" de Granada y el Hospital "Torrecárdenas" de Almería.

Se han incluido un total de 200 pacientes, cien de ellas diagnosticadas de cáncer mamario. Todas ellas fueron previamente informadas de los objetivos de la investigación propuestos, consintiendo en participar en el proyecto. Los criterios para la definición de caso y control fueron:

Caso: Mujer de 33 a 75 años diagnosticada e intervenida quirúrgicamente de cáncer de mama en el periodo de estudio (1996-1998).

Control: Paciente afecta de patología no oncológica ni endocrina emparejada con la anterior en términos de edad (± 3 años). Se planteó, inicialmente, una relación 1:2 caso/control.

Las distribución por edades de la muestra analizada se resume en la tabla 3.1

Tabla 3.1

	Casos (años)	Controles (años)
Máximo	71	73
Mínimo	35	33
Mediana	56	59
Media	55,5	56,5
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	10,1	11,2

3.4.2 Obtención de las muestras

Las muestras de tejido adiposo, se obtuvieron, para las pacientes control, en quirófano y, para los casos, en los Servicios de Anatomía Patológica de los hospitales participantes a partir de piezas de tejido mamario. Se tomaron aproximadamente 10 gramos de tejido en cada muestra que, previa identificación, se congelaron a -70°C .

Para cada uno de los casos se toman, además, muestras de 0,5 x 0,5 cm de diámetro del tumor mamario intervenido. Las muestras tumorales se congelaron igualmente a -70°C en lugar apropiado, hasta su traslado al Hospital Clínico en donde se almacenaron en N_2 líquido.

Paralelamente, se procedió a la obtención de las muestras sanguíneas de los casos y controles, utilizándose viales de cristal sin heparina ni anticoagulantes (20-25 ml de sangre fresca de los que, tras coagulación, se separó y congeló el suero de manera inmediata en viales de cristal, procediéndose posteriormente a su identificación).

3.4.3. Evaluación de factores de riesgo/exposición

Una vez obtenido el consentimiento del paciente para participar en el estudio, el instrumento utilizado para la recogida de datos fue un cuestionario con información muy diversa de cada paciente (Anexo I) estructurado en la siguiente forma:

1.- Sección/Características Socio-demográficas:

Incluye datos estándar como fecha de nacimiento, tipo de residencia (rural/urbana), tiempo de residencia en cada lugar, nivel de escolaridad y ocupación. En el apartado de ocupación se hace hincapié en las ocupaciones agrícolas y en la exposición a plaguicidas.

2.-Sección/Historia familiar de cáncer de mama:

Contiene información acerca de los casos diagnosticados de cáncer de mama o tumoración mamaria benigna entre los familiares de 1^{er} o 2^o grado.

3.- Sección/Historia reproductiva:

Los ítemes incluidos en este apartado hacen referencia a edad de la menarquía y de la menopausia, interrupciones de regla, nº de embarazos, número de hijos y edad respectiva de los mismos (incluidos los fallecidos), regularidad y duración de la regla, y lactancia y duración de la misma para cada hijo.

4.- Sección/Anticonceptivos y terapia hormonal:

En esta sección del cuestionario se recoge información acerca del uso de anticonceptivos, tipo y duración, así como de los tratamientos sustitutivos de hormonas, si los hubiere.

5.- Sección/Aspectos relacionados con la nutrición:

Se persigue con esta sección conocer de forma general el tipo y la frecuencia de alimentos consumidos por semana e incluye datos acerca del consumo de alcohol y tabaco y medidas antropométricas de peso y talla

6.- Sección/Muestras biológicas:

Figuran en ella los resultados de la aplicación de las técnicas analíticas a las muestras biológicas de los sujetos objeto de estudio.

El cuestionario se ha realizado por encuestadores adiestrados, uno por cada área geográfica (Almería/Granada). La encuesta epidemiológica se realizó de manera completa a cada uno de los casos y controles, durante el tiempo de hospitalización de los mismos, antes en todo caso de la intervención quirúrgica a que fueron sometidos. A cada encuesta se le asignó un código de identificación idéntico al definido para la muestra de sangre y tumor/tejido adiposo.

3.4.4 Identificación de encuestas y muestras

A cada paciente se le asignó un número de identificación común para la muestra de grasa y de suero y el cuestionario de la encuesta.

En Granada:

Hospital Clínico: clave 1000.

Hospital Virgen de las Nieves: clave 2000.

En Almería:

Hospital Torrecárdenas: clave 4000.

3.5 METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA

3.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa

Para el desarrollo de esta técnica hemos utilizado el cromatógrafo líquido de alta resolución Watters 501 Millipore, descrito previamente en el apartado 3.1.16, con arreglo a las condiciones que se especifican a continuación:

Detector: UV/VV a 280 nm
Solventes: * Fase A: n- Hexano
 * Fase B: n-Hexano- Metanol- Isopropanol: 40:45:15 (v/v)
Flujo: 1 ml/min

El programa de gradiente se recoge en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Gradiente HPLC

Tiempo (min)	Fase A	Fase B
0	100	0
2	100	0
17	60	40
22	0	100
32	100	0

Tiempo total de cromatograma 32 minutos

3.5.2 Cromatografía de gases (CG)

Se ha trabajado con el cromatógrafo de gases Varian-3350 descrito en el apartado 3.1.16, siguiendo las condiciones de trabajo que se describen a continuación:

Detector: captura de electrones, T° de 300°C.

inyector: T° de 250°C.

Gas portador: Nitrógeno, flujo de 40 ml/minuto.

Volumen de inyección: 1 µl.

Programa:

T° inicial 130°C (1 min)

Rampa de 20°C/min. hasta 150°C

Rampa de 10°C/min. hasta 200°C

Rampa de 20°C/min. hasta 260°C (20 min)

3.5.3 Análisis cualitativo

3.5.3.1 Cromatografía de gases

3.5.3.1.1 Preparación de las disoluciones de trabajo

Para la puesta a punto y la realización del método cromatográfico se han preparado disoluciones de los pesticidas organoclorados en hexano. Las concentraciones de trabajo oscilaron entre 0,1-200 ng/ml de cada producto. La solución madre a partir de la cual se hicieron las diluciones de trabajo se preparó a una concentración de 0,1 mg/ml y se almacenó en la oscuridad, a una temperatura de 4°C hasta su empleo.

Por otra parte, con objeto de identificar los pesticidas objeto del presente estudio, se han establecido los tiempos de retención correspondientes.

3.5.3.1.2 Cálculo de los tiempos de retención

Partiendo de disoluciones del orden de 0,01 µg/ml se determinaron los tiempos de retención medios de cada uno de los productos. Las condiciones de trabajo fueron las descritas anteriormente y el volumen de inyección 1µl. En las tablas 3.3 a 3.5 se muestran la media de los tiempos de retención (TR) de 10 medidas para cada producto junto con la desviación estándar ($\pm \sigma$).

La figuras 3.1 corresponde a los cromatogramas de las disoluciones preparadas con mezclas de los pesticidas analizados en concentraciones similares.

Tabla 3.3: Tiempos de retención (min)

Producto	TR $\pm \sigma$
Lindano	7,989 \pm 0,0182
Aldrín	9,776 \pm 0,0223
Dieldrín	11,53 \pm 0,0261
Endrín	11,80 \pm 0,0269
Mirex	15,62 \pm 0,0355

Tabla 3.4: Tiempos de retención (min)

Producto	TR ± σ
p,p'-DDE	11,29 ± 0,0257
o,p'-DDD	11,41 ± 0,0263
o,p'-DDT	12,13 ± 0,0276
p,p'-DDT	12,71 ± 0,0288
Metoxicloro	13,81 ± 0,0315

Tabla 3.5: Tiempos de retención(min)

Producto	TR ± σ
Endosulfán- éter	8,866 ± 0,0202
Endosulfán-lactona	10,19 ± 0,0232
Endosulfán- diol	10,48 ± 0,0239
Endosulfán I	11,04 ± 0,0252
Endosulfán II	11,87 ± 0,0283
Endosulfán- sulfato	12,61 ± 0,0287

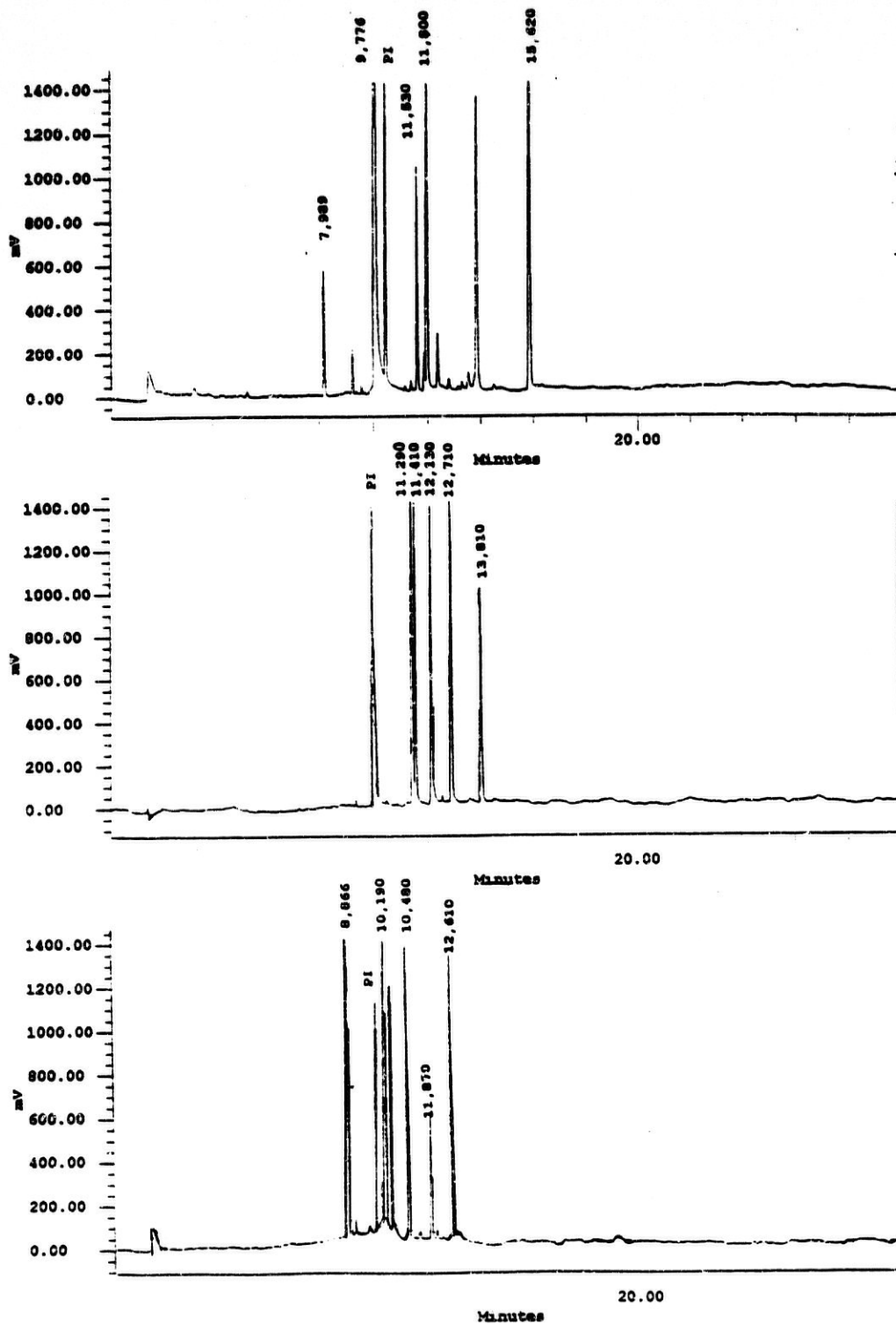


Fig 3.1

3.5.4 Análisis cuantitativo

3.5.4.1 Método del patrón interno

Identificadas, tras el análisis cualitativo, las sustancias problema en las que interesa determinar su concentración en la muestra biológica estudiada, el método del patrón interno consiste en la utilización de un compuesto patrón, que cumpla las siguientes condiciones:

- Aparecer en el cromatograma cerca de los componentes objeto de la medida.
- Ser químicamente semejante a los componentes de la muestra.
- Expresarse a una concentración que ha de ser lo más aproximada posible a la de los componentes de la muestra.

La sustancia elegida como patrón interno para realizar los análisis de las muestras es la p,p'-diclorobenzofenol, debido a que cumple todos los requisitos anteriormente enunciados. La disolución patrón se prepara con una concentración de 0,1 mg/ml en hexano y a partir de aquí, se procede a realizar las diluciones correspondientes, hasta una concentración de 1 µg/ml. Se inyecta en el cromatógrafo de gases 1 µl y se obtiene un tiempo de retención medio de $9,87 \pm 0,0226$ min.

3.5.4.2 Comportamiento analítico del patrón interno

3.5.4.2.1 Comprobación de la reproducibilidad

Se inyectó 1 μ l de la disolución en hexano de la p,p'-diclorobenzofenona (concentración 1 μ g/ml), en diez ensayos consecutivos para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en las condiciones cromatográficas establecidas. El área media obtenida y su correspondiente desviación estándar fue de $2.992.683 \pm 33.398$

3.5.4.2.2 Cálculo de la curva de calibrado

Para la determinación de la curva de calibrado de la p,p'-diclorobenzofenona se prepararon disoluciones de concentración comprendidas entre 0,03 -1,5 μ g/ml en hexano.

El valor medio de las áreas deducidas a partir de 10 medidas concordantes para cada concentración, así como su tratamiento estadístico se recogen en la tabla 3.6. La figura 3.2 muestra la recta de calibrado de la p,p'-diclorobenzofenona, así como la ecuación de la recta.

Tabla 3.6: Calibración para p,p'-diclorobenzofenona

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Area Media n=10	Desviación estándar $\pm\sigma$
0,03	308495	40075
0,3	1037584	29805
1	2992683	33398
1,5	3792771	51165

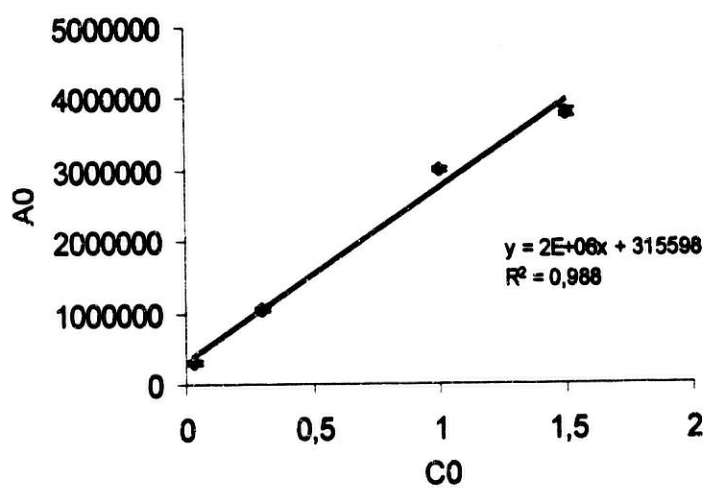


Fig 3.2: Curva de calibrado para p,p'-diclorobenzofenona

3.5.4.3 Reproducibilidad del método cromatográfico

A partir de las soluciones patrón en hexano de los pesticidas organoclorados se prepararon disoluciones de cada uno de ellos en concentraciones conocidas. Se inyectó 1 μ i de cada una de ellas en el cromatógrafo de gases y se comprobó la reproducibilidad del método estudiando los cromatogramas obtenidos a partir de diez ensayos concordantes. Los valores medios, así como el tratamiento estadístico correspondiente para cada uno de los pesticidas, se recoge en las tablas 3.7 a 3.9.

Tabla 3.7

Producto	A_1/A_0 n=10	Desviación estándar $\pm\sigma$
Lindano	0,282	0,009
Aldrin	0,246	0,009
Dieldrin	0,172	0,002
Endrin	0,101	0,008
Mirex	0,120	0,003



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Tabla 3.6: Calibración para p,p'-diclorobenzofenona

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Area Media n=10	Desviación estándar $\pm\sigma$
0,03	308495	40075
0,3	1037584	29805
1	2992683	33398
1,5	3792771	51165

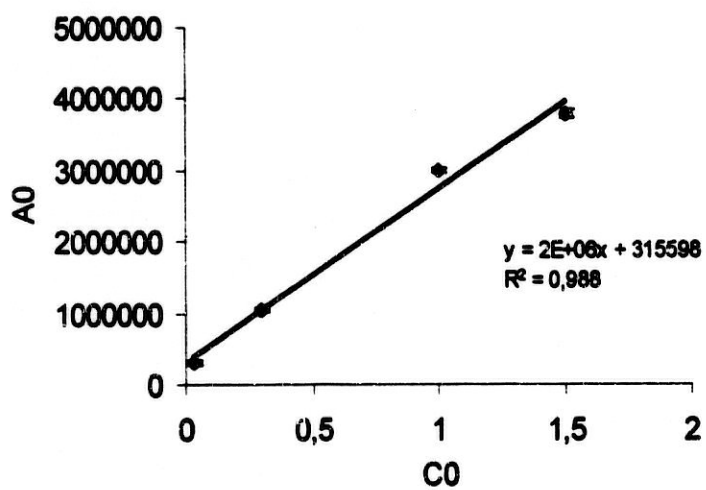


Fig 3.2: Curva de calibrado para p,p'-diclorobenzofenona

3.5.4.3 Reproducibilidad del método cromatográfico

A partir de las soluciones patrón en hexano de los pesticidas organoclorados se prepararon disoluciones de cada uno de ellos en concentraciones conocidas. Se inyectó 1 μ l de cada una de ellas en el cromatógrafo de gases y se comprobó la reproducibilidad del método estudiando los cromatogramas obtenidos a partir de diez ensayos concordantes. Los valores medios, así como el tratamiento estadístico correspondiente para cada uno de los pesticidas, se recoge en las tablas 3.7 a 3.9.

Tabla 3.7

Producto	A_1/A_0 n=10	Desviación estándar $\pm\sigma$
Lindano	0,282	0,009
Aldrin	0,246	0,009
Dieldrin	0,172	0,002
Endrin	0,101	0,008
Mirex	0,120	0,003

Tabla 3.8

Producto	A₁/A₀ n=10	Desviación estándar ±σ
p,p'-DDE	0,081	0,006
o,p'-DDD	0,033	0,003
o,p'-DDT	0,155	0,012
p,p'-DDT	0,045	0,009
Metoxicloro	0,093	0,008

Tabla 3.9

Producto	A₁/A₀ n=10	Desviación estándar ±σ
Endosulfán- éter	0,498	0,018
Endosulfán-lactona	0,634	0,024
Endosulfán- diol	0,304	0,017
Endosulfán I	0,255	0,004
Endosulfán II	0,081	0,006
Endosulfán- sulfato	0,220	0,012

3.5.4.4 Limite de detección y limite de cuantificación

Con objeto de fijar una base para obtener uniformidad en la adquisición y evaluación de datos analíticos en la determinación de contaminantes medio ambientales Mac Dougall y cols. (1980) propusieron dar respuesta a dos conceptos analíticos diferenciados, denominados limite de detección y limite de cuantificación.

El limite de detección se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de un elemento que se puede determinar analíticamente (Long y Wineffordner, 1983). Para la determinación de dicho limite deben realizarse de modo general medidas en blanco con objeto de definir las diferencias estadísticas pertinentes en estas condiciones, la media del valor de la respuesta del blanco, X_B , se puede calcular de acuerdo con la expresión:

$$X_B = \frac{\sum_{j=1}^{n_B} X_{Bj}}{n_B}$$

Siendo n_B el número de medidas en blanco.

Desviación estándar expresada como:

$$\sigma = \frac{\sum (X_{Bj} - X_B)^2}{(n_B - 1)}$$

Un valor n_B de igual a 20 se considera según los autores citados y la IUPAC como

adecuados para validar la desviación estándar.

Finalmente, para definir el límite de detección en concentraciones cualesquiera (C_L), la IUPAC ha considerado que:

$$X_L = X_B + K \sigma_B$$

Si se hace $K=3$, el nivel de confianza definido estadísticamente es del orden del 99,86%. Este valor ($K=3$) ha sido, por ello utilizado para el cálculo de los límites de detección en nuestro trabajo.

Por otra parte, el límite de cuantificación debe establecerse según un criterio estricto que nos lleva a situar la región de cuantificación claramente por encima del límite de detección. De acuerdo con su definición, el límite de cuantificación está localizado por encima de la media del blanco de acuerdo con la expresión:

$$S_t - S_b \geq K_q \cdot \sigma$$

relación en la que S_b es la señal de la medida en blanco. Como quiera, por último, que el valor mínimo de la constante K_q se recomienda que sea igual a 10, parece claro que S_t (señal apreciable) será:

$$S_t \geq (S_b + 10 \sigma)$$

La tabla 3.10 representa, a este respecto, las regiones de medida analítica relacionados con σ .

Tabla 3.10: Regiones de medida analítica

<u>Señal del analito (Sx)</u>	
< 3 σ	analito no detectado
3 σ a 10 σ	región de detección
> 10 σ	región de cuantificación

Pues bien, de acuerdo con los anteriores criterios se han determinado para cada uno de los pesticidas organoclorados analizados los límites de detección y cuantificación en las condiciones de trabajo establecidas de acuerdo con la realización de 20 medidas concordantes. En la tabla 3.11 y 3.12 se recogen los límites de detección y los límites de cuantificación, respectivamente de tales productos.

Tabla 3.11: Límites de detección

Producto	Concentración Límite (ng/ml)
Lindano	0,5
Aldrin	1,0
Dieldrin	1,0
Endrin	3,0
Mirex	5,0
p,p'-DDE	5,0
o,p'-DDD	5,0
o,p'-DDT	0,5
p,p'-DDT	5,0
Metoxicloro	1,0
Endosulfán-éter	0,1
Endosulfán-lactona	2,0
Endosulfán-diol	0,5
Endosulfán I	0,5
Endosulfán II	2,0
Endosulfán-sulfato	0,5

Tabla 3.12: Límites de cuantificación

Producto	Concentración Límite (ng/ml)
Lindano	1,0
Aldrin	3,0
Dieldrin	5,0
Endrin	25,0
Mirex	10,0
p,p'-DDE	10,0
o,p'-DDD	10,0
o,p'-DDT	1,0
p,p'-DDT	10,0
Metoxicloro	5,0
Endosulfán-éter	0,5
Endosulfán-lactona	5,0
Endosulfán-diol	1,0
Endosulfán I	1,0
Endosulfán II	10,0
Endosulfán-sulfato	5,0

3.5.4.5 Cálculo del factor de respuesta

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas para el análisis de una mezcla del componente puro (i) y el patrón interno (o), para llevar a cabo la determinación experimental de los factores de respuesta se procesan mezclas en las cuales es bien conocida la concentración del patrón interno (C_o) y de la sustancia problema (C_i). Una vez obtenidos los correspondientes cromatogramas, el valor del factor de respuesta viene dado por la ecuación:

$$F_i = \frac{A_o C_i}{A_i C_o}$$

A_o = área del patrón
 A_i = área del producto

Una vez conocido el factor de respuesta para cada producto, su concentración en las muestras problema se determina a partir de la siguiente expresión:

$$C_i = \frac{F_i A_i C_o}{A_o}$$

Aplicando esta metodología y siguiendo el cálculo matemático propuesto, se muestra a continuación el factor de respuesta estimado para los diferentes pesticidas organoclorados incluidos en el trabajo.

3.5.4.5.1 Cálculo del factor de respuesta para el lindano

Para realizar el cálculo del factor de respuesta se prepararon cinco disoluciones de lindano a concentraciones comprendidas entre 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$. A un 1 ml de cada disolución se añadieron 100 μl de una disolución 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-diclorobenzofenona para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ del patrón interno. Se inyectó a continuación 1 μl de cada disolución, en cinco ensayos diferentes, en las condiciones establecidas. Las relaciones de las áreas medias correspondientes junto a la desviación estándar quedan recogidas en la tabla 3.13. Con los datos obtenidos en dicha tabla hemos calculado los factores de respuesta correspondientes en la forma antes indicada.

Las curvas de calibrado obtenidas junto a las ecuaciones de la recta se indican en las figuras 3.3 a y 3.3 b.

Tabla 3.13

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,001	0,0270	0,0048	0,0404
0,005	0,1235	0,0131	
0,001	0,1861	0,0028	
0,030	0,2825	0,0099	0,1060
0,050	0,4889	0,0323	
0,100	0,8474	0,0157	

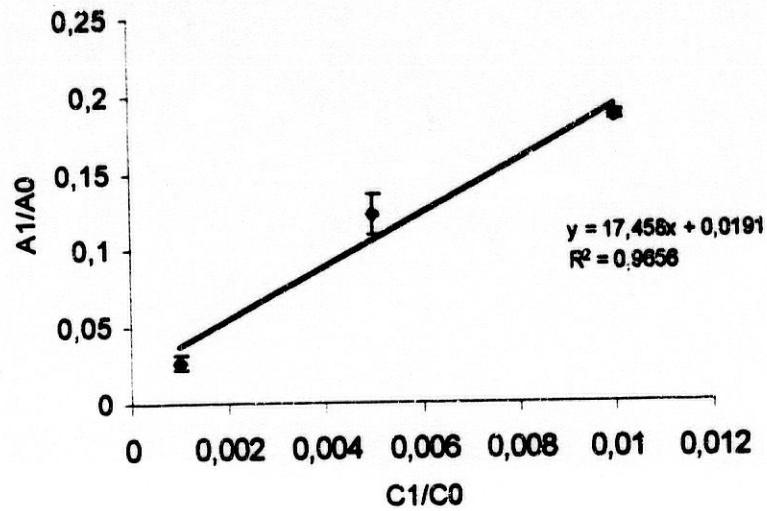


Fig 3.3a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para lindano para $A_i \leq 897.000$

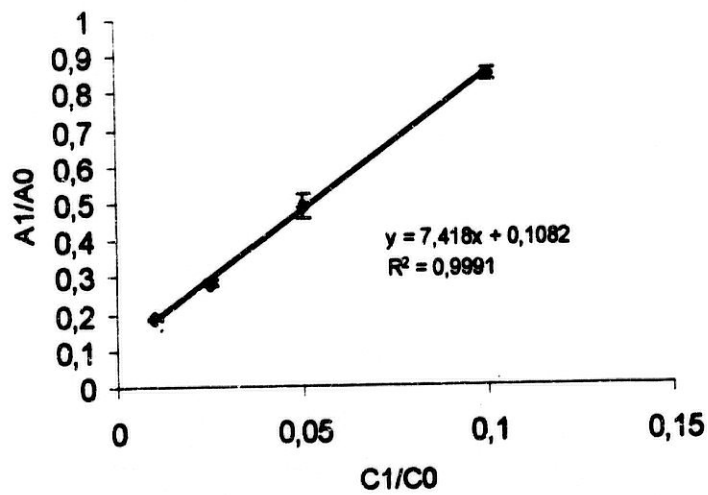


Fig 3.3b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para lindano para $A_i \geq 897.000$

3.5.4.5.2 Cálculo del factor de respuesta para el aldrín

Se prepararon siete disoluciones de aldrín a concentraciones comprendidas entre 0,2 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$. A cada disolución se le añadieron 100 μl de disolución 10 $\mu\text{g/ml}$ del patrón interno. Las relaciones de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes permitieron obtener los valores de la tabla 3.14.

Tabla 3.14

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,001	0,020	0,0009	0,1487
0,003	0,025	0,0005	
0,005	0,031	0,0008	
0,010	0,246	0,0097	0,1567
0,050	0,319	0,0103	
0,100	0,541	0,0372	
0,200	0,806	0,0348	

Las curvas de calibrado obtenidas junto a la ecuaciones de las rectas se indican en las figuras 3.4 a y 3.4 b.

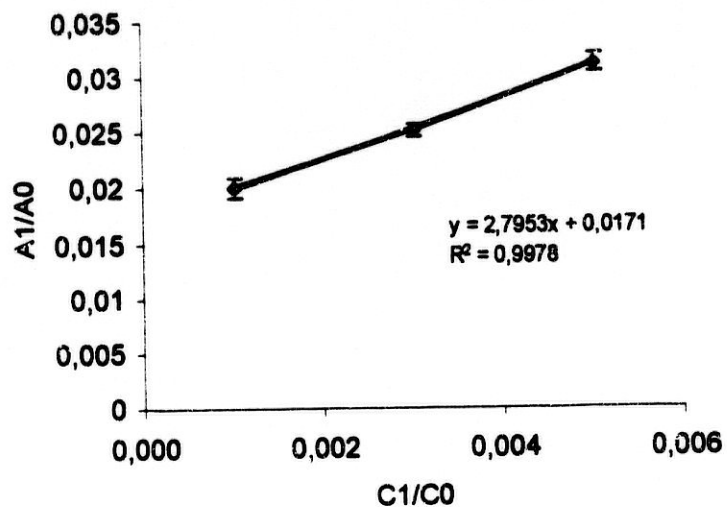


Fig 3.4a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para aldrin para $A_i \leq 106.000$

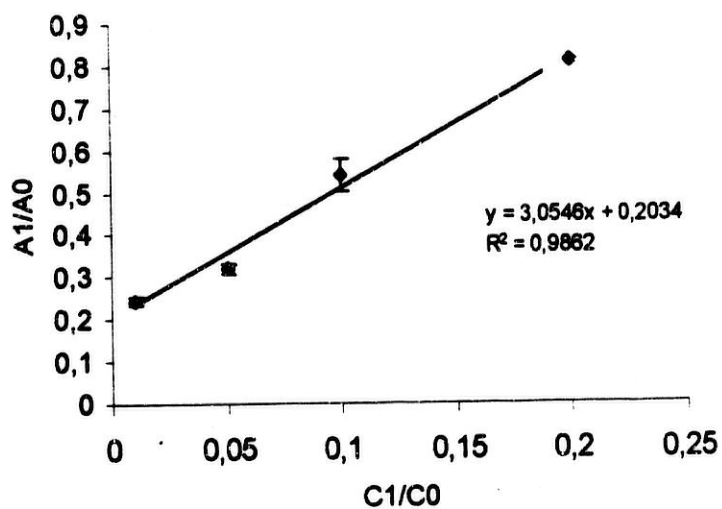


Fig 3.4b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para aldrin para $A_i \geq 106.000$

3.5.4.5.3 Cálculo del factor de respuesta para el dieldrín

Se prepararon disoluciones de dieldrín en las siguientes concentraciones: 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 0,03 $\mu\text{g/ml}$, 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,005 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$. Una vez añadido el patrón interno se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Los resultados obtenidos de cinco medidas concordantes quedan reflejados en la tabla 3.15 y en las figuras 3.5 a y 3.5 b, respectivamente.

Tabla 3.15

C_i/C_0	A_i/A_0	$\pm\sigma$	F
0,001	0,0431	0,0070	0,0741
0,005	0,0674	0,0028	
0,010	0,1728	0,0024	
0,030	0,3367	0,0184	0,1484
0,050	0,5677	0,0312	
0,100	0,8103	0,0124	

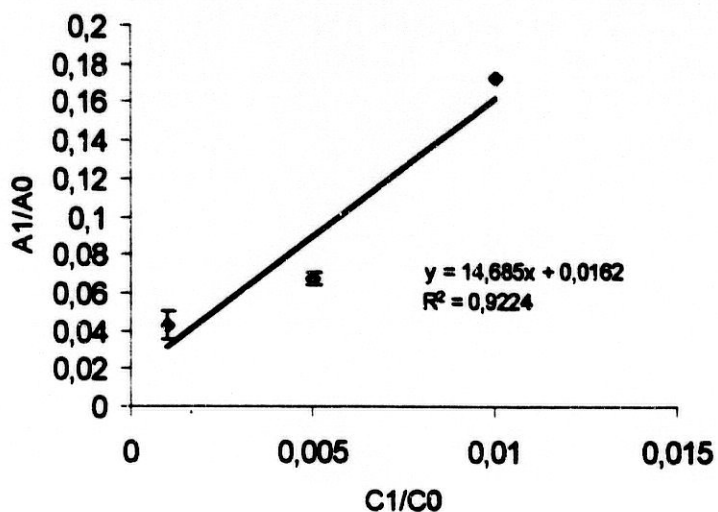


Fig 3.5a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para dieltrín $Ai \leq 710.000$

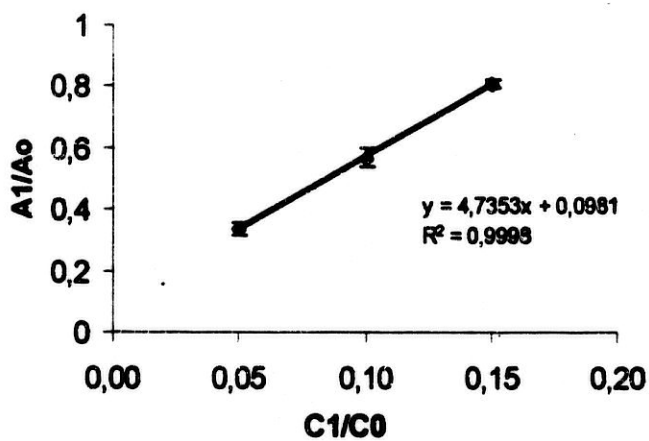


Fig 3.5b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para dieltrín para $Ai \geq 710.000$

3.5.4.5.4 Cálculo del factor de respuesta para el endrín

Se inyectaron en el cromatógrafo de gases cinco disoluciones de endrín a concentraciones comprendidas entre 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y 0,003 $\mu\text{g/ml}$, a las que se le había añadido p,p'-diclorobenzofenona a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$

Los valores de la tabla 3.16 se han obtenido a partir de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes y con los valores recogidos en la misma hemos construido la curva de calibrado para el endrín que se presenta en la figura 3.6.

Tabla 3.16

C_i/C_0	A_i/A_0	$\pm\sigma$	F
0,003	0,0419	0,0047	0,2443
0,025	0,1014	0,0084	
0,100	0,4092	0,0310	
0,200	0,6737	0,0190	
0,300	1,1559	0,0292	

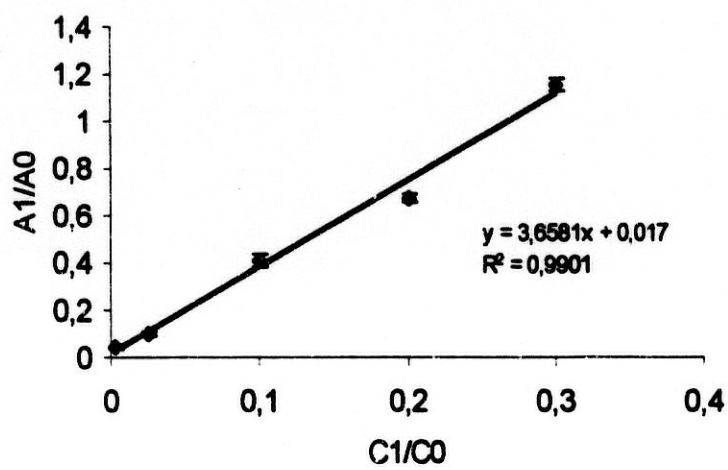


Fig 3.6: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endrín

3.5.4.5.5 Cálculo del factor de respuesta para el mirex

A partir de la disolución madre de mirex se prepararon cuatro disoluciones de mirex en concentraciones comprendidas entre 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y se añadieron a continuación 100 μl de una disolución de concentración 1 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-diclorobenzofenona.

La tabla 3.17 ha sido construida con los valores de las relaciones de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes, a partir de las cuales se ha construido la curva de calibrado y calculado la ecuación de la recta para el mirex en la forma expresada en la figura 3.7.

Tabla 3.17

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,01	0,1208	0,0030	0,2936
0,10	0,3623	0,0173	
0,30	0,7146	0,1088	
0,50	1,2627	0,1632	



Fig 3.7: Curva de calibrado y ecuación de la recta para mirex

3.5.4.5.6 Cálculo del factor de respuesta para el p,p'-DDE

Partiendo de una disolución de p,p'-DDE de 1 µg/ml se prepararon disoluciones a concentraciones comprendidas entre 0,2 µg/ml y 0,01 µg/ml. El patrón interno se añadió a la misma concentración que en los casos anteriores.

Las áreas medias de cinco cromatogramas correspondientes a cada concentración han servido para construir la tabla 3.18 y a, partir de ella, la curva de calibrado para el p,p'-DDE que se presenta en la figura 3.8.

Tabla 3.18

C_i/C_0	A_i/A_0	$\pm\sigma$	F
0,01	0,0810	0,00662	0,1509
0,02	0,1399	0,0076	
0,05	0,3317	0,04340	
0,12	0,7488	0,07840	
0,20	1,1255	0,01975	

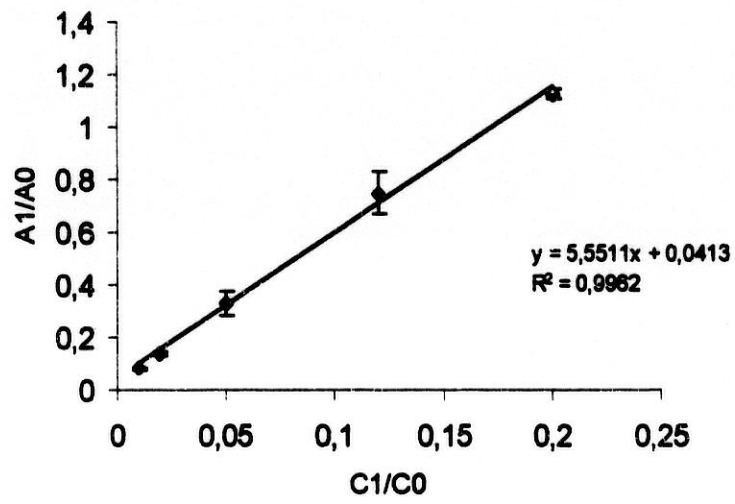


Fig 3.8: Curva de calibrado y ecuación de la recta para p,p'-DDE

3.5.4.5.7 Cálculo del factor de respuesta para el o,p'-DDD

Se inyectaron en el cromatógrafo de gases cinco disoluciones de o,p'-DDD a las concentraciones comprendidas entre 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y 0,005 $\mu\text{g/ml}$, previa la adición de 100 μl de una disolución de p,p'-diclorobenzofenona de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Los valores de la tabla 3.19 se han obtenido con las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes. La curva de calibrado para el o,p'-DDD se ofrece en la figura 3.9.

Tabla 3.19

C_i/C_0	A_i/A_0	$\pm\sigma$	F
0,005	0,0341	0,0203	0,8777
0,010	0,0337	0,0032	
0,050	0,0569	0,0001	
0,100	0,1208	0,0040	
0,250	0,2603	0,0101	
0,500	0,5157	0,0271	

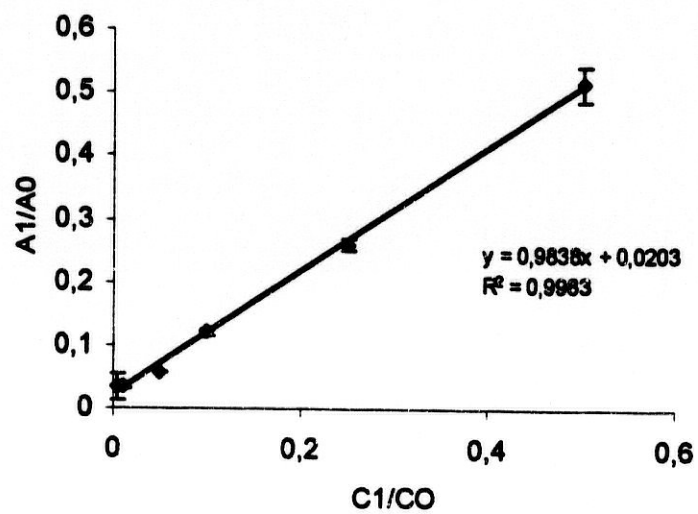


Fig 3.9: Curva de calibrado y ecuación de la recta para o,p'-DDD

3.5.4.5.8 Cálculo del factor de respuesta para el o,p'- DDT

Se prepararon disoluciones de o,p'- DDT con concentraciones comprendidas entre 0,2 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$, añadiéndose a cada una de ellas 100 μl de una disolución del patrón interno. En las condiciones de trabajo antes definidas, se inyectó 1 μl de las disoluciones citadas. Con los valores de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes hemos construido la tabla 3.20. Las curvas de calibrado para el o,p'- DDT se representan en las figuras 3.10 a y 3.10 b.

Tabla 3.20

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,001	0,0438	0,0039	0,2556
0,005	0,0818	0,0091	
0,010	0,1552	0,0128	
0,050	0,1870	0,0234	0,0611
0,100	0,3294	0,0403	
0,200	0,5164	0,0046	

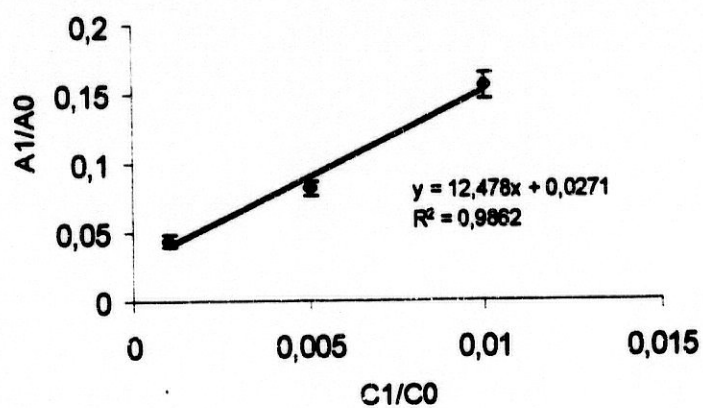


Fig 3.10a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para o,p'-DDT para $A_i \leq 730.000$

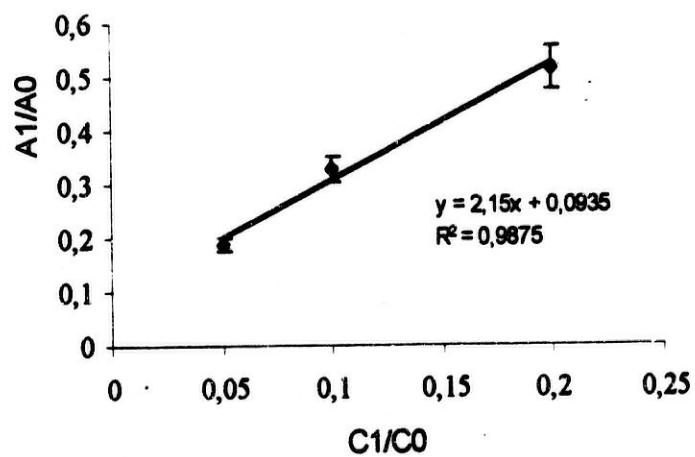


Fig 3.10b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para o,p'-DDT para $A_i \geq 730.000$

3.5.4.5.9 Cálculo del factor de respuesta para el p,p'-DDT

Se prepararon cuatro disoluciones del producto en concentraciones comprendidas entre 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y, al igual que en los casos anteriores, se añadieron 100 μl de disolución 1 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-diclorobenzofenona.

La tabla 3.21 presenta las relaciones de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes, a partir de las cuales se ha obtenido la curva de calibrado del producto (figura 3.11.).

Tabla 3.21

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,01	0,0458	0,0095	0,1638
0,02	0,1281	0,0090	
0,05	0,3670	0,0183	
0,10	0,6913	0,0257	

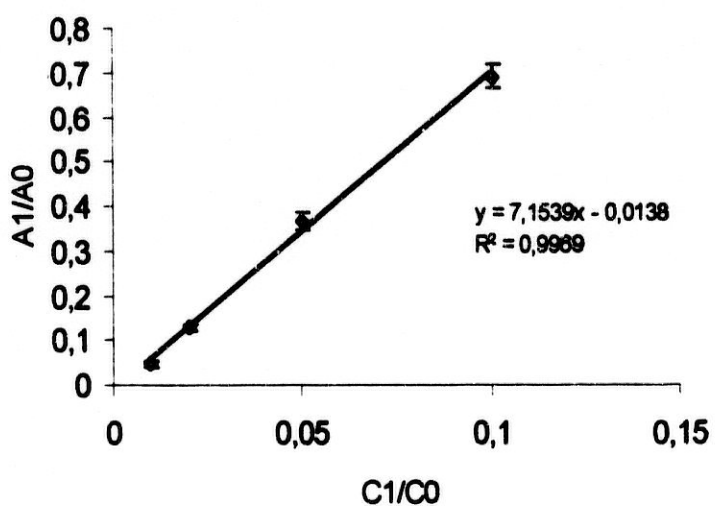


Fig 3.11: Curva de calibrado y ecuación de la recta para p,p'-DDT

3.5.4.5.10 Cálculo del factor de respuesta para el metoxicloro

Para realizar el cálculo del factor de respuesta de este compuesto se prepararon cinco disoluciones de metoxicloro a concentraciones comprendidas entre 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$. A 1 ml de cada disolución se añadió 100 μl de una disolución 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-diclorobenzofenona para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ del patrón interno, inyectándose a continuación 1 μl de cada disolución en cinco ensayos diferentes en las condiciones establecidas. Las relaciones de las áreas medias correspondientes se presentan en la tabla 3.22. Con los datos obtenidos en dicha tabla hemos calculado el factor de respuesta correspondiente, en la forma ya indicada.

La curva de calibrado obtenida junto a la ecuación de la recta se indica en la figura 3.12.

Tabla 3.22

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,001	0,0321	0,0082	0,0750
0,005	0,0571	0,0095	
0,010	0,0937	0,0086	

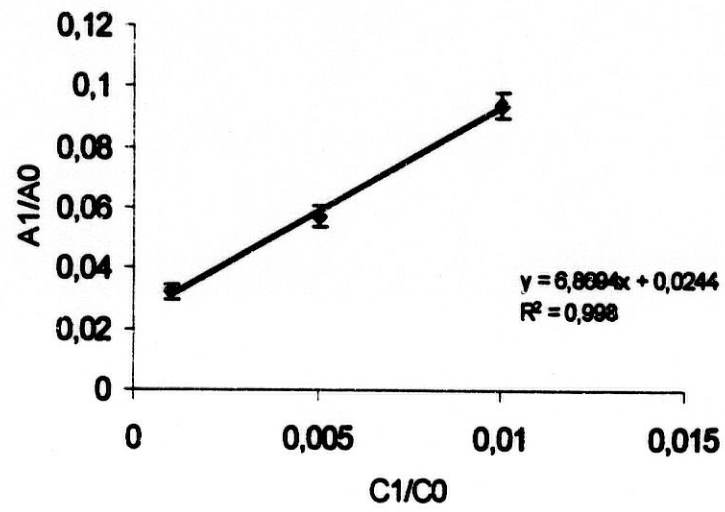


Fig 3.12: Curva de calibrado y ecuación de la recta del metoxicloro

3.5.4.5.11 Cálculo del factor de respuesta para el endosulfán-éter

Se inyectaron en el cromatógrafo de gases disoluciones comprendidas entre 0,02 µg/ml y 0,0001 µg/ml y a cada disolución se le añadió el patrón interno en la misma concentración que en los casos anteriores. Los valores de la tabla 3.23 se obtuvieron con las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes. Con dichos valores se construyeron las curvas de calibrado que se representan en las figuras 3.13 a y 3.13 b.

Tabla 3.23

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,0001	0,0151	0,0050	0,0200
0,0005	0,1012	0,0061	
0,001	0,2131	0,0047	
0,005	0,3235	0,0070	0,0049
0,010	0,4988	0,0185	
0,020	0,7286	0,0369	

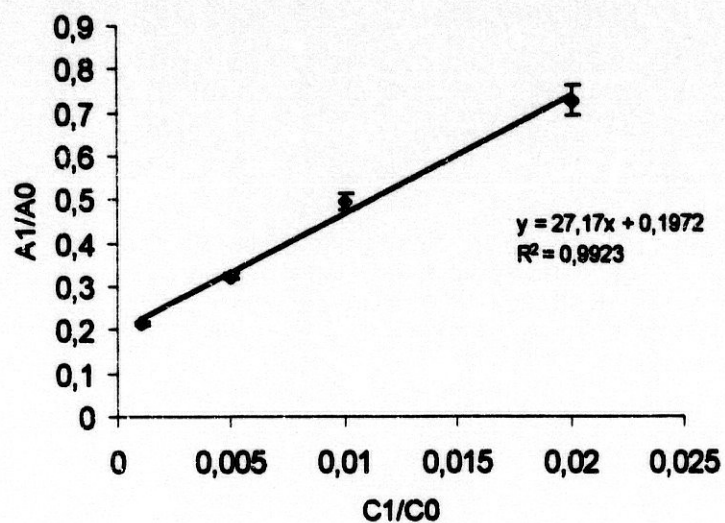


Fig 3.13a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán-éter para $A_i \leq 869.000$

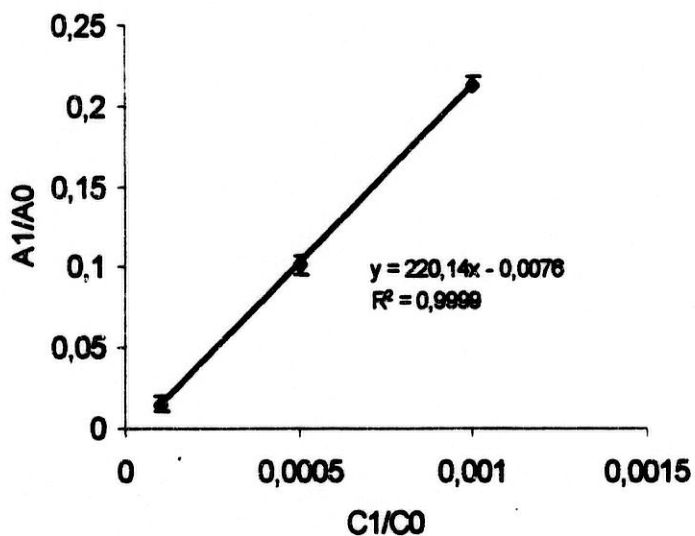


Fig3.13b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán-éter para $A_i \geq 869.000$

3.5.4.5.12 Cálculo del factor de respuesta para el endosulfán-lactona

A partir de la disolución madre de endosulfán-lactona se prepararon disoluciones de endosulfán-lactona en concentraciones comprendidas entre 0,02 $\mu\text{g/ml}$ y 0,005 $\mu\text{g/ml}$ y a 1 ml de cada disolución se añadió el patrón interno en la misma concentración que en los casos anteriores. La relaciones de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes se exponen en la tabla 3.24, con cuyos valores se construyó la curva de calibrado que se representa en la fig 3.14.

Tabla 3.24

C_i/C_o	A_i/A_o	$\pm\sigma$	F
0,005	0,3915	0,0418	0,0156
0,010	0,6348	0,0248	
0,020	0,9363	0,0060	

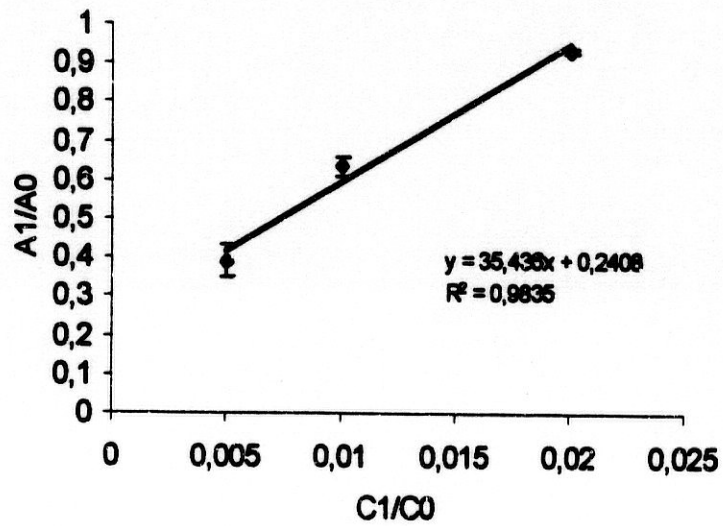


Fig 3.14: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán-lactona

3.5.4.5.13 Cálculo del factor de respuesta para el endosulfán-diol

Se prepararon cuatro disoluciones del producto en concentraciones comprendidas entre 0,02 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$ y una vez añadido a las mismas el patrón interno se inyectaron 1 μl de cada disolución en cinco ensayos distintos, en las condiciones ya conocidas.

La tabla 3.25 se construyó con los valores de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes. Con dichos valores se construyó la curva de calibrado que se representa en la figura 3.15.

Tabla 3.25

C_i/C_0	A_i/A_0	$\pm\sigma$	F
0,001	0,0601	0,0004	0,0290
0,005	0,1719	0,0285	
0,010	0,3041	0,0175	
0,020	0,3948	0,0963	

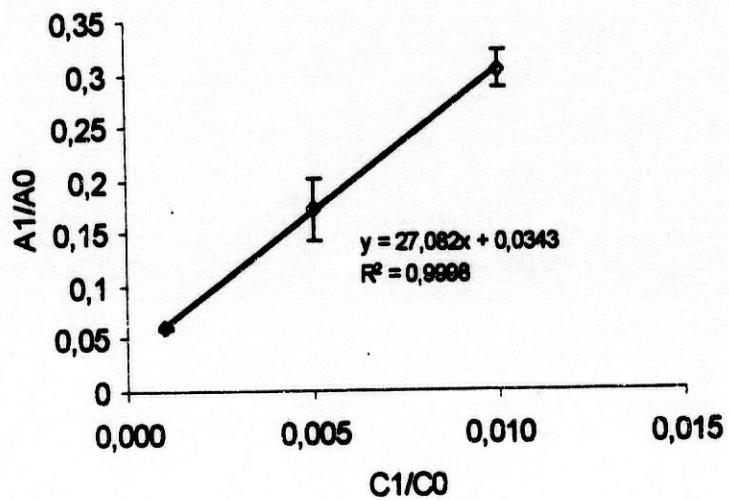


Fig 3.15: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán-diol

3.5.4.5.14 Cálculo del factor de respuesta para el endosulfán I

Se prepararon disoluciones del producto en concentraciones comprendidas entre 0,15 $\mu\text{g/ml}$ y 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ a las que se le añadieron 100 μl de disolución 1 $\mu\text{g/ml}$ de p,p'-diclorobenzofenona.

La tabla 3.26 se ha construido con los valores de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes. Las curvas de calibrado que se representan en la figuras 3.16a y 3.16b derivan de los datos de dicha tabla.

Tabla 3.26

C_1/C_0	A_1/A_0	$\pm\sigma$	F
0,0005	0,0573	0,0025	0,0134
0,0010	0,0742	0,00003	
0,0050	0,1528	0,0004	
0,0100	0,2551	0,0045	0,1347
0,0500	0,3370	0,0564	
0,1000	0,4613	0,0184	
0,1500	0,6032	0,0194	

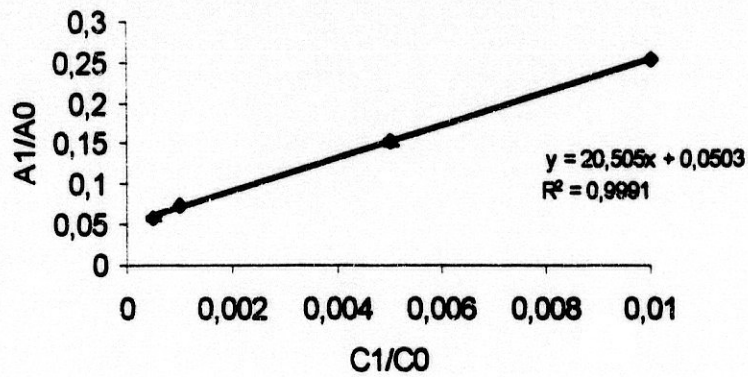


Fig 3.16a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán I para $A_i \leq 954.000$

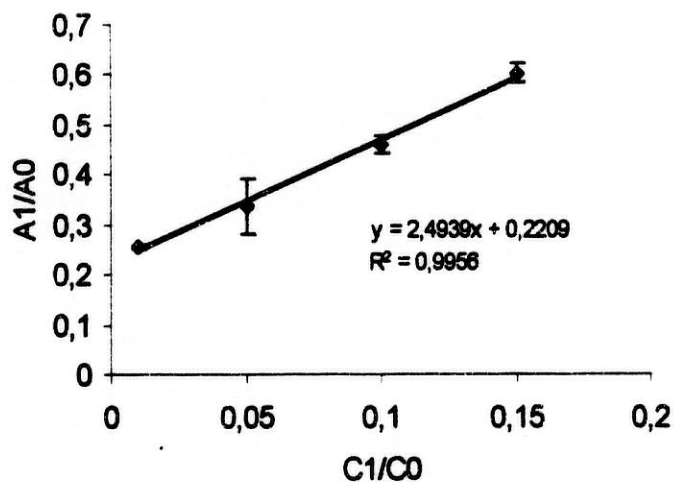


Fig 3.16b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán I para $A_i \geq 954.000$

3.5.4.5.15 Cálculo del factor de respuesta para el endosulfán II

Se prepararon disoluciones de endosulfán II en concentraciones comprendidas entre 0,2 µg/ml y 0,002 µg/ml y se inyectó 1 µl de cada disolución previa la adición del patrón interno en la concentración descrita anteriormente. Las relaciones de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes se recogen en la tabla 3.27, a partir de la cual se ha construido las curvas de calibrado que se representan en las figuras 3.17a y 3.17b.

Tabla 3.27

C_i/C_o	A_i/A_o	$\pm\sigma$	F
0,002	0,01360	0,0005	0,1507
0,01	0,08102	0,00663	
0,02	0,13993	0,00769	
0,05	0,33177	0,04340	0,1470
0,12	0,74882	0,07840	
0,20	1,12555	0,01975	

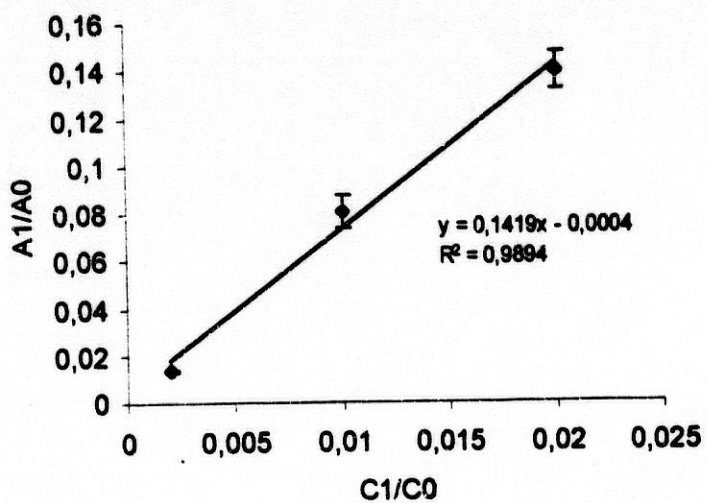


Fig 3.17a: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán II para $A_i < 500.000$

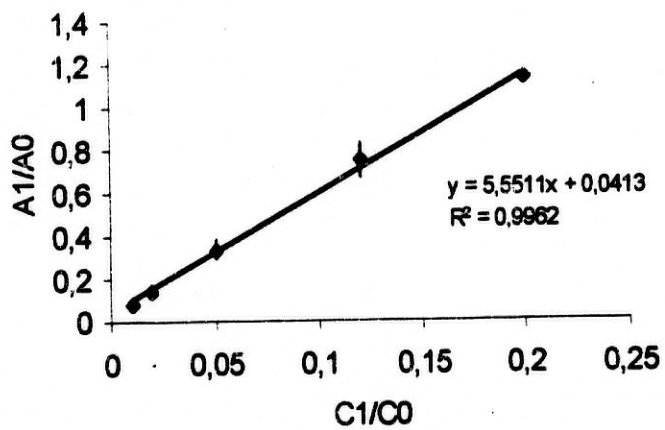


Fig 3.17b: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán II para $A_i \geq 500.000$

3.5.4.5.16 Cálculo del factor de respuesta para el endosulfán-sulfato

Se prepararon disoluciones de endosulfán-sulfato con concentraciones comprendidas entre 0,02 $\mu\text{g/ml}$ y 0,005 $\mu\text{g/ml}$, añadiéndose a cada disolución 100 μl de una disolución del patrón interno y en las condiciones de trabajo ya establecidas, se inyectó 1 μl de las disoluciones citadas.

La tabla 3.28 se ha construido con los valores de las áreas medias de cinco cromatogramas concordantes. La curva de calibrado que se representa en la figura 3.18 deriva de los valores de dicha tabla.

Tabla 3.28

C_i/C_o	A_i/A_o	$\pm\sigma$	F
0,005	0,1401	0,0007	0,0453
0,010	0,2203	0,0123	
0,020	0,3532	0,0122	

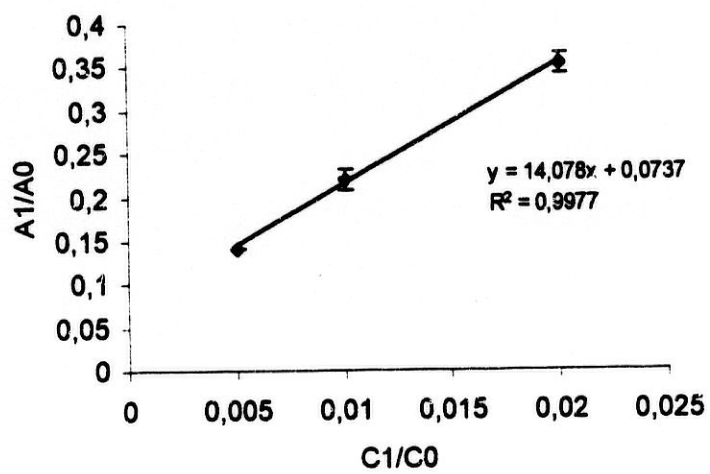


Fig 3.18: Curva de calibrado y ecuación de la recta para endosulfán- sulfato

3.5.4.6 Ecuaciones de las rectas

Las ecuaciones de las rectas obtenidas para cada producto, así como el coeficiente de correlación respectivo, deducido a partir de la relación cociente de áreas por cociente de concentraciones se recogen en la tablas 3.29 a 3.31.

Tabla 3.29

Producto	Ecuación de la recta ($y = a_0 x + a_1$)	R^2
Lindano	$A < 897.000$ $y = 24,11 x + 0,003$	1
	$A \geq 897.000$ $y = 7,418 x + 0,108$	0,999
Aldrín	$A < 106.000$ $y = 2,795 x + 0,017$	0,997
	$A \geq 106.000$ $y = 3,054 x + 0,203$	0,986
Dieldrín	$A < 710.000$ $y = 14,68 x + 0,016$	0,922
	$A \geq 710.000$ $y = 4,735 x + 0,098$	0,999
Endrín	$y = 3,658 x + 0,017$	0,990
Mirex	$y = 2,206 x + 0,100$	0,991

Tabla 3.30

Producto	Ecuación de la recta ($y = a_0 x + a_1$)	R ²
p,p'-DDE	$y = 5,551 x + 0,0413$	0,996
o,p'-DDD	$y = 0,983 x + 0,0203$	0,998
o,p'- DDT	A < 730.000 $y = 12,47 x + 0,027$	0,986
	A ≥ 730.000 $y = 2,150 x + 0,093$	0,987
p,p'- DDT	$y = 7,153 x - 0,0138$	0,996
Metoxicloro	$y = 6,869 x + 0,0244$	0,998

Tabla 3.31

Producto	Ecuación de la recta ($y = a_0 x + a_1$)	r ²
Endo-éter	A < 869.000 $y = 220,1 x - 0,007$	0,999
	A ≥ 869.000 $y = -27,17 x + 0,197$	0,992
Endo-lactona	$y = 35,43 x + 0,240$	0,983
Endo-diol	$y = 27,08 x + 0,034$	0,999
Endo I	A < 954.000 $y = 20,50 x + 0,050$	0,999
	A ≥ 954.000 $y = 2,493 x + 0,220$	0,995
Endo II	A < 500.000 $y = 0,141 x - 0,0004$	0,989
	A ≥ 500.000 $y = 5,550 x + 0,041$	0,996
Endo-sulfato	$y = 14,07 x + 0,073$	0,997

3.5.4.7 Comprobación de la exactitud de la técnica cromatográfica

La exactitud del método ha sido evaluada aplicando el cálculo estadístico a los datos experimentales obtenidos a partir de diez determinaciones de una solución patrón de cada uno de los productos objeto de estudio, utilizando las concentraciones de valor intermedio incluidas en las rectas de calibrado.

La concentración estimada para los distintos productos se ha calculado a partir del área del pico observada en cada caso, la del patrón interno y el factor de respuesta de cada uno de ellos.

Otros factores representativos de la precisión del método son:

$$\text{Desviación estándar: } (\sigma) = (\sum (x_i - \bar{x})^2 / n-1)^{1/2}$$

$$\text{Error estándar: (E.E. ó } \sigma_m) = \frac{\sigma}{n^{1/2}}$$

$$\text{Error relativo (\%): E.R.} = \frac{\sigma_m \cdot t}{x} \cdot 100$$

$$\text{Coeficiente de Variación (C.V.): C.V.} = \frac{\sigma}{x} \cdot 100$$

MATERIAL Y MÉTODOS

Estas medidas de dispersión dan idea de la distribución de los datos del análisis. Para un intervalo de confianza del 95%, el verdadero valor medio con un 95% de probabilidad, se encuentra entre los límites:

$$\bar{x} \pm \sigma_m \cdot t$$

Las tablas 3.32 a 3.34 detallan la comprobación de la técnica analítica propuesta para cada uno de los productos objeto de estudio.

Tabla 3.32

	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	0,0300	0,0500	0,0050	0,0250	0,500
Factor de respuesta medio (FRm)	0,0404	0,1567	0,0741	0,2443	0,2936
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	0,0290	0,0500	0,0048	0,0248	0,4890
Recuperación (%)	99,900	100,04	97,779	99,162	97,716
Desviación estándar (θ)	0,0010	0,0010	0,00021	0,0020	0,0550
Coficiente de variación (C.V.%)	3,5149	3,2527	4,2900	8,2700	11,2747
Error estándar (E.E.)	0,0003	0,0005	0,0006	0,0006	0,0174
Error relativo (E.R.)	2,1785	2,0160	26,596	5,1200	6,9881

Tabla 3.33

	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
Concentración real ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0,1200	0,1000	0,0100	0,0200	0,0050
Factor de respuesta medio (FR _m)	0,1509	0,8777	0,0611	0,1638	0,07509
Concentración media encontrada ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0,1130	0,1059	0,0095	0,0195	0,00485
Recuperación (%)	94,1806	105,9787	95,0273	97,7264	97,0000
Desviación estándar (θ)	0,0118	0,0035	0,0005	0,0027	0,0004
Coefficiente de variación (C.V.%)	10,4750	3,3605	5,8533	14,2357	8,3333
Error estándar (E.F.)	0,0037	0,0011	0,0001	0,0008	0,0001
Error relativo (E.R.)	6,4924	2,0828	3,6279	8,8233	5,1118

Tabla 3.34

	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
Concentración real (µg/ml)	0,0010	0,0100	0,0050	0,0500	0,1200	0,0100
Factor de respuesta medio (FRm)	0,0200	0,0156	0,0290	0,1347	0,1507	0,0453
Concentración media encontrada (µg/ml)	0,0009	0,0096	0,0049	0,0456	0,1127	0,0100
Recuperación (%)	96,7784	96,775	99,904	99,794	93,995	100,03
Desviación estándar(θ)	2,155e-5	0,0003	0,0008	0,0076	0,0118	0,0005
Coefficiente de variación (C.V.%)	2,2227	4,0147	16,6290	15,251	10,475	5,6060
Error estándar (E.E.)	6,817e-6	0,0001	0,0002	0,0024	0,0037	0,0001
Error relativo (E.R.)	1,3807	2,4883	10,306	10,337	6,4924	3,4750

3.6 METODOLOGÍA BIOLÓGICA

3.6.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células MCF7 y MVLN se cultivaron en monocapa en cajas T-25 y T-75 de poliestireno especialmente tratado, utilizando medios MEM o DME suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Para la regulación del pH del medio se utilizaron como tampón CO_2HNa y HEPES a concentraciones finales de 4,2 μl y 20 mM, respectivamente.

Ocasionalmente, con objeto de prevenir y evitar el crecimiento bacteriano, tan solo de forma ocasional, se procedió a la adición al medio de cultivo de penicilina, estreptomycinina y gentamicina.

Las soluciones de nueva preparación se reesterilizaron mediante su paso a través de unidades de filtración con filtros de 0,22 μm de tamaño de poro.

3.6.2 Preparación del suero libre de estrógenos

Con objeto de realizar cultivos celulares en medio libre de estrógenos, además de medio DME libre de rojo fenol (DME-RF), se utilizó suero humano desprovisto de estrógenos (CDHuS) una vez tratado éste con carbón dextrano. El método utilizado se puede resumir en los siguientes pasos:

1. Preparación de una disolución de carbón activo 5% en agua estéril. Agitación.
2. Centrifugación a 500 rpm durante 5 min.
3. Aspiración del sobrenadante y repetición del proceso de lavado por triplicado.
4. Adición de dextrano T-70, 0,5%, al precipitado de carbón.

5. Resuspensión de la mezcla de carbón y dextrano. Agitación.
6. Centrifugación durante 10 min. a 2.500 rpm.
7. Adición del suero al precipitado resultante, tras aspiración del sobrenadante.

Agitación.

8. Colocación en baño a 37° C con agitación continua durante 1 hora.
9. Centrifugación a 2.500 rpm durante 10 min.
10. Filtración del sobrenadante con filtros de esterilización de 0,22 µm de diámetro.
11. Almacenamiento del suero libre de estrógenos endógenos a -20° C hasta su uso.

3.6.3 Técnicas de mantenimiento

El subcultivo celular se llevó a cabo cuando el tapiz celular estuvo próximo a la confluencia. Para ello se procedió al despegue de las células del soporte de adherencia y a su tratamiento con una solución de Tripsina 0,05% y EDTA 0,025%. Una alícuota de la suspensión celular resultante se pasó a una nueva caja de cultivo con medio fresco convenientemente preparado. El control del estado del cultivo celular se realizó mediante análisis periódico utilizando un microscopio óptico invertido con contraste de fases.

3.6.4 Evaluación del número de células: Método de la sulforrodamina B (SRB)

Hemos empleado para ello la metodología descrita por Skehan (Skehan y cols., 1990), ligeramente modificada (Villalobos y cols., 1995); que se resume a continuación:

1. El tapiz celular se trata con ácido tricloroacético al 10%, frío, y se incuba durante 30 minutos a 4°C grados, lavándose a continuación con agua destilada y dejando secar las cajas.

3. Las células así fijadas se tiñen, durante 15 minutos, con sulforrodamina-B (SRB) al 0,4% en ácido acético al 1%.

4. Se lava posteriormente el tapiz con ácido acético al 1% y se dejan secar las placas de nuevo.

5. El colorante fijado sobre las células se solubiliza con una solución 10 mM Tris base (pH 10,5) con agitación suave.

6. Alícuotas de 100 µl se transfieren a placas de 96 pocillos y se leen en un colorímetro Titertek multiscan a 492 nm.

La tabla 3.35 muestra los valores del ensayo de Sulforrodamina-B para una densidad óptica de 492 nm y la figura 3.19 muestra la curva de calibrado para dicho test.

Tabla 3.35: Ensayo de Sulforrodamina-B (492 nm)

Nº células (x10 ³)	MCF7 D.O.
12,0	0,068±0,002
25,0	0,074±0,001
50,0	0,104±0,002
75,0	0,163±0,009
100,0	0,199±0,007
150,0	0,252±0,023
200,0	0,309±0,016
300,0	0,413±0,021
400,0	0,501±0,032

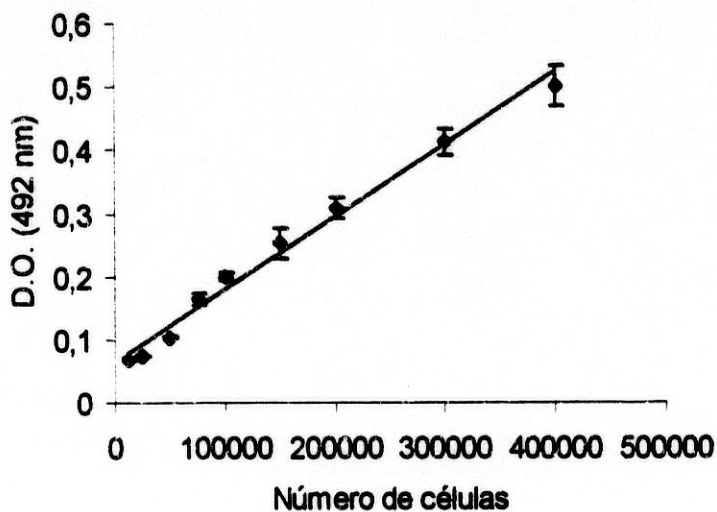


Fig 3.19: Curva de calibrado de la Sulforrodamina-B.

3.6.5 Test E-SCREEN

Una vez realizada su estandarización en nuestro laboratorio (Villalobos y cols., 1995) hemos utilizado el test E-SCREEN para determinar la actividad estrogénica de los productos puros y las muestras analizadas en este trabajo. Los pasos seguidos en la realización del test fueron los siguientes:

1. Se sembraron, aproximadamente 10.000 células, en placas de 24 pocillos, el medio de cultivo DME+10%FBS.
2. Transcurridas 24-48 horas de la siembra, una vez que las células se adhirieron al soporte plástico, el medio se reemplazó por DME(-RF) suplementado con 10% de CDHuS.

3. Se añadieron, a continuación, al medio de cultivo, en las diluciones indicadas en cada caso, estradiol-17 β o los productos o muestras a ensayar para conocer su actividad estrogénica.

4. Pasadas 144 horas de subcultivo, previa la aspiración de los medios de cultivo, se fijaron las células para su contaje posterior mediante la técnica de la sulforrodamina-B antes descrita.

3.6.5.1 Estimación de la eficacia y potencia proliferativa

Una vez realizado el ensayo E-SCREEN, se procedió a establecer la tasa máxima de proliferación celular inducida por cada compuesto para, posteriormente, calcular la eficacia proliferativa relativa (EPR) y la potencia proliferativa relativa (PPR).

*** Eficacia proliferativa relativa (EPR)**

La EPR se calculó dividiendo la tasa máxima de proliferación celular obtenida para cada compuesto por la tasa máxima de proliferación celular obtenida para el estradiol-17 β , (situada en $6,09 \pm 0,55$ sobre el control), restando previamente tanto al numerador como al denominador de esta fracción una unidad, valor que representa la proliferación registrada en el grupo control. El valor resultante se expresó en tanto por ciento, asignando para ellos el 100% para el estradiol-17 β .

*** Potencia proliferativa relativa (PPR)**

La PPR se definió en forma de cociente entre las concentraciones de máximo efecto proliferativo del estradiol-17 β y del producto ensayado. El valor resultante se expresa en tanto por ciento, asignando para ello el valor 100% al estradiol-17 β .

3.6.6 Test MVLN

Con objeto de utilizar un modelo rápido y fácil de caracterización de nuevas moléculas estrogénicas o antiestrogénicas, Demirpence y cols. (1993) desarrollaron un modelo celular en el cual la acción estrogénica puede ser detectada tras la activación de genes que dan una señal susceptible de ser medida por bioluminiscencia. El método está basado en células MCF-7 transfectadas establemente (MVLN) con un gen *reporter* que permite la expresión de la enzima luciferasa bajo estimulación estrogénica. Básicamente el protocolo de trabajo realizado fue el siguiente:

1. Se cultivaron las células MVLN en placas petri de 25 mm de diametro en medio DME + 25% CDHuS.
2. Pasadas 96-120 horas de la siembra, una vez que las células se adherieron adherido al soporte plástico, se les añadió etanol (control), estradiol-17 β (10^{-10} M), el antiestrogéno RU 58 668 (10^{-7} M) y los compuestos a ensayar disueltos en etanol en las diluciones indicadas en cada caso (Rango: 10^{-8} M- 10^{-5} M).
3. Transcurridas 24 horas, se retiró el medio y se lavaron las cajas con PBS
4. Se desarrolló a continuación la metodología descrita en el Kit comercial Luciferasa Assay System de Promega, procediendo a la lisis de las células y posterior medida de la actividad luciferasa correspondiente en el luminómetro.
6. La cuantificación de las proteínas totales se realizó en 5 μ l del homogenizado celular de acuerdo con las instrucciones del Kit Coomassie.
7. Los valores experimentales se expresaron como unidades de luminiscencia arbitrarias por mg de proteína (RLU/mg).

3.6.7 Cuantificación de pS2

La proteína pS2 es secretada por las células MCF-7 por lo que es posible proceder a su cuantificación en el medio de cultivo. Para ello, en los experimentos realizados para determinar la capacidad proliferativa de estradiol-17 β y otros compuestos estrogénicos hemos desarrollado el siguiente protocolo experimental:

1. Una vez finalizados los pasos 1-4 del ensayo E-SCREEN se recoge el medio extracelular tras 144 horas de subcultivo.

2. Tras centrifugación (2.500 rpm/10 minutos) para eliminar las células despegadas y el detrito celular, se almacenan alícuotas de los medios obtenidos a -80°C hasta su procesamiento.

3. Se continúa entonces con la metodología descrita en el kit comercial ELSA-pS2 (Cis International, Francia) para la cuantificación de pS2, una vez efectuadas las diluciones indicadas en cada caso.

3.6.8 Medida de ARNm de pS2: "Northern Blot"

La medida del ARNm de pS2 se realizó mediante la técnica de "Northern Blot". De forma resumida la metodología seguida fue la siguiente:

1. Se sembraron las células MCF-7 en placas petri de 25 mm de diámetro en el medio de cultivo MEM+25%CDHuS.

2. Pasadas 48-72 horas de la siembra, se les añadió estradiol-17 β , o los compuestos a ensayar para determinar su actividad estrogénica disueltos en etanol, en las diluciones aconsejadas en cada caso. A las placas utilizadas como control no se les añadió ningún producto.

3. 24 horas después se procedió a la aspiración del medio de cultivo y a la extracción del ARN total añadiendo 700 μ l de Trizol®. Las células se homogenizaron pipeteando repetidamente.

4. Se realizó luego una purificación del ARN mediante la adición de 100 μ l de cloroformo, mezclando suavemente y centrifugando después a 2.500 rpm durante 10 minutos.

5. Separada la fase acuosa (superior), se añadieron 500 μ l de isopropanol y la mezcla resultante se dejó estar 12-16 horas a la temperatura de -20°C , con el fin de precipitar el ARN.

6. Para obtener el precipitado de ARN se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

7. Una vez decantado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 300 μ l de una solución de agua libre de RNAsas, Tris buffer 10mM, y cloruro sódico 0,5 M.

8. El ARN se sometió a una segunda purificación con 300 μ l de cloroformo, centrifugando la muestra a 2.500 rpm durante 5 minutos.

9. Recogida la capa acuosa adicionaron 540 μ l de etanol y la mezcla se dejó estar 12-16 horas a -20°C .

10. El precipitado se disolvió en 100 μ l de agua libre de RNAsas y de la solución resultante se tomaron 5 μ l para determinar mediante espectrofotometría (DO a 260 nm) la concentración de ARN.

11. En los pocillos de un gel de agarosa al 1%, con formaldehído añadido, se cargaron 10 μ g del ARN para electroforesis utilizando MOPS 10X como tampón.

12. El gel se trató posteriormente con SSC 10X y el ARN se transfirió por capilaridad a filtros de nylon (Hybond N) en SSC 10X durante toda la noche.

13. Para fijar el ácido nucleico a la membrana se expuso ésta durante 2 minutos a una fuente de luz ultravioleta.

14. Posteriormente para bloquear los centros de unión inespecífica se realizó, durante 2 horas a 42°C la prehibridación del contenido de la membrana con una disolución de ADN de esperma de salmón.

15. Los ácidos nucleicos transferidos a filtros de nylon se hibridaron en condiciones de alta astringencia con sondas específicas marcadas por el método de "random priming", utilizando el Random Primed DNA Labeling Kit ® (Boehringer Mannheim). Como sondas de ADNc se han utilizado las siguientes : a) ADNc de ARNm correspondiente a la proteína pS2, b) ADNc de ARNr correspondiente al ribosoma 28s. Esta última sonda se utilizó para normalizar los blots.

16. Para eliminar la sonda unida de forma inespecífica, los filtros se sometieron a dos lavados, el primero con una solución de SDS al 0,1% y SSC 2X, durante 5 minutos, y el segundo con una solución de SDS al 0,1 % y SSC 1X durante 5 minutos a 60°C, ambos lavados en agitación.

17. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se expusieron a películas de autorradiografía BIOMAX MS (Kodak) a - 80°C, utilizando pantallas amplificadoras de Dupont.

18. La cuantificación de los geles autorradiografiados se realizó, finalmente, mediante densitometría.

3.7 EXTRACCIÓN DE XENOESTRÓGENOS EN MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO

De los distintos procedimientos no destructivos de purificación, el más utilizado habitualmente se basa en la separación por cromatografía de adsorción en columna, utilizando distintos adsorbentes (alúmina, carbón activado, sílica gel, sephadex, etc., o mezcla de ellos) y eluyentes como éter de petróleo, etílico, hexano y otros). Esta metodología permite eliminar prácticamente la totalidad de las sustancias interferentes, las cuales quedan retenidas en el adsorbente, debido a la diferencia de polaridad existentes entre ellas, los residuos de pesticidas y el disolvente de elución empleado.

Extracción

Para la extracción de los xenoestrógenos a partir de las muestras de grasa, se ha desarrollado una metodología basada en el método descrito en 1984 por Okond'ahoka y cols., 1984, con ligeras modificaciones que se puede describir en los siguientes pasos:

1. Se deseca Alumina Merck 90 durante 4 horas a 600°C.
2. Se pesan 2 g de alumina y se ajusta a un grado de hidratación del 5%.
3. Se rellena una columna de vidrio para cromatografía Pyrex de 6 mm de diámetro interno con la alumina hidratada al 5%.
4. Se pesan 0,2 g de la muestra de tejido adiposo, mantenida hasta su procesamiento a -70°C.
5. Dicha alícuota de tejido adiposo se homogeniza en un homogenizador de pistón con 2 ml de hexano.

6. Se vierte el extracto orgánico sobre la parte superior de la columna de cromatografía de vidrio.

7. Se añaden 20 ml de hexano a través de la columna y el eluido se recoge en un matraz de fondo redondo de 50 ml.

8. El eluido se concentra en el rotavapor hasta un volumen de 1 ml, cuidando de no llegar a sequedad.

9. El extracto obtenido se deseca completamente en corriente de nitrógeno.

10. El residuo seco se solubiliza en 500 µl de hexano y se purifica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa.

Purificación

Hemos desarrollado un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa eficaz para la separación de moléculas organocloradas con actividad estrogénica de compuestos hidrosolubles tales como las hormonas naturales y aditivos y monómeros de plásticos como los bisfenoles y alquilfenoles, que nos ha permitido diferenciar la actividad hormonal de cada fracción independientemente.

Este método presenta ciertas ventajas en relación con los métodos convencionales: mayor rapidez, mejor eficacia y precisión, capacidad para monitorizar las condiciones cromatográficas y la posibilidad de automatizar los análisis, son las más importantes. El método puede ser aplicado, igualmente, a una gran variedad de muestras medioambientales (Brotons, 1994; Valenzuela, 1995).

Lo esencial del mismo consiste en la inyección en el cromatógrafo líquido de 500 µl del extracto obtenido tras el procesamiento de la muestra, seguida de purificación cromatográfica con columna de sílice en las condiciones descritas precedentemente. Con ayuda del colector de fracciones, se recoge el eluido separando tres fracciones de volúmenes 11, 2 y 12 ml respectivamente, que corresponden a la

división del cromatograma en tres secciones. Las fracciones obtenidas se identifican como:

Fracción α : Corresponde a los minutos 0 a 11

Fracción X: Corresponde a los minutos 11 a 13

Fracción β : Corresponde a los minutos 13 a 25

Cada una de estas fracciones se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno con sumo cuidado para evitar posibles pérdidas y se disuelven de nuevo en 1 ml de hexano marcado con el patrón interno definido para cromatografía de gases, es decir p,p'-diclorobenzofenona, en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Las disoluciones así preparadas se inyectan en el cromatógrafo de gases con el fin de determinar en cual de las tres fracciones han eluido los pesticidas organoclorados. En todos los análisis efectuados los pesticidas eluyeron en los 11 primeros minutos. La figura 3.20 describe el perfil cromatográfico de la fracción α , x y β obtenidas por cromatografía líquida preparativa de una muestra de tejido adiposo.

Confirmada la presencia de los pesticidas en la fracción α cromatográfica, las fracciones α correspondientes a las muestras de tejido adiposo analizadas se redisuelven en 1 ml de hexano y se separan dos alícuotas: 0,9 ml se ensayan en el ensayo biológico y 0,1 ml, marcados con el patrón interno, se analizan por cromatografía de gases y detector de captura de electrones (CG/DCE) en las condiciones antes definidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

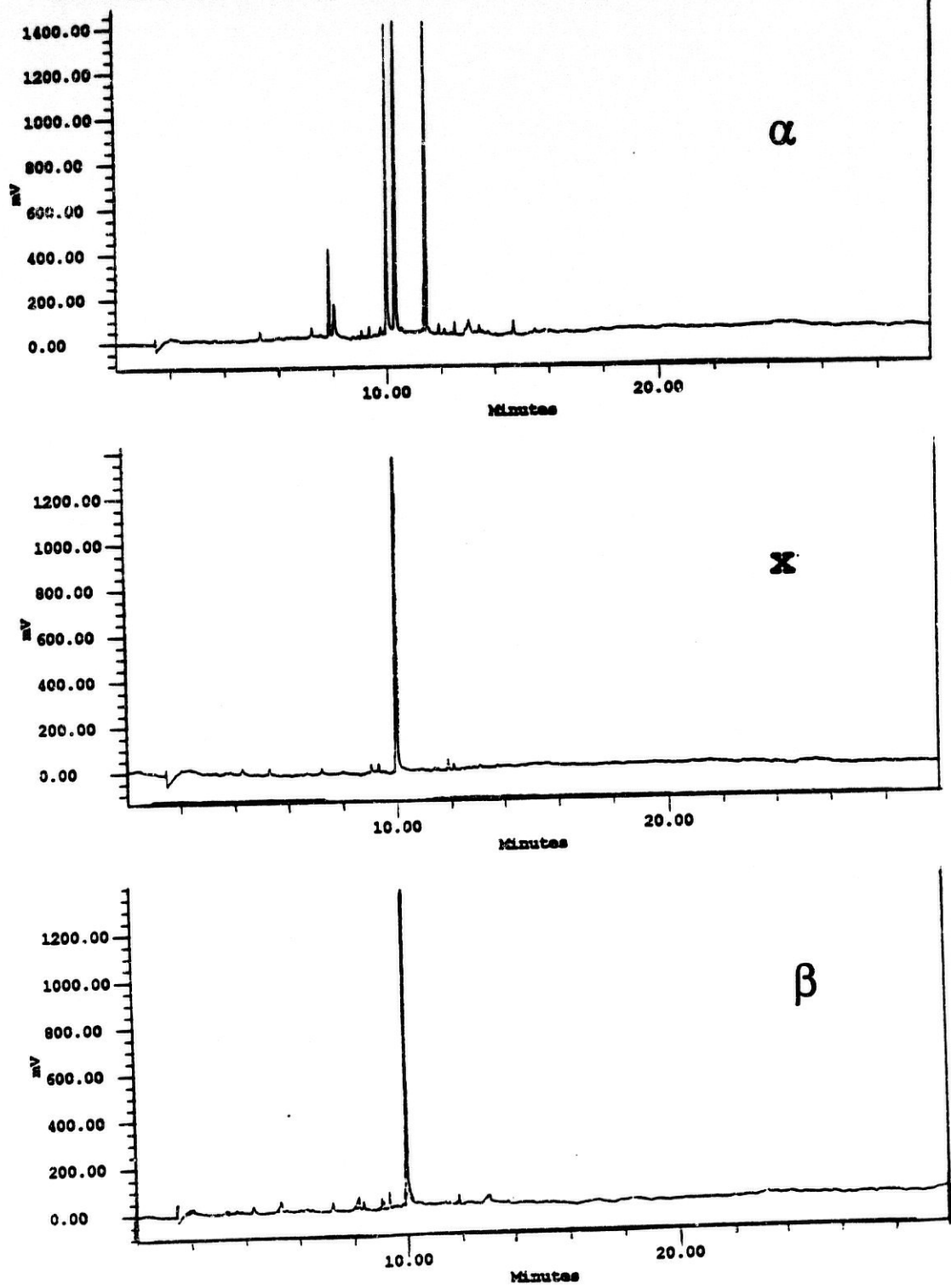


Fig 3.20

3.7.1 Recuperabilidad del método de extracción

Con el fin de establecer la efectividad y fiabilidad del método de extracción elegido, se estimó conveniente realizar un estudio de su recuperabilidad dentro de los rangos de concentración posteriormente utilizados. Para ello, se marcaron muestras de tejido adiposo de origen animal (0,2 g) con una disolución patrón mezcla de los pesticidas endosulfán I, p,p'-DDE y p,p'-DDT a la concentración de 0,1 µg/ml. Posteriormente, se sometieron al proceso de extracción de acuerdo con el protocolo estándar y a análisis cromatográfico. Paralelamente, se ha realizado un ensayo en blanco del mismo tejido adiposo de origen animal de acuerdo con la metodología anteriormente descrita.

En la tabla 3.36 se precisan los porcentajes de recuperación obtenidos. Las figuras 3.21a y 3.21b muestran los cromatogramas de una muestra de tejido adiposo marcada con los pesticidas organoclorados y de su respectivo ensayo en blanco.

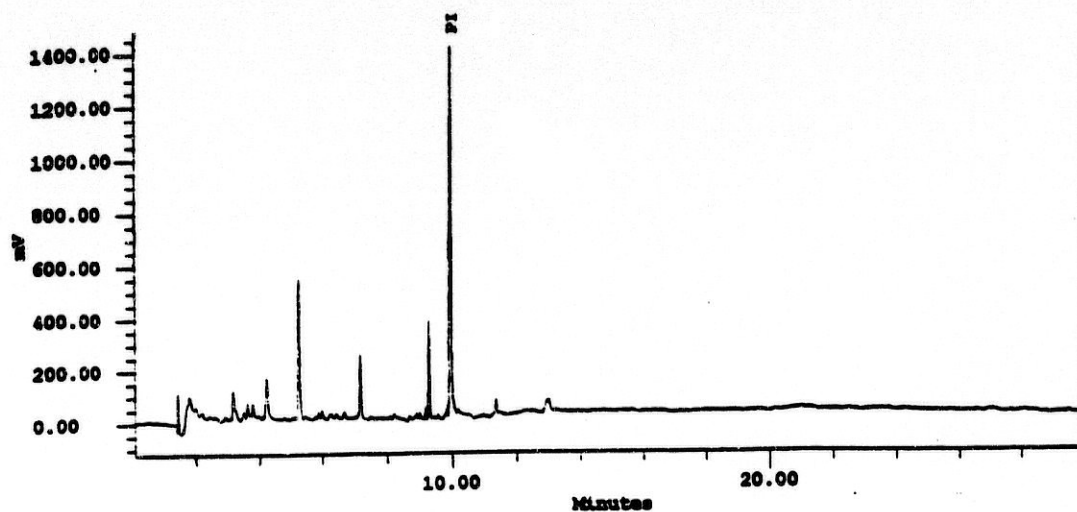


Fig 3.21 a: Cromatograma de un ensayo en blanco de tejido adiposo

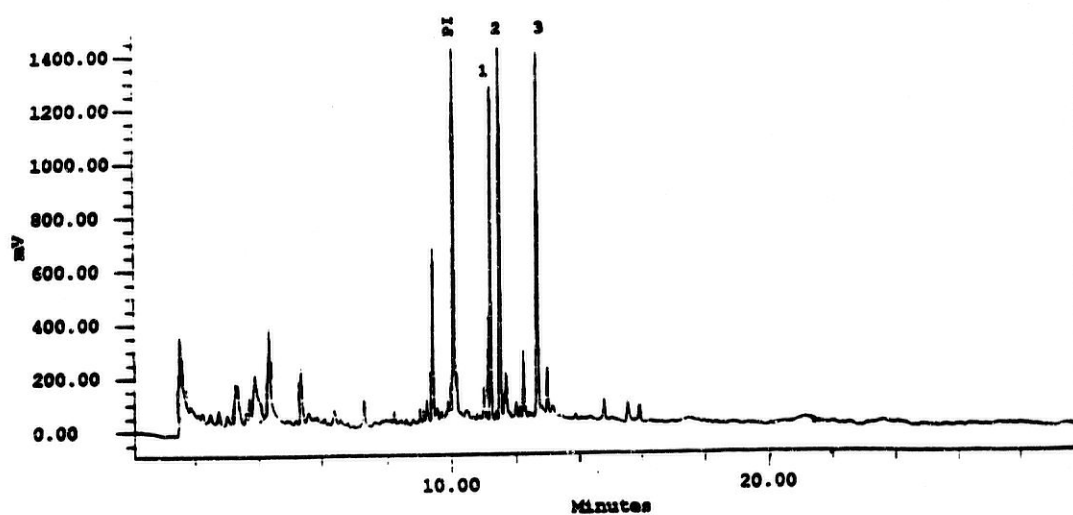


Fig 3.21 b: Cromatograma de una muestra de tejido adiposo marcada con endosulfán I (1), p,p'-DDE (2) y p,p'-DDT (3).

Tabla 3.36

		Grasa 1	Grasa 2	Blanco	Blanco
Conc. Añadida	Endo I	0,01	0,01	-	-
	p,p'-DDE	0,01	0,01	-	-
	p,p'-DDT	0,01	0,01	-	-
Conc. Encontrada	Endo I	0,09	0,095	nd	nd
	p,p'-DDE	0,099	0,11	nd	nd
	p,p'-DDT	0,096	0,092	nd	nd
Recuperación	Endo I	90%	95%	-	-
	p,p'-DDE	99%	110%	-	-
	p,p'-DDT	96%	92%	-	-

3.7.3 Reproducibilidad del método cromatográfico

Con objeto de comprobar la reproducibilidad del método cromatográfico se inyectaron en el cromatógrafo de gases dos extractos de muestras de tejido adiposo correspondientes a un caso y a un control analizados siguiendo las condiciones de trabajo descritas.

Las tablas 3.37 y 3.38 muestran las concentraciones medias de pesticidas encontradas en las muestras de tejido adiposo correspondientes a un caso y a un control, en diez medidas consecutivas, junto con otros parámetros representativos de la precisión del método cromatográfico.

Tabla 3.37: Reproducibilidad del método cromatográfico para una muestra de grasa de un caso analizado.

	Endrín	p,p'-DDE	o,p'-DDT	Endo-diol	Endo-sulfato
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	0,027	0,105	0,082	0,02	0,1
Desviación estándar (θ)	0,002	0,001	0,006	0,001	2 e-4
Coefficiente de variación (C.V.%)	7,4	0,95	7,3	5	0,2
Error estándar (E.E.)	0,00063	3,1 e-4	1,8 e-3	3,1 e-4	6,3 e-5
Error relativo (E.R.)	4,57	0,57	4,3	0,57	0,12

Tabla 3.38: Reproducibilidad del método cromatográfico para una muestra de grasa de un control analizado.

	Dieldrín	Endrín	p,p'-DDE	p,p'-DDT	Endo II
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	0,113	0,105	0,009	0,019	0,005
Desviación estándar (θ)	0,001	0,001	0,0006	0,0003	2 e-4
Coefficiente de variación (C.V.%)	0,88	0,94	6,66	1,57	4
Error estándar (E.E.)	3,1 e-4	3,1 e-4	1,8 e-4	9,4 e-5	6,3 e-5
Error relativo (E.R.)	0,54	0,58	4,11	0,97	2,47

3.8 EVALUACIÓN DE LA ESTROGENICIDAD DE LAS FRACCIONES α Y β

Las fracciones cromatográficas α y β obtenidas por cromatografía líquida preparativa se ensayaron en el test E-SCREEN para determinar la carga hormonal correspondiente a cada fracción.

Para ello, los extractos secos se resuspendieron en 5 ml de medio DMEM suplementado con suero humano tratado con carbón dextrano (CDHuS). Posteriormente, las fracciones se hicieron pasar por un filtro de 0,22 μ m y se diluyeron en medio de cultivo (1:1, 1:5, y 1:10). Las diluciones obtenidas se sometieron, finalmente, al test E-SCREEN junto a grupos celulares no tratados (control) y grupos celulares expuestos a estradiol-17 β 10^{-11} M.

3.9 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

El cálculo de los lípidos totales en la muestra de tejido adiposo se determinó gravimétricamente, previa extracción de la citada materia grasa con una solución de cloroformo: metanol : ácido clorhídrico, evaporación de los disolventes y posterior pesada del residuo (Capilla, 1970). Se utilizó para ello la siguiente metodología:

1. Se seca un matraz de paredes delgadas y base plana, con capacidad de 125-250 ml, en estufa, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se pesa en una balanza de precisión.

2. Se toman 0,1 g de muestra y se transvasa a un homogenizador de pistón procediendo a su homogenización utilizando 10 ml de una mezcla extractora cuya composición es cloroformo: metanol: ácido clorhídrico en una proporción 200: 100: 1.

3. Una vez homogenizada, la muestra se distribuye en tubos de centrifuga que se enrasan con 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 molar y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

4. La capa etérea se transvasa al matraz previamente tarado y a la capa acuosa se añaden 3 ml de la mezcla extractora y se vuelve a centrifugar en las condiciones anteriores citadas recogiendo nuevamente la capa etérea.

5. Se elimina el máximo disolvente mediante destilación, terminando la desecación en estufa a 100°C. Posteriormente, se deja enfriar el matraz hasta la temperatura ambiente y se pesa en una balanza de precisión.

6. El contenido en materia grasa de la muestra viene dado por la siguiente expresión:

$$(P_1 - P_2)100 / P_0$$

P_2 = peso en gramos del matraz seco y vacío

P_1 = peso en gramos del matraz con la materia grasa

P_0 = peso en gramos de la muestra de tejido adiposo

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 DEMOSTRACIÓN DEL EFECTO ESTROGÉNICO

4.1.1. Test E-SCREEN

La metodología descrita para el test de estrogenicidad E-SCREEN ha sido aplicada en este trabajo a un gran número de sustancias químicas y mezclas biológicas. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente forma: 1) ensayo proliferativo para el estrógeno natural, estradiol-17 β , 2) resultados para los organoclorados, 3) resultados para el grupo genérico de los bisfenoles.

4.1.1.1 Efecto del Estradiol-17 β

Procediendo según la metodología descrita, hemos determinado el crecimiento celular en presencia de estradiol-17 β , estimado con la técnica de la sulforrodamina-B, frente al crecimiento de grupos celulares no tratados (controles). Cada ensayo ha quedado estandarizado en torno a un valor de crecimiento 1 para los controles y sus resultados se han expresado en términos de media, desviación estándar y error estándar de la media del incremento del número de células frente al control (Tabla 4.1).

Utilizando el test estadístico *t* de Student se han comparado los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales. La significación estadística de las diferencias queda indicada en las tablas como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

Los datos numéricos reunidos en la tabla 4.1 del crecimiento celular relativo para diferentes concentraciones de estradiol-17 β , se representan en la figura 4.1, en la que se incluye el crecimiento de los grupos celulares control, que se expresan por una línea de puntos en tasa de crecimiento uno.

Tabla 4.1: Estradiol-17 β

Concentración (M)	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}
Media	1,12	4,93*	6,09*	6,53*	6,61*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,12	0,38	0,55	0,27	0,30
Error Estándar	0,06	0,19	0,27	0,13	0,15

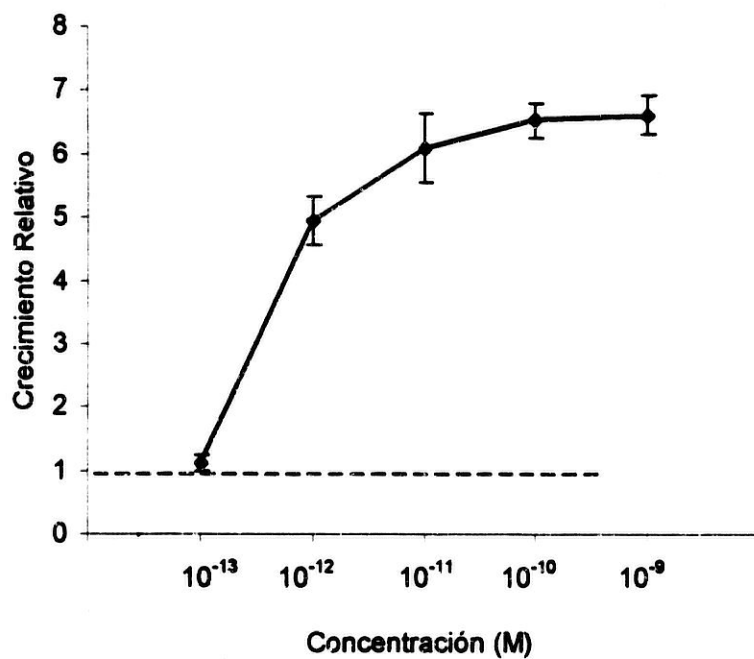


Fig 4.1: Crecimiento frente a estradiol-17 β y grupo Control

4.1.1.2 Pesticidas organoclorados

Estudiada mediante el ensayo E-SCREEN la actividad proliferativa del grupo de pesticidas organoclorados objeto de análisis en las muestras biológicas, anteriormente descritos, las tablas 4.2 a 4.11 muestran los datos de crecimiento celular para los pesticidas organoclorados lindano, aldrín, dieldrín, endrín, mirex, metoxicloro, DDT y metabolitos y endosulfán y metabolitos, respectivamente. Con los datos numéricos presentados en dichas tablas se han construido las gráficas de las figuras 4.2 a 4.11.

Tabla 4.2: Lindano

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	0,99	1,05	0,99	1,05	1,91+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,14	0,06	0,14	0,06	0,19
Error Estándar	0,07	0,03	0,1	0,12	0,27

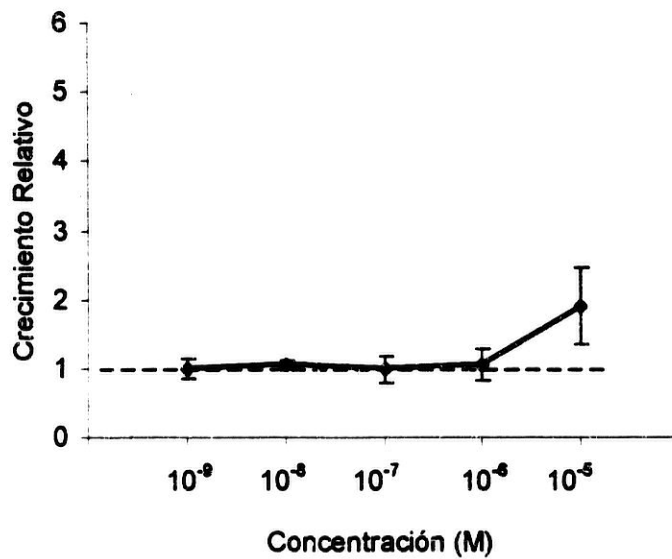


Fig 4.2: Curva de proliferación del lindano

RESULTADOS

Tabla 4.3: Aldrín

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,14	0,92	1,22	1,40	4,76+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,11	0,17	0,18	0,21	0,22
Error Estándar	0,05	0,08	0,09	0,10	0,11

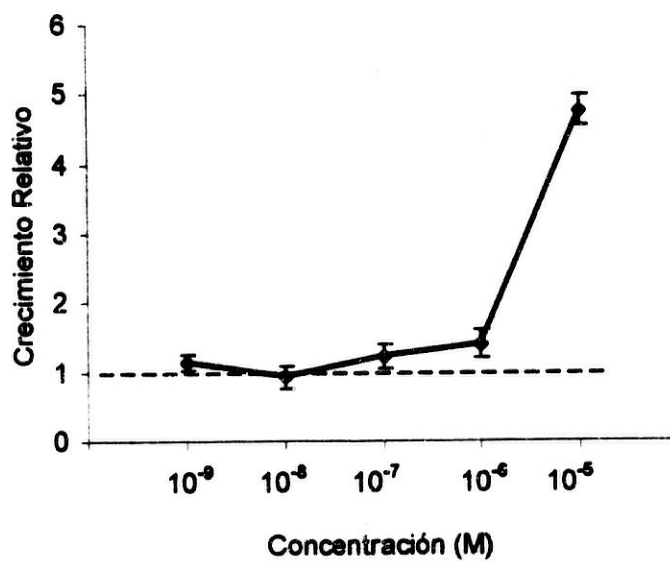


Fig 4.3: Curva de proliferación del aldrín

Tabla 4.4: Dieldrín

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	0,89	0,89	0,96	1,05	2,68+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,10	0,07	0,17	0,35	0,94
Error Estándar	0,05	0,03	0,08	0,17	0,47

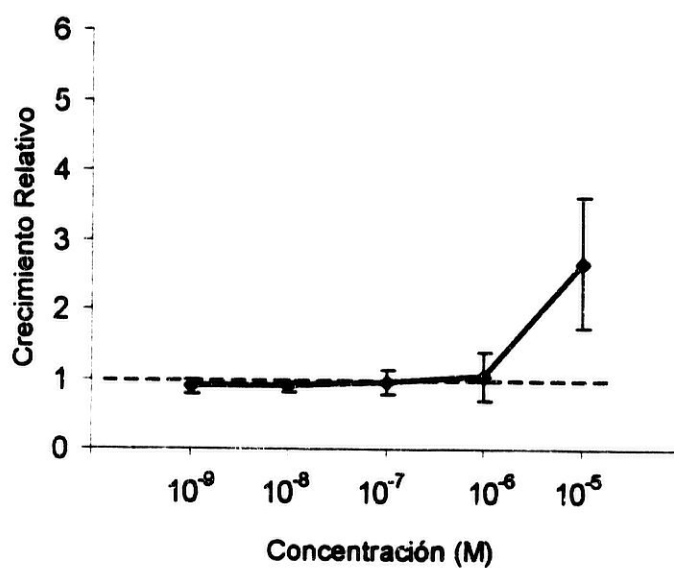


Fig 4.3: Curva de proliferación del dieldrín

RESULTADOS

Tabla 4.4: Endrín

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,05	0,98	0,99	1,08	2,11+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,04	0,02	0,07	0,07	0,56
Error Estándar	0,02	0,01	0,04	0,04	0,28

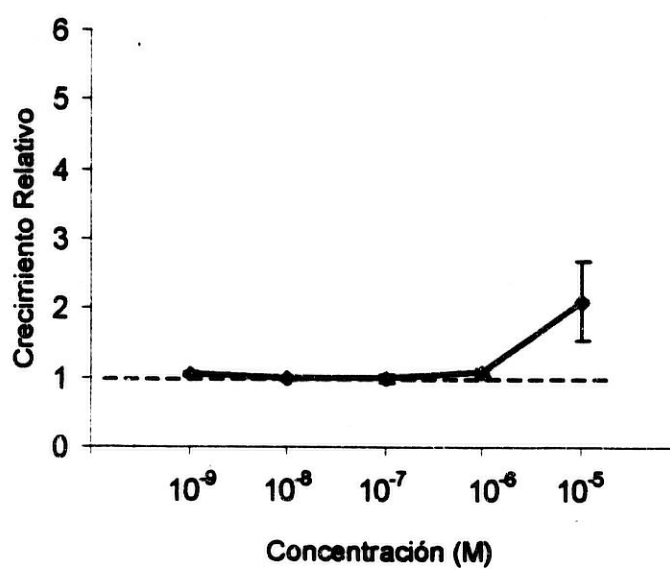


Fig 4.4: Curva de proliferación del endrín

Tabla 4.5: Mirex

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	0,97	1,07	0,76	0,76	0,86
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,18	0,12	0,05	0,05	0,14
Error Estándar	0,09	0,06	0,02	0,02	0,07

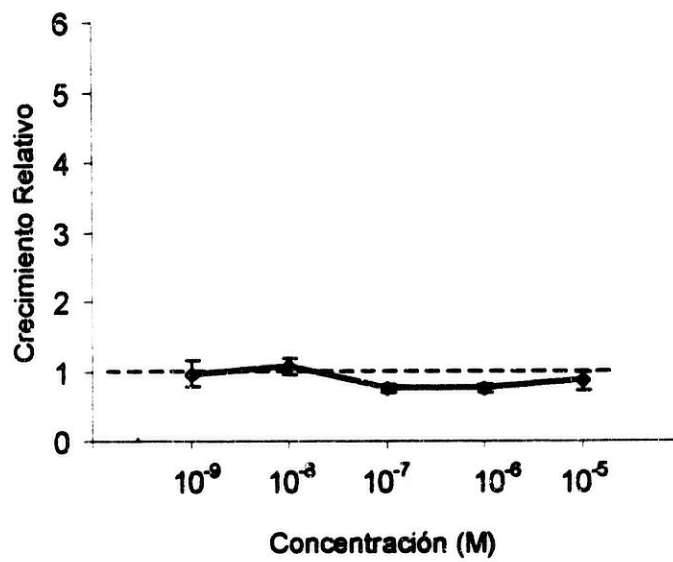


Fig 4.5: Curva de proliferación del mirex

RESULTADOS

Tabla 4.6: p,p'-DDE

Concentración (M)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Media	0,99	1,02	1,05	2,01*	4,5+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,03	0,05	0,03	0,56	0,21
Error Estándar	0,01	0,02	0,01	0,28	0,10

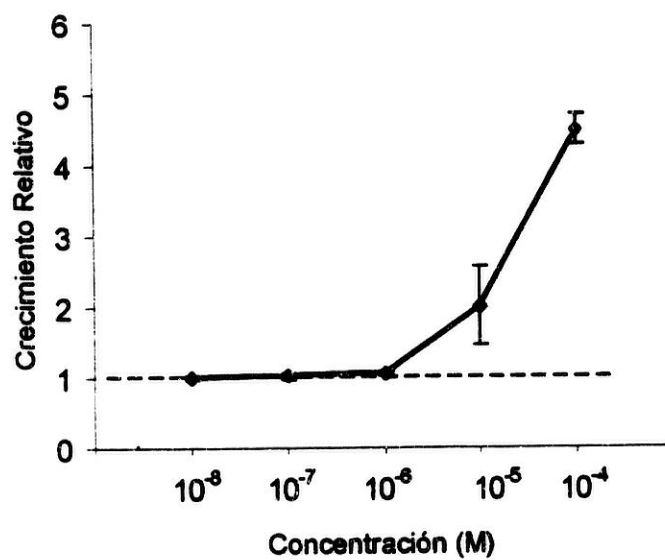


Fig 4.6: Curva de proliferación del p,p'-DDE

Tabla 4.7: o,p'-DDD

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	0,93	1,09	1,27	3,08+	2,43+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,17	0,16	0,34	1,34	1,00
Error Estándar	0,08	0,08	0,17	0,67	0,5

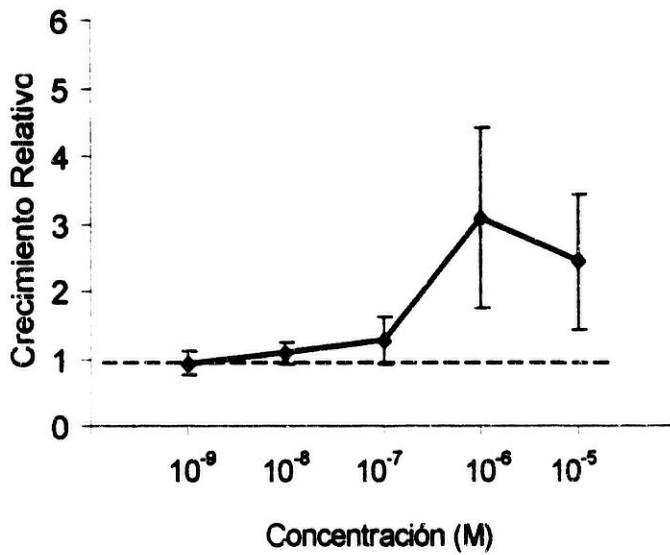


Fig 4.7: Curva de proliferación del o,p'-DDD

RESULTADOS

Tabla 4.8: o,p'-DDT

Concentración (M)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Media	0,95	1,5	2,75+	6,5*	5*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,02	0,18	0,28	0,64	0,63
Error Estándar	0,01	0,15	0,14	0,45	0,45

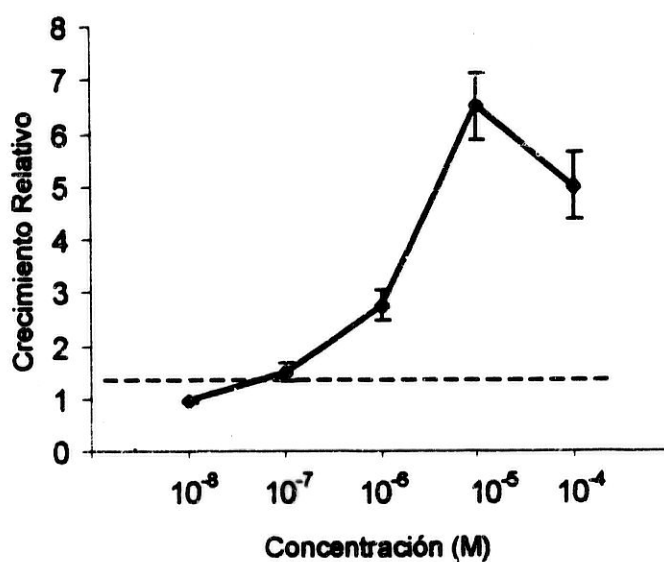


Fig 4.8: Curva de proliferación del o,p'-DDT

Tabla 4.9: p,p'-DDT

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	0,87	1,01	1,23	2,60+	1,91+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,04	0,21	0,32	0,29	1,14
Error Estándar	0,02	0,1	0,16	0,14	0,57

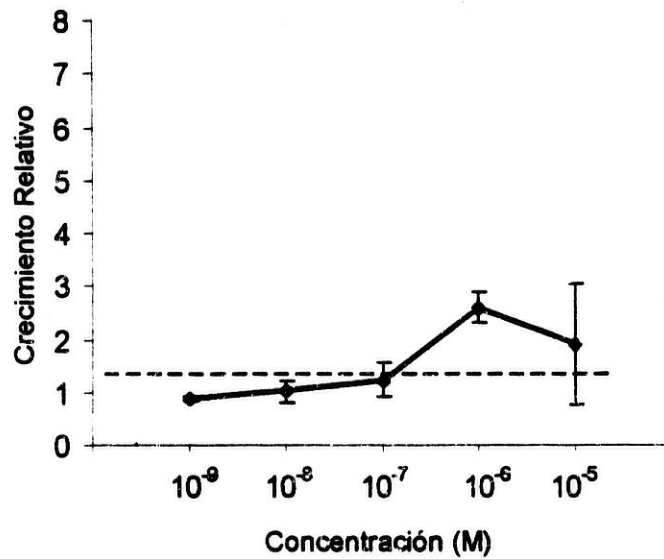


Fig 4.9: Curva de proliferación del p,p' - DDT

RESULTADOS

Tabla 4.10: Metoxicloro

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	0,90	0,94	1,05	2,05*	2,63+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,03	0,05	0,29	0,22	0,89
Error Estándar	0,01	0,02	0,14	0,11	0,44

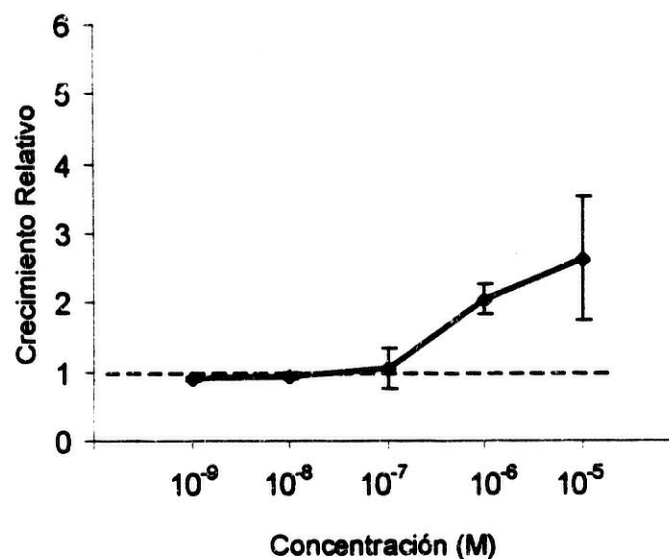


Fig 4.10: Curva de proliferación del metoxicloro

Tabla 4.11: Endosulfán

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,03	1,03	1,46	4,33	4,07
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,02	0,04	0,24	1,36	0,42
Error Estándar	0,01	0,02	0,12	0,68	0,21

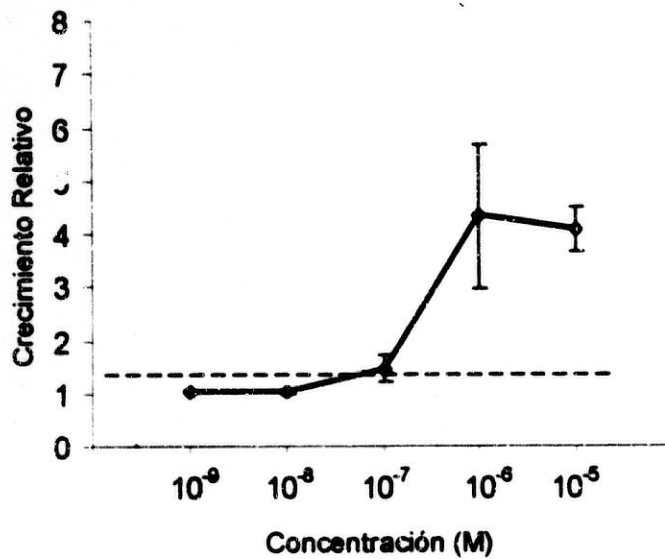


Fig 4.11: Curva de proliferación del endosulfán

4.1.1.3 Derivados del bisfenol

Se ha incluido en este trabajo el estudio pormenorizado del efecto estrogénico de una serie de compuestos que tienen como denominador común su estructura química. Se trata del grupo de los bisfenoles que a partir de la estructura más sencilla va añadiendo radicales de diferente entidad tanto en el carbono central como en los radicales OH terminales.

Las tablas 4.12 a 4.20 recogen los datos de crecimiento celular obtenidos mediante el test E-SCREEN para los compuestos de estructura bifenólica: 4,4'-etilidendifenol (MM1), 1,1-bis(4-hidroxifenil)propano (MM2), 2,2-bis(4-hidroxifenil)butano (MM3), 3,3-bis(4-hidroxifenil)pentano (MM4), 4,4-bis(4-hidroxifenil)heptano (MM5), 2,2-bis(4-*o*-metilhidroxifenil)propano (MM6), 2,2-bis(4-hidroxifenil)1,1,1,3,3,3-hexafluoropropano (MM7), 4-hidroxifenilcetona (MM8), 2,2-bis(4-hidroxifenil)propanol (MM9). Los datos numéricos de las anteriores tablas han servido para construir las gráficas de las figuras 4.12 a. 4.20.

Tabla 4.12: MM1

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,09	1,83+	2,22+	6,08*	6,34*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,17	0,20	0,18	0,40	0,42
Error Estándar	0,12	0,16	0,15	0,32	0,34

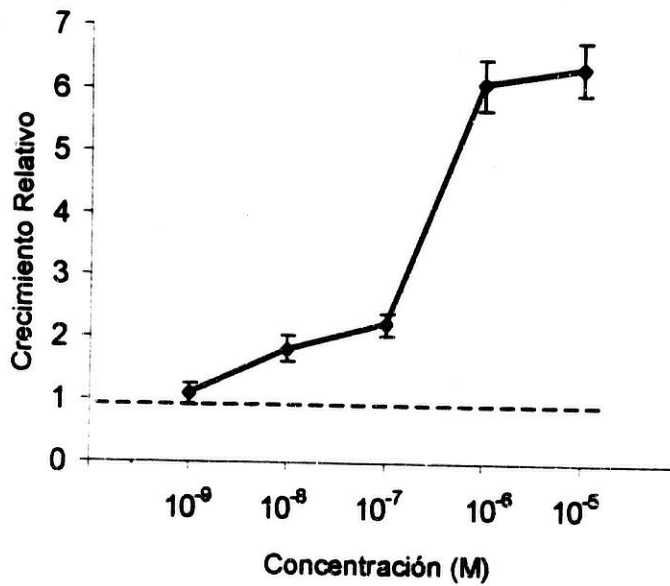


Fig 4.12: Curva de proliferación del MM1

Tabla 4.13: MM2

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,04	1,52	2,91+	6,74*	6,27
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,21	0,25	0,39	1,51	0,49
Error Estándar	0,15	0,21	0,32	0,90	0,40

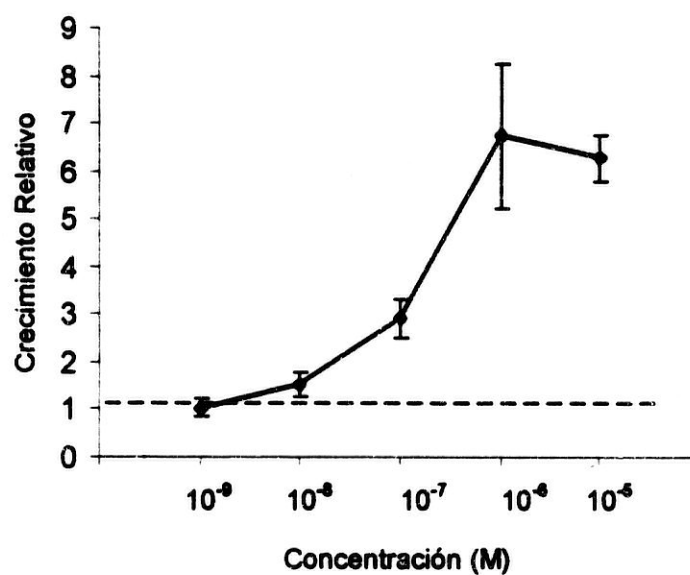


Fig 4.13: Curva de proliferación del MM2

Tabla 4.14: MM3

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,73	2,7+	5,13+	5,93*	5,94*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,24	0,60	0,48	0,58	0,22
Error Estándar	0,19	0,49	0,38	0,47	0,18

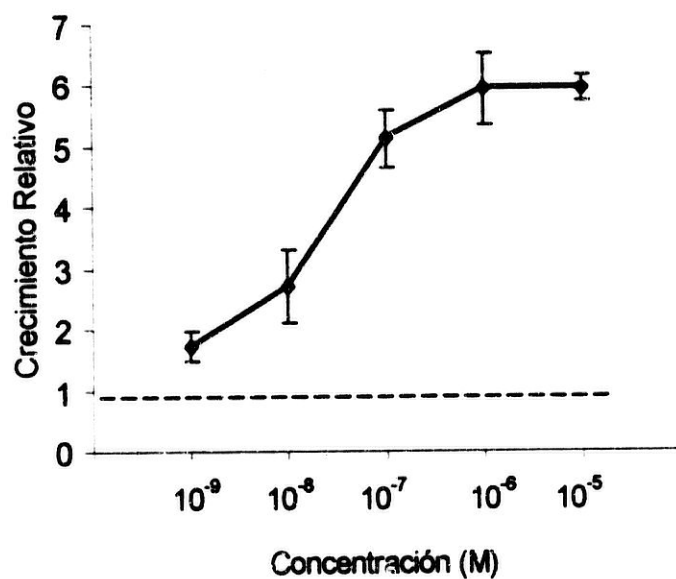


Fig 4.14: Curva de proliferación del MM3

Tabla 4.15: MM4

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	2,62+	6,08*	7,20*	7,19*	6,92*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,58	0,88	0,65	0,32	0,53
Error Estándar	0,58	0,88	0,65	0,32	0,53

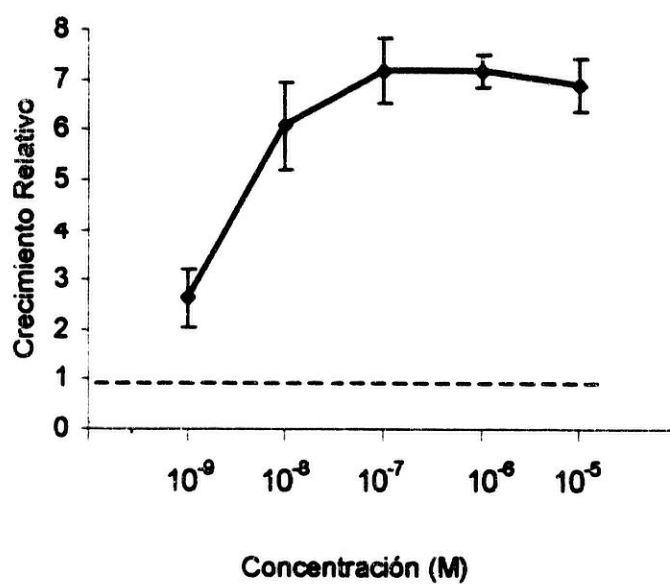


Fig 4.15: Curva de proliferación del MM4

Tabla 4.16: MMS

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	2,01+	6,77*	7,10*	6,79*	5,51+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,76	0,60	0,75	0,22	0,42
Error Estándar	0,62	0,52	0,61	0,18	0,34

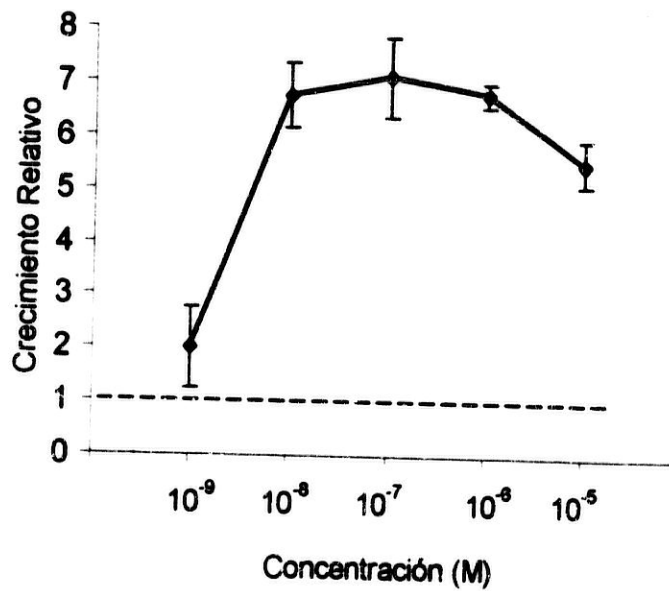


Fig 4.16: Curva de proliferación del MMS

RESULTADOS

Tabla 4.17 : MM6

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,24	1,72	3,79+	6,78*	6,83*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,30	0,40	0,38	0,71	0,56
Error Estándar	0,24	0,33	0,31	0,59	0,47

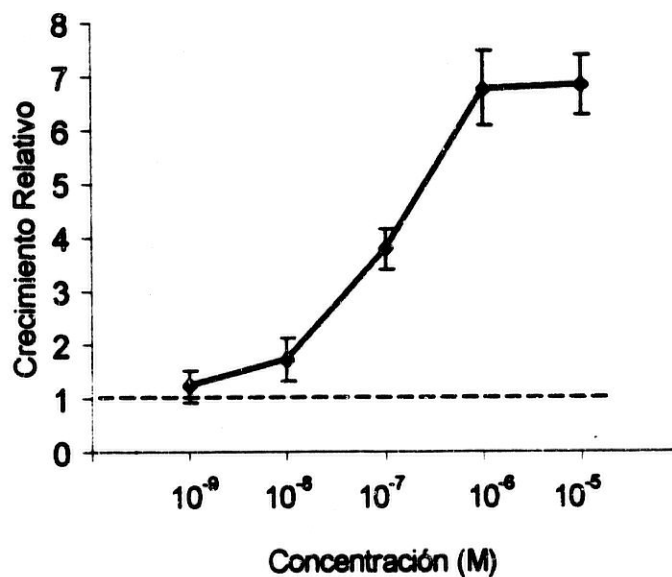


Fig 4.17: Curva de proliferación del MM6

Tabla 4.18: MM7

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,48	2,37+	4,65+	5,53+	4,90+
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,42	0,72	0,58	0,64	0,50
Error Estándar	0,35	0,60	0,48	0,52	0,41

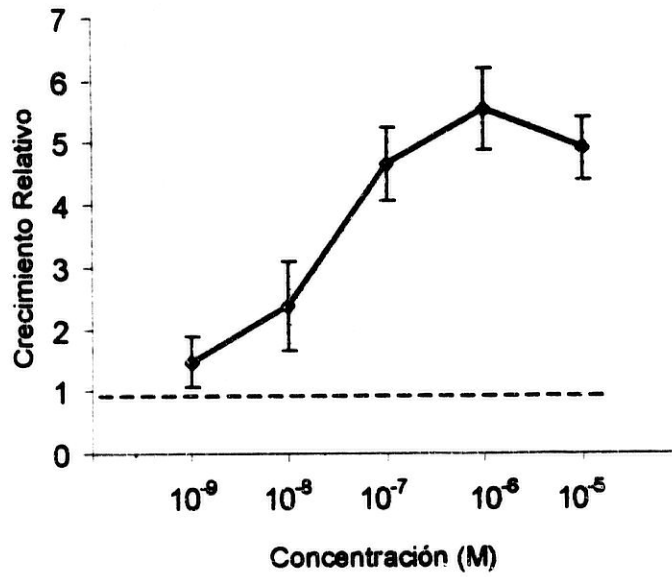


Fig 4.18: Curva de proliferación del MM7

RESULTADOS

Tabla 4.19: MM8

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,04	1,25	1,34	2,75+	5,50*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,34	0,53	0,41	0,20	0,42
Error Estándar	0,24	0,38	0,29	0,18	0,34

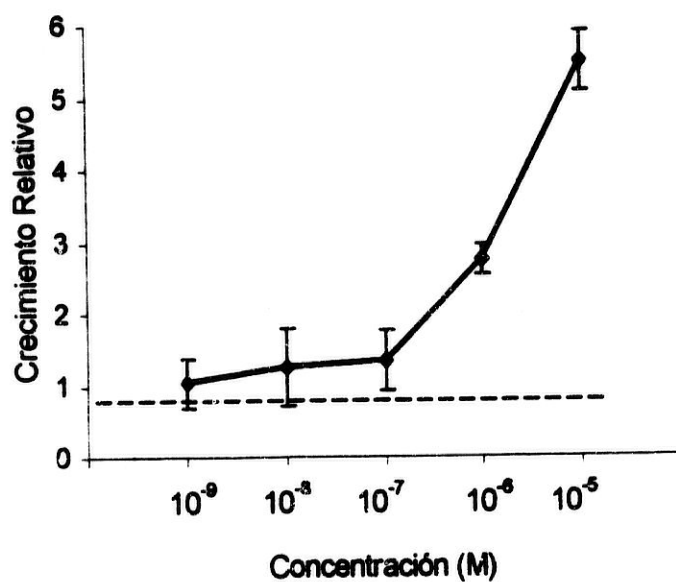


Fig 4.19: Curva de proliferación del MM8

Tabla 4.20: MM9

Concentración (M)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media	1,18	1,41	1,73+	3,13+	7,67*
Desv. Estándar ($\pm\sigma$)	0,30	0,19	0,23	0,56	0,44
Error Estándar	0,25	0,16	0,18	0,46	0,36

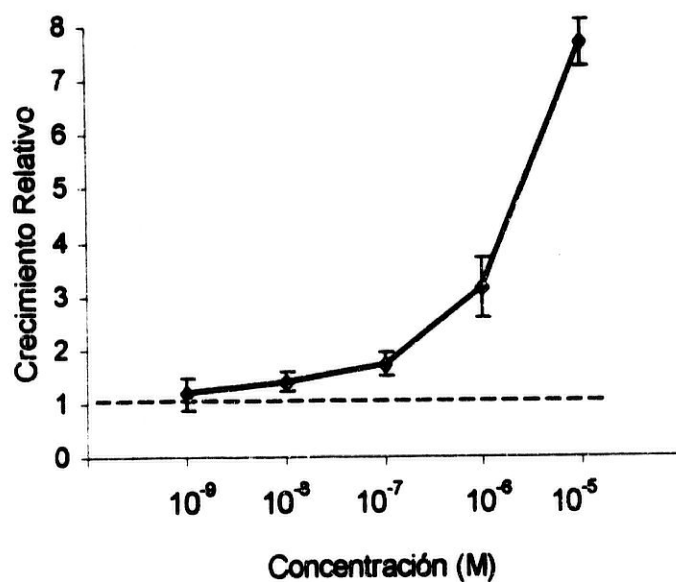


Fig 4.20: Curva de proliferación del MM9

4.1.1.4 Estimación de la eficacia y potencia proliferativa

Mediante el ensayo E-SCREEN es posible establecer la tasa máxima de proliferación celular para cada compuesto o muestra analizado y, posteriormente, proceder al cálculo de la eficacia proliferativa relativa (EPR) y la potencia proliferativa relativa (PPR).

Las Tablas 4.21 y 4.22 recogen los datos de concentración de cada uno de los productos ensayados para los que se obtuvo el máximo efecto proliferativo en el E-SCREEN (Concentración), la tasa máxima de proliferación para cada compuesto a la concentración óptima (Efecto proliferativo) y los valores estimados de la potencia proliferativa relativa (PPR) y eficacia proliferativa relativa (EPR).

Tabla 4.21: Pesticidas organoclorados.

Sustancia	Concentracion (nM)	Efecto Proliferativo	PPR (%)	EPR (%)
Estradiol-17 β	0,01	6,61 \pm 0,30	100	100
Lindano	10.000	1,91 \pm 0,55	0,0001	28,89
Aldrin	10.000	4,76 \pm 0,22	0,0001	72,01
Dieldrin	10.000	2,68 \pm 0,94	0,0001	40,54
Endrin	10.000	2,11 \pm 0,56	0,0001	31,92
Mirex	10.000	0,86 \pm 0,14	-	-
p,p'-DDE	100.000	4,50 \pm 0,21	0,00001	68,07
o,p'-DDD	1000	3,08 \pm 1,34	0,001	46,59
o,p'-DDT	10.000	6,5 \pm 0,64	0,0001	98,33
p,p'-DDT	1000	2,60 \pm 0,29	0,001	39,33
Metoxicloro	1000	2,63 \pm 0,59	0,001	39,78
Endosulfán	1.000	4,33 \pm 1,36	0,001	65,50

Tabla 4.22: Bisfenoles

Sustancia	Concentracion (nM)	Efecto Proliferativo	PPR (%)	EPR (%)
Estradiol-17 β	0,01	6,61 \pm 0,30	100	100
MM1	1000	6,34 \pm 0,42	0,001	106,8
MM2	1000	6,74 \pm 0,9	0,001	114,8
MM3	100	5,93 \pm 0,22	0,01	98,6
MM4	10	7,2 \pm 0,65	0,1	124,0
MM5	10	7,19 \pm 0,75	0,1	123,8
MM6	100	6,83 \pm 0,56	0,01	116,6
MM7	100	5,53 \pm 0,64	0,01	90,6
MM8	10.000	5,5 \pm 0,42	0,0001	90,0
MM9	1.000	7,67 \pm 0,44	0,001	133,4



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Tabla 4.22: Bisfenoles

Sustancia	Concentracion (nM)	Efecto Proliferativo	PPR (%)	EPR (%)
Estradiol-17B	0,01	6,61±0,30	100	100
MM1	1000	6,34±0,42	0,001	106,8
MM2	1000	6,74±0,9	0,001	114,8
MM3	100	5,93±0,22	0,01	98,6
MM4	10	7,2±0,65	0,1	124,0
MM5	10	7,19±0,75	0,1	123,8
MM6	100	6,83±0,56	0,01	116,6
MM7	100	5,53±0,64	0,01	90,6
MM8	10.000	5,5±0,42	0,0001	90,0
MM9	1.000	7,67±0,44	0,001	133,4

4.1.2 Cuantificación de pS2

De forma paralela a los ensayos de proliferación celular (test E-SCREEN), se ha cuantificado en el medio de cultivo extracelular el acúmulo de la proteína secretada estrógenodependiente pS2, en presencia y en ausencia de estradiol-17 β .

Las Tablas 4.23 y 4.24 muestran las tasas de crecimiento celular, expresadas en número de células tras 144 horas de subcultivo, y la concentración de pS2 acumulada en el medio extracelular durante dicho tiempo. También se recoge la expresión relativa de la concentración de la proteína en función del número de células presentes en el cultivo y el factor de incremento respecto a los grupos celulares control, a los que se asignó un valor de 1.

Tabla 4.23

Producto	Conc. (M)	N° cél/poc. (X10 ³)	pS2 (ng/ml)	pS2/n°cél (ng/10 ³)	Variación
Control	0	63,2±1,4	3,4±1,1	53,6±8,7	1,0
E2	10 ⁻⁹	378,3±11,1	67,9±7,3	179,4±13,1	3,3
	10 ⁻⁷	140,3±12,1	8,5±1,2	60,9±3,8	1,1
MM 1	10 ⁻⁶	398,4±22,3	41,9±3,8	105,2±11,7	1,9
	10 ⁻⁵	400,6±25,8	90,1±6,9	225,1±11,9	4,2
MM2	10 ⁻⁷	183,9±16,5	8,4±1,7	46,1±2,3	0,9
	10 ⁻⁶	425,9±23,4	51,3±4,8	120,5±9,8	2,2
	10 ⁻⁵	396,2±29,6	93,2±6,8	235,4±23,8	4,4
MM3	10 ⁻⁷	324,2±21,6	23,0±2,1	71,2±2,3	1,3
	10 ⁻⁶	374,7±32,8	59,9±6,6	160,1±10,9	3,0
	10 ⁻⁵	374,7±15,9	67,5±9,3	180,3±16,7	3,3
MM4	10 ⁻⁷	455,0±41,2	41,2±3,4	90,6±6,5	1,7
	10 ⁻⁶	454,4±19,1	73,0±5,3	160,8±15,6	3,0
	10 ⁻⁵	437,3±26,4	81,9±9,5	187,5±10,9	3,5

Tabla 4.24

Producto	Conc. (M)	N° cél/poc. (X10 ³)	pS2 (ng/ml)	pS2/n°cél (ng/10 ⁶)	Variación
Control	0	63,2±1,4	3,4±1,1	53,6±8,7	1,0
E2	10 ⁻⁹	378,3±11,1	67,9±7,3	179,4±13,1	3,3
	10 ⁻⁷	437,9±32,9	79,6±5,3	182,2±11,9	3,4
MM5	10 ⁻⁶	429,1±31,1	82,7±6,1	192,8±17,6	3,6
	10 ⁻⁵	348,2±22,6	58,8±3,9	169,1±12,3	3,1
MM6	10 ⁻⁷	239,5±12,1	18,9±2,6	79,2±6,8	1,5
	10 ⁻⁶	428,4±23,8	77,9±1,3	182,2±15,9	3,4
	10 ⁻⁵	431,6±31,4	77,8±4,5	180,3±11,6	3,4
MM7	10 ⁻⁷	293,8±13,4	20,9±2,9	71,4±4,3	1,3
	10 ⁻⁶	349,4±22,9	59,8±4,3	171,5±9,9	3,2
	10 ⁻⁵	309,6±11,2	65,7±4,3	212,5±15,6	4,0
MM8	10 ⁻⁷	84,6±6,4	4,4±1,1	52,8±4,2	1,0
	10 ⁻⁶	173,8±11,1	9,3±1,3	53,6±11,6	1,0
	10 ⁻⁵	347,6±29,7	57,6±4,7	166,1±16,1	3,1
MM9	10 ⁻⁷	109,3±2,3	5,4±1,4	50,1±6,7	0,9
	10 ⁻⁶	197,8±11,6	15,6±2,3	79,2±5,2	1,5
	10 ⁻⁵	484,7±12,7	80,9±6,9	167,1±21,1	3,1

4.1.3 Test MVLN

En el estudio del efecto de compuestos químicos de conocida actividad estrogénica sobre la expresión de la enzima luciferasa, los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales, se ofrecen en las tablas 4.25 y 4.26. Los valores experimentales se expresaron como unidades de luminiscencia arbitrarias por ml de lisado celular (RLU/ml) y por mg de proteína (RLU/mg). Las tablas muestran la variación obtenida respecto al grupo control.

Las figuras 4.21 a 4.25 representan por otra parte, los porcentajes de actividad luciferasa (Activ. Lucif.) obtenidos en distintos experimentos tomando como referencia el grupo celular control.

Con objeto de analizar la especificidad del efecto estimulador se realizó el ensayo analizando conjuntamente el compuesto a la concentración en la que presenta mayor actividad y el antiestrógeno RU 58 668 en concentraciones 10^{-7} M y 10^{-8} M. Los resultados de tales ensayos se muestran en las tablas 4.27 y 4.28 y en las figuras 4.25 y 4.26, respectivamente.

Tabla 4.25

Producto	Concentración(M)	RLU/ml (x10 ⁴)	RLU/mg prot. (x10 ⁴)	Actividad Luciferasa
Control	0	64,64±6,2	75,19±5,3	1,0
E2	10 ⁻¹⁰	172,7±11,1	18,71±3,2	2,5
Ru58668	10 ⁻⁷	22,44±1,2	28,60±1,5	0,3
MM 1	10 ⁻⁸	67,65±5,2	81,94±6,5	1,1
	10 ⁻⁷	71,46±5,4	84,08±2,3	1,1
	10 ⁻⁶	124,1±11,3	141,73±14,6	1,8
	10 ⁻⁵	181,9±13,2	209,7±12,9	2,7
MM2	10 ⁻⁸	57,97±3,4	81,93±1,5	1,1
	10 ⁻⁷	68,51±5,3	93,86±6,4	1,2
	10 ⁻⁶	122,3±13,7	161,6±15,4	2,1
	10 ⁻⁵	153,3±9,4	203,1±16,9	2,7
MM3	10 ⁻⁸	54,44±3,1	83,41±2,1	1,1
	10 ⁻⁷	77,78±2,8	120,3±11,1	1,6
	10 ⁻⁶	142,3±13,1	210,5±15,3	2,8
	10 ⁻⁵	145,3±11,5	211,4±12,8	2,8
MM4	10 ⁻⁸	58,81±2,9	80,51±3,2	1,1
	10 ⁻⁷	94,69±6,3	131,8±11,4	1,7
	10 ⁻⁶	151,9±9,9	196,3±12,6	2,6
	10 ⁻⁵	164,5±13,2	216,9±13,2	2,9

Tabla 4.26

Producto	Concentración(M)	RLU/ml (x10 ⁶)	RLU/mg prot. (x10 ⁶)	Actividad Luciferasa
Control	0	64,64±6,1	75,19±5,3	1,0
E2	10 ⁻¹⁰	172,7±11,1	18,71±3,2	2,5
Ru58668	10 ⁻⁷	22,44±1,2	28,60±1,5	0,3
MM 5	10 ⁻⁸	96,40±4,5	105,2±11,2	1,4
	10 ⁻⁷	135,3±11,1	150,3±10,6	2,0
	10 ⁻⁶	153,1±12,3	165,4±13,8	2,2
	10 ⁻⁵	135,0±14,1	150,3±11,2	2,0
MM6	10 ⁻⁸	58,98±2,5	75,30±5,4	1,0
	10 ⁻⁷	89,44±3,6	106,0±9,8	1,4
	10 ⁻⁶	147,2±8,9	167,1±10,3	2,2
	10 ⁻⁵	107,0±9,6	127,8±11,4	1,7
MM7	10 ⁻⁸	85,49±2,1	97,74±4,9	1,3
	10 ⁻⁷	109,6±11,2	135,3±10,6	1,8
	10 ⁻⁶	140,2±12,3	168,3±12,3	2,2
	10 ⁻⁵	133,2±11,4	167,9±12,3	2,2
MM8	10 ⁻⁸	54,37±2,1	82,72±4,9	1,1
	10 ⁻⁷	53,90±4,3	83,10±5,8	1,1
	10 ⁻⁶	118,4±5,3	187,9±12,4	2,5
	10 ⁻⁵	168,4±	270,6±12,8	3,6
MM9	10 ⁻⁸	49,35±	76,20±4,3	1,0
	10 ⁻⁷	52,02±	82,92±2,8	1,1
	10 ⁻⁶	70,31±	97,74±8,6	1,3
	10 ⁻⁵	115,71±	167,8±13,2	2,2

Tabla 4.27

Producto	RLU/ml (x10 ⁶)	RLU/mg prot. (x10 ⁶)	Actividad Luciferasa
Control	49,23±4,3	56,77±3,2	1,0
E2 10 ⁻¹⁰	157,9±11,1	175,9±11,1	3,1
Ru58668 10 ⁻⁷	21,22±1,8	26,20±2,3	0,4
MM1 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁸	46,24±3,2	55,87±5,4	0,9
MM2 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁸	58,79±1,9	66,00±2,7	1,1
MM3 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁸	38,06±3,1	44,63±3,1	0,8
MM4 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁸	156,4±14,2	167,7±12,1	2,9
MM5 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁸	121,3±10,9	142,1±13,1	2,5
MM6 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁸	45,31±2,5	56,09±3,2	1,0
MM7 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁸	61,64±5,6	78,03±4,6	1,3
MM8 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁸	94,22±3,8	117,0±11,0	2,0
MM9 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁸	27,92±7,9	37,53±3,3	0,6

RESULTADOS**Tabla 4.28**

Producto	RLU/ml (x10⁶)	RLU/mg prot. (x10⁶)	Actividad Luciferasa
Control	58,80±2,6	64,10±3,2	1,0
E2 10 ⁻¹⁰	186,6±11,1	189,9±12,1	2,9
Ru58668 10 ⁻⁷	27,98±2,1	32,54±6,9	0,46
MM1 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁷	35,73±1,1	41,55±1,2	0,6
MM2 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁷	30,04±3,2	35,98±2,2	0,5
MM3 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁷	27,88±1,5	33,19±1,9	0,5
MM4 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁷	60,87±6,4	66,90±4,5	1,0
MM5 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁷	41,64±2,3	49,14±6,9	0,7
MM6 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁷	25,34±1,8	30,81±4,3	0,4
MM7 10 ⁻⁶ + Ru 10 ⁻⁷	30,51±4,2	36,54±2,8	0,5
MM8 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁷	37,12±5,1	44,37±3,6	0,7
MM9 10 ⁻⁵ + Ru 10 ⁻⁷	25,59±3,4	30,93±7,8	0,4

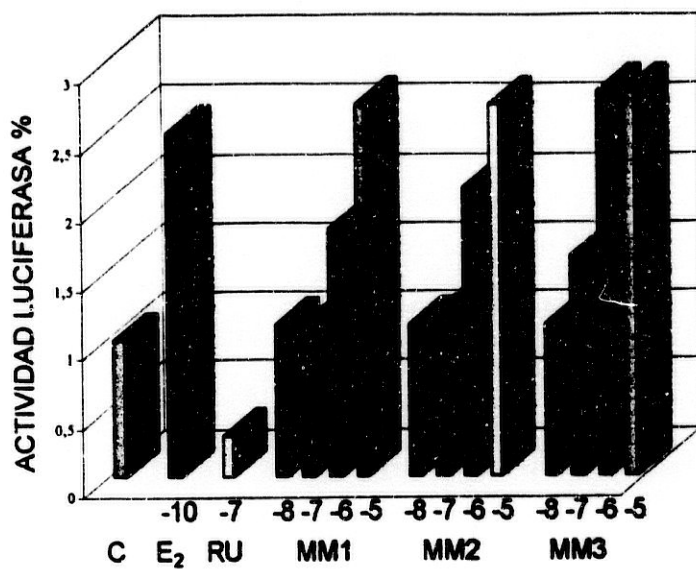


Fig 4.21

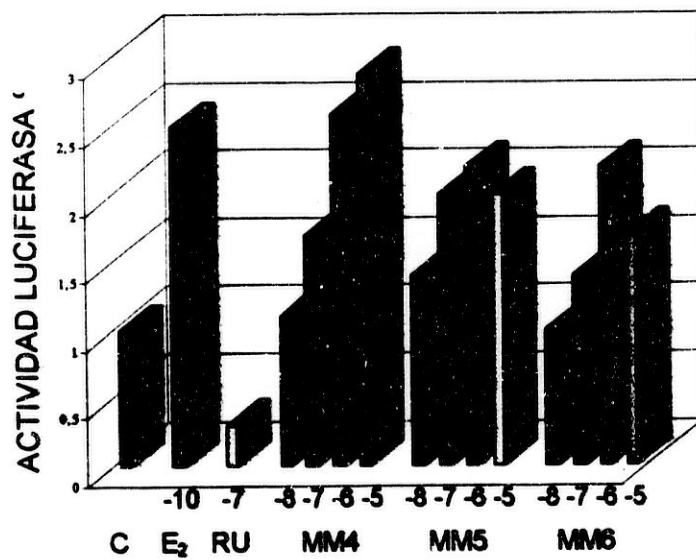


Fig 4.22

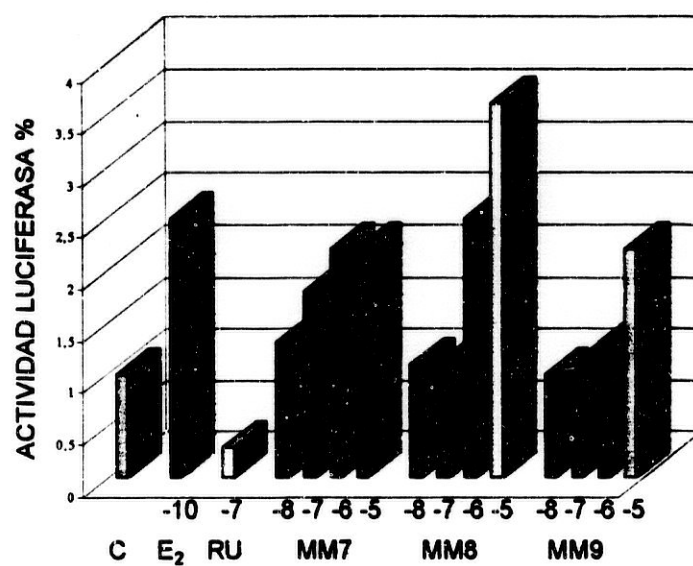


Fig 4.23

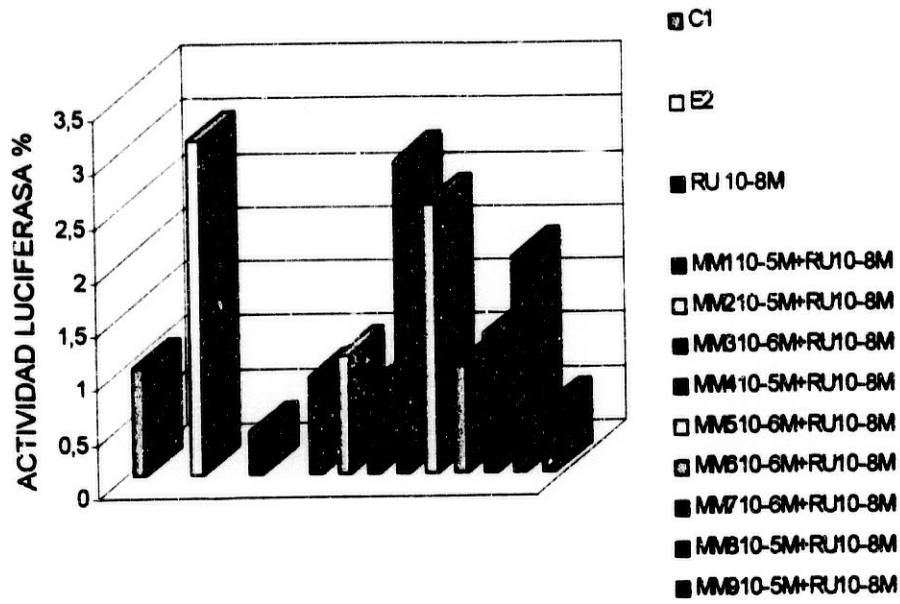


Fig 4.24

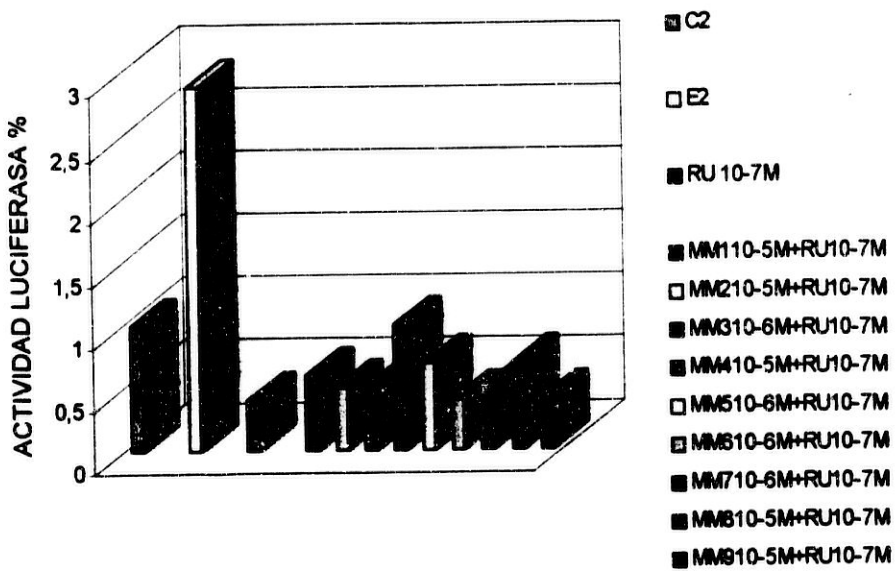


Fig 4.25

4.1.4 Medida de ARNm de pS2: "Northern Blott"

De forma paralela a la cuantificación en el medio de cultivo extracelular de la proteína pS2 secretada bajo estímulo estrogénico, se ha cuantificado el ARNm de dicha proteína tras 24 horas de exposición de las células MCF-7 a sustancias de conocida actividad estrogénica.

Las tablas 4.29 y 4.30 muestran los valores medios obtenidos del análisis densitométrico realizado a los geles autorradiografiados. Los valores experimentales se han expresado en porcentaje del área obtenida en el densitómetro (Área %), y se han normalizado por el control ribosomal ($\text{Área}/\text{Área ARNr}$) y la variación obtenida tomando como referencia el grupo celular control.

Las figuras de 4.26 a 4.29 recogen la expresión relativa de ARNm respecto a los grupos celulares control, a los que hemos asignado un valor 1, para los derivados del bisfenol.

Tabla 4.29

Producto	Conc.	Área	Área/Área ARNr	Variación
Control	0	1,2±0,1	0,16±0,01	1,0
E2	10 ⁻⁸	10,1±1,1	1,0±0,02	6,1
	10 ⁻⁸	1,0±0,09	0,12±0,009	0,8
MM1	10 ⁻⁷	4,9±0,2	0,55±0,05	3,3
	10 ⁻⁶	4,7±0,3	0,48±0,02	2,9
	10 ⁻⁵	9,9±0,6	1,11±0,08	7,4
MM2	10 ⁻⁸	0,8±0,003	0,09±0,003	0,6
	10 ⁻⁷	5,4±0,6	0,6±0,02	3,8
	10 ⁻⁶	8,3±0,2	0,95±0,08	5,8
	10 ⁻⁵	14,9±1,2	1,66±0,01	10,4
MM3	10 ⁻⁸	3,1±0,4	0,35±0,04	2,2
	10 ⁻⁷	6,7±0,5	0,75±0,06	4,7
	10 ⁻⁶	8,7±0,3	1,07±0,1	6,5
	10 ⁻⁵	13,3±1,4	1,48±0,1	9,3
MM4	10 ⁻⁸	3,9±0,1	0,44±0,03	2,8
	10 ⁻⁷	7,5±0,5	0,84±0,07	5,3
	10 ⁻⁶	11,9±1,2	1,29±0,09	7,8
	10 ⁻⁵	14,7±2,4	1,64±0,1	10,3
MM5	10 ⁻⁸	4,8±0,6	0,54±0,02	3,4
	10 ⁻⁷	7,2±0,8	0,80±0,04	5,0
	10 ⁻⁶	14,1±1,1	1,41±0,09	8,5
	10 ⁻⁵	13,6±0,9	1,52±0,1	9,5

RESULTADOS

Tabla 4.30

Producto	Conc. (M)	Área	Área/Área ARNr	Variación
Control	0	1,2±0,1	0,16±0,01	1,0
E2	10 ⁻⁸	10,1±1,1	1,0±0,02	6,1
MM6	10 ⁻⁸	1,8±0,09	0,20±0,04	1,3
	10 ⁻⁷	3,1±0,1	0,35±0,01	2,2
	10 ⁻⁶	11,4±1,4	1,14±0,1	6,9
	10 ⁻⁵	4,6±0,3	0,52±0,03	3,3
MM7	10 ⁻⁸	18,9±1,7	0,33±0,04	2,1
	10 ⁻⁷	3,2±0,5	0,36±0,02	2,3
	10 ⁻⁶	12,8±1,6	1,33±0,2	8,1
	10 ⁻⁵	4,4±1,3	0,49±0,03	3,1
MM8	10 ⁻⁸	1,0±0,006	0,12±0,009	0,8
	10 ⁻⁷	2,5±0,6	0,28±0,01	1,8
	10 ⁻⁶	9,1±0,4	1,04±0,2	6,3
	10 ⁻⁵	3,6±0,004	0,40±0,007	2,5
MM9	10 ⁻⁸	0,9±0,007	0,11±0,002	0,7
	10 ⁻⁷	2,2±0,3	0,25±0,001	1,6
	10 ⁻⁶	7,7±0,2	0,86±0,003	5,2
	10 ⁻⁵	7,1±0,1	0,27±0,002	1,7

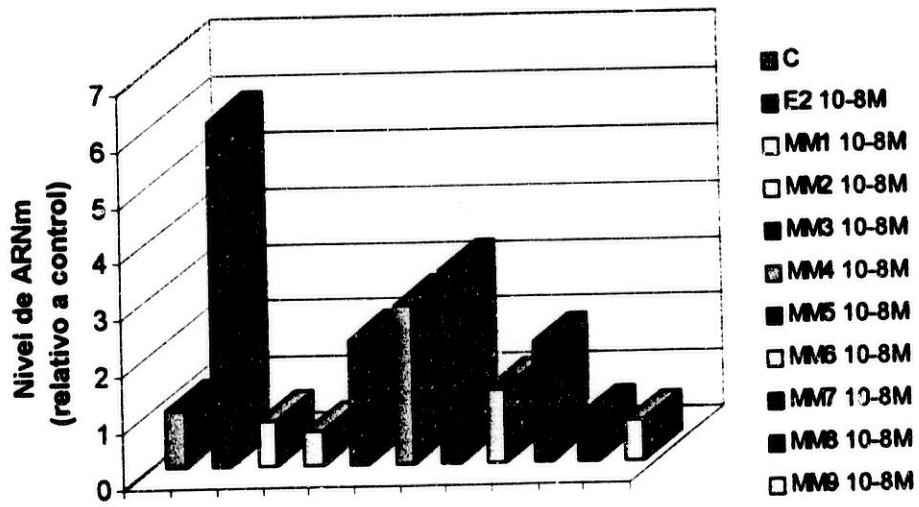
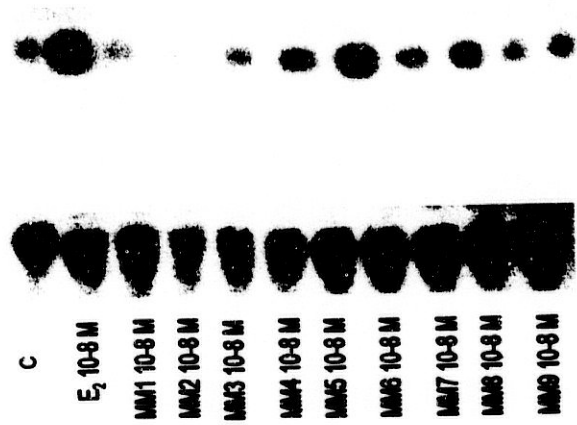


Fig 4.26

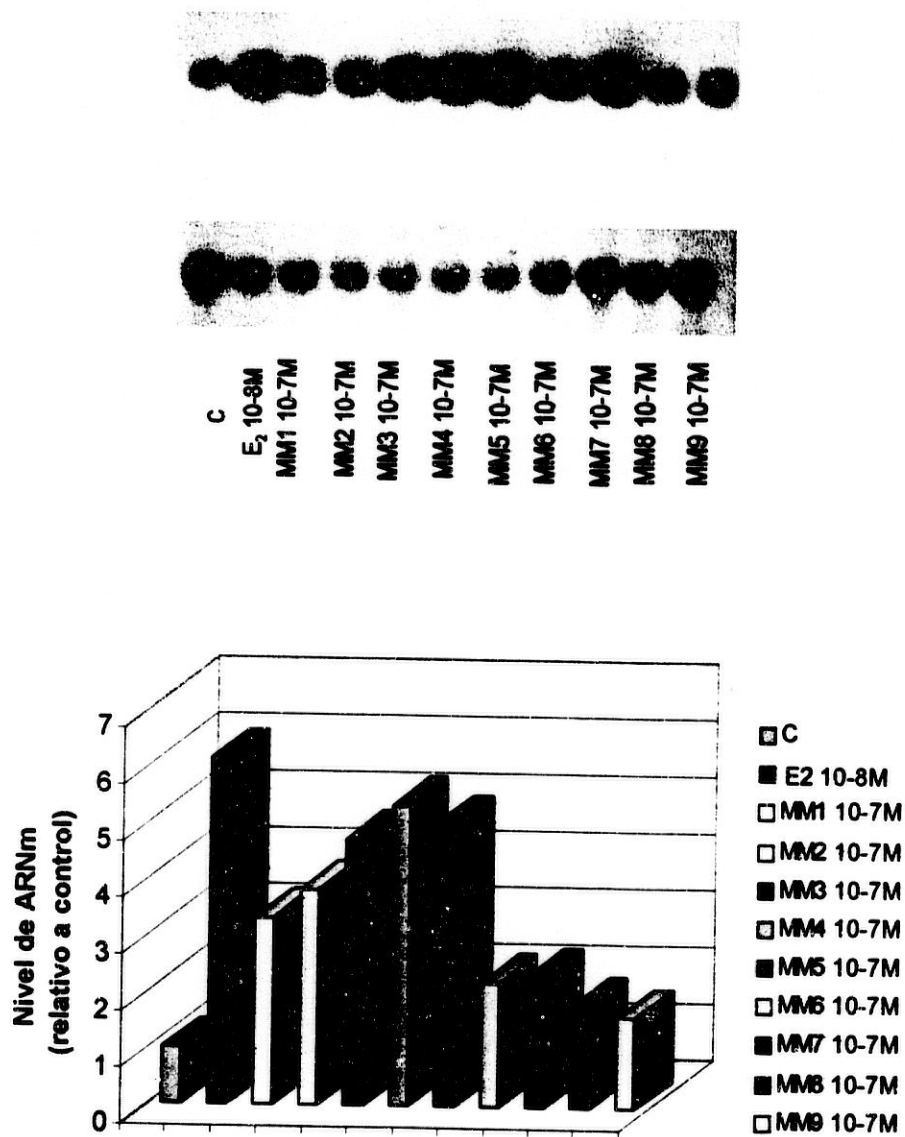


Fig 4.27

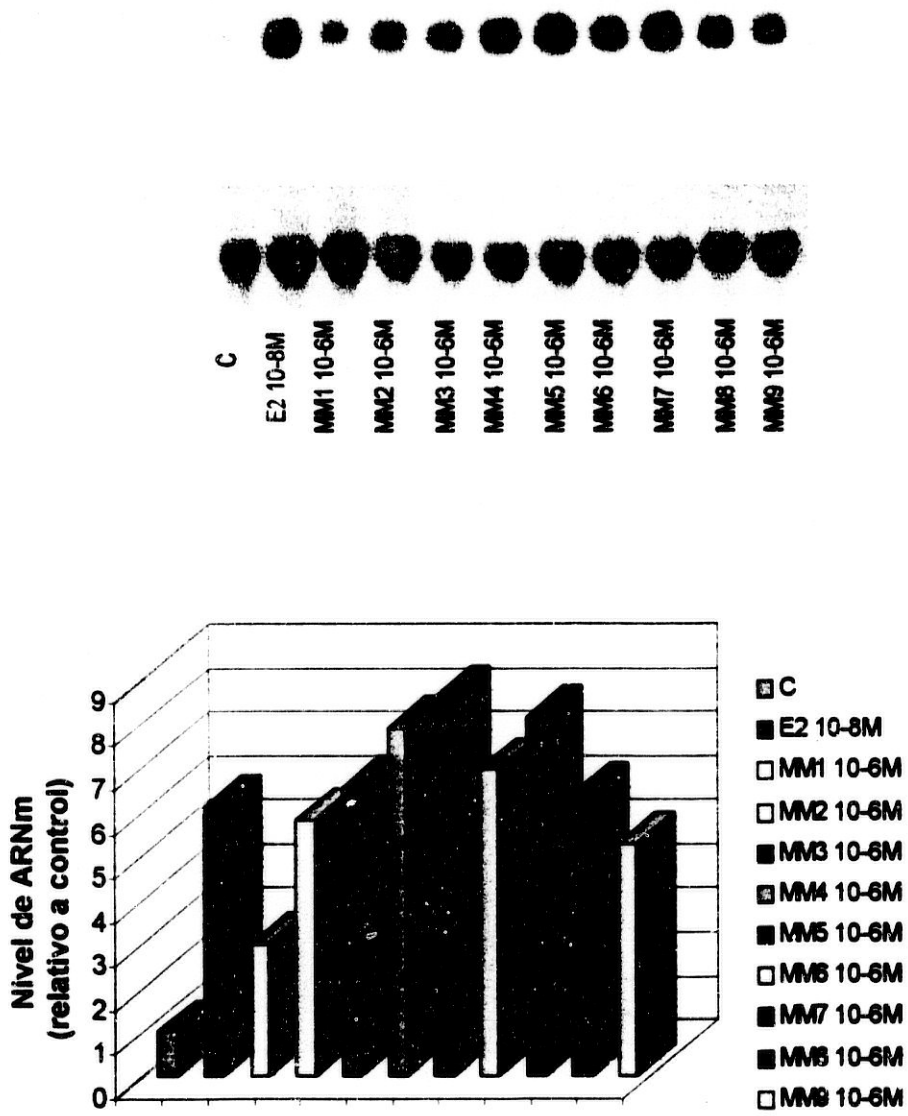


Fig 4.28

RESULTADOS

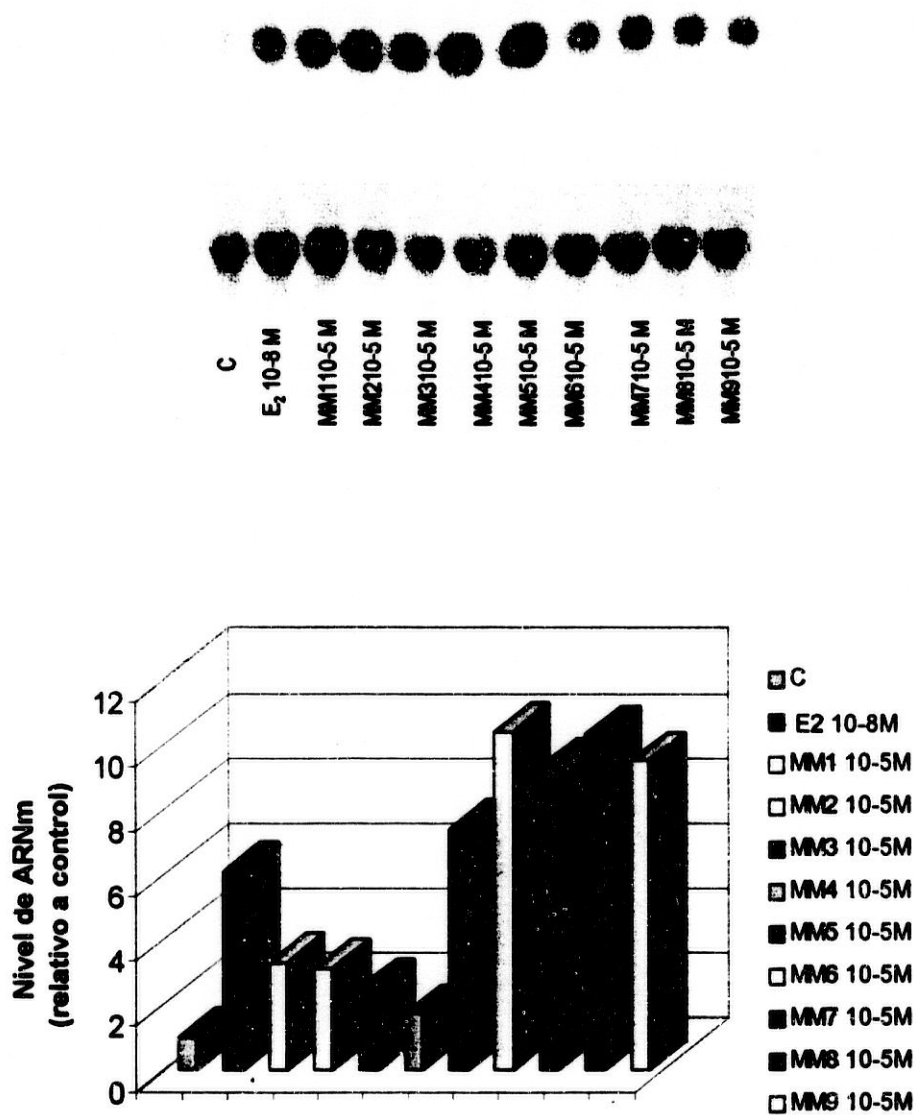


Fig 4.29

4.2 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD HORMONAL: CARGA ESTROGÉNICA

Se ha aplicado la metodología del bioensayo E-SCREEN a la cuantificación de la actividad estrogénica de las fracciones cromatográficas α y β , definidas mediante cromatografía líquida preparativa.

Para ello, siguiendo el protocolo experimental antes descrito, se ha analizado, para cada una de las muestras correspondientes a las 200 pacientes incluidas en el estudio, la capacidad de estimulación del crecimiento de las células MCF-7.

4.2.1 Cálculo de la curva dosis-respuesta para el estradiol-17 β

El primer paso para la determinación de la carga estrogénica de los extractos analizados fue la definición de una curva dosis-respuesta para el estradiol en células MCF-7, que pudiese ser utilizada como curva estándar. Se midió, para ello, el efecto proliferativo inducido en las células MCF-7, tras 144 horas de subcultivo en medio DMEM suplementado con suero humano desprovisto de estrógenos (CDHuS), y en grupos celulares tratados con concentraciones crecientes 10^{-9} M- 10^{-14} M de estradiol-17 β . Los valores medios de proliferación para cada concentración de la hormona natural se utilizaron con posterioridad para transformar efecto hormonal en unidades equivalentes de estradiol. La representación gráfica de los valores experimentales obtenidos queda reflejada en la figura 4.30.

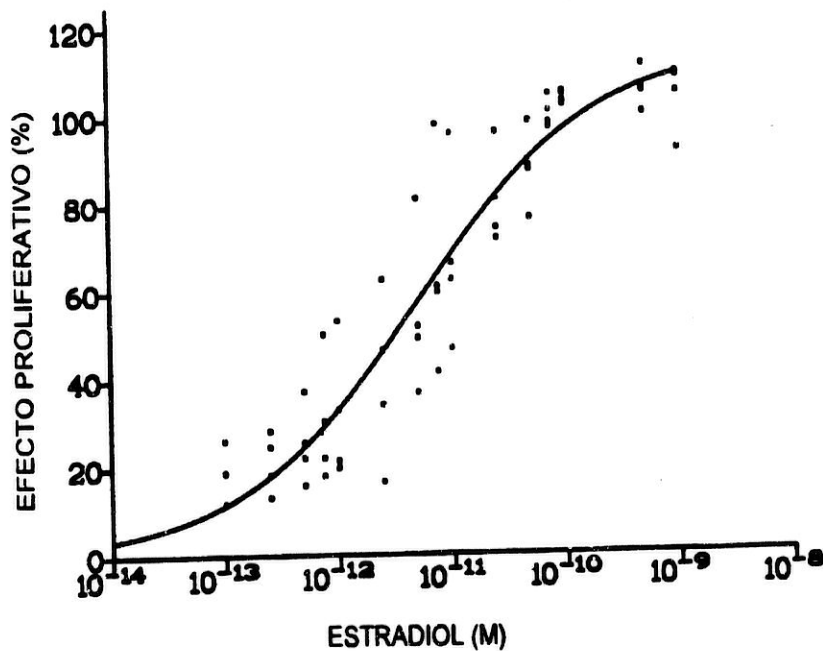


Fig 4.30

4.2.2 Evaluación de la estrogenicidad de las fracciones α y β : Equivalente estradiol (Eeq)

Las fracciones cromatográficas α y β obtenidas por cromatografía líquida preparativa se analizaron mediante el test E-SCREEN para determinar la carga hormonal correspondiente a cada fracción. Para ello, los extractos secos se resuspendieron en 5 ml de medio DMEM suplementado con suero humano tratado con carbón dextrano (CDHuS). Posteriormente, las fracciones se hicieron pasar a través de un filtro de 0,22 μm y se diluyeron en medio de cultivo (1:1, 1:5, y 1:10). Las diluciones obtenidas se analizaron junto a grupos celulares no tratados (control) y grupos celulares expuestos a estradiol-17 β 10^{-11} M.

El efecto proliferativo de las fracciones α y β se refirió a el máximo efecto proliferativo observado, tomando como referencia el grupo celular tratado con estradiol. Los valores obtenidos para ambos extractos se extrapolaron en la curva dosis-respuesta para el estradiol, obteniendo así los denominados "equivalentes estradiol" (Eeq), que es una unidad indicativa de la actividad estrogénica total de cada extracto.

La fig 4.31 muestra una placa de 24 pocillos con células MCF-7 teñidas con sulforrodamina-B después de 144 horas de crecimiento, en presencia de estradiol-17 β 10^{-11} M (estradiol), y de diluciones de las fracciones α y β de una muestra de tejido adiposo obtenidas por cromatografía líquida preparativa. El efecto proliferativo para cada dilución fue leído en la curva dosis-respuesta.

En las tablas 4.31 y 4.32 se muestran los resultados del análisis biológico de casos y controles pertenecientes al Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada y en las tablas 4.33 a 4.37 se muestran los análisis efectuados a las muestras procedentes del Hospital "Virgen de las Nieves" de Granada. Las tablas 4.38 y 4.39 recogen, finalmente, los resultados de carga estrogénica de las muestras procedentes del Hospital "Torrecárdenas" de Almería.

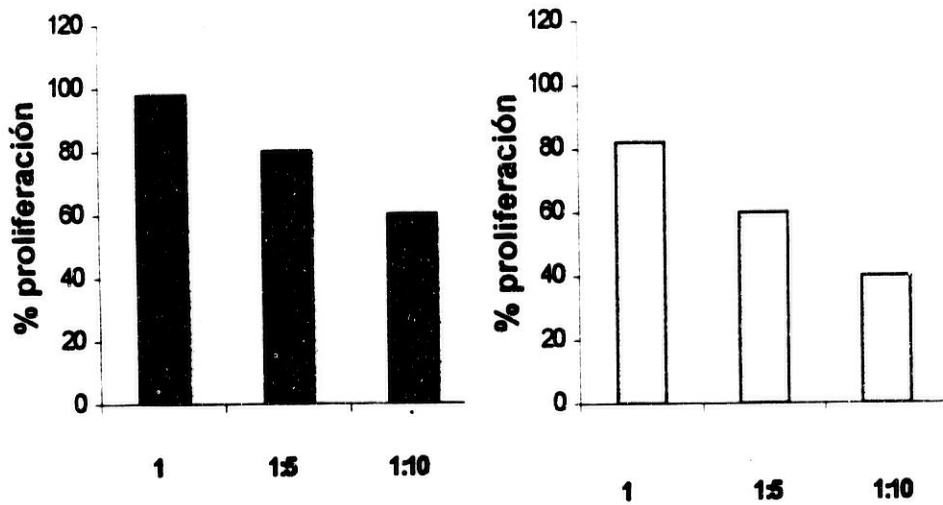
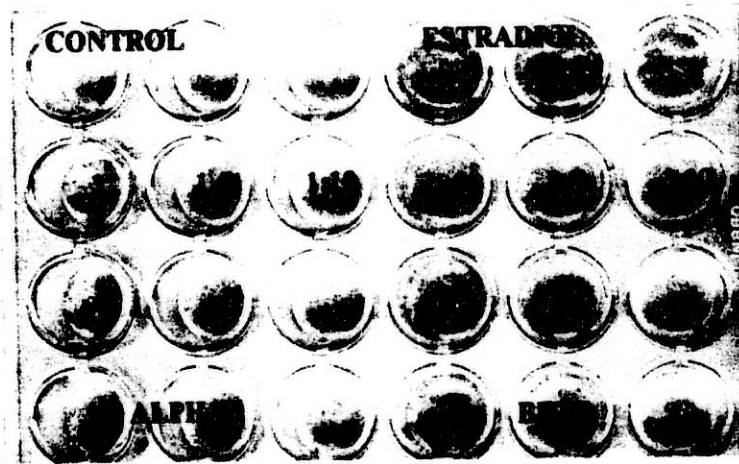


Fig 4.31

Tabla 4.31

Casos	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{-11}
037	0,1598	8,00	3,70	4,00	2,50
039	0,1805	5,00	2,70	0,11	6,09
047	0,1754	0,02	0,01	0,002	0,001
054	0,1709	-	-	-	-
057	0,1944	0,27	0,13	0,27	0,13
059	0,1838	-	-	-	-
061	0,1831	3,00	1,63	-	-
063	0,1063	6,00	5,64	6,00	5,92
073	0,0170	-	-	1,60	9,28
092	0,1461	-	-	-	-
106	0,1806	1,70	0,94	3,00	1,66
120	0,2697	50,00	1,85	3,00	1,66
149	0,2776	-	-	0,60	0,21
152	0,2868	2,00	0,69	1,00	3,48
156	0,1674	-	-	1	0,59
157	0,1835	7	3,81	1,9	1,03
161	0,2116	-	-	-	-
163	0,1358	5,00	3,68	10,00	7,36
170	0,3259	5,00	1,53	150,00	46,02
174	0,2642	8,50	3,21	52,00	19,68

-: no efecto

Tabla 4.32

Controles	lipidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lipido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lipido) 10^{-11}
031	0,1829	6,00	3,28	3,00	1,64
044	0,0964	50,00	51,86	5,00	51,86
045	0,1853	6	3,23	3	1,61
053	0,1590	0,95	0,59	1,5	0,94
060	0,1853	4	2,15	90	48,57
062	0,1704	5,00	2,93	5,00	2,93
065	0,1882	1,00	53,11	-	-
070	0,1600	9,00	5,62	9,00	5,62
071	0,1897	-	-	5	2,63
074	0,1814	30	16,53	3,30	1,81
083	0,1307	63,0	48,18	0,65	0,49
084	0,1798	-	-	-	-
085	0,1841	150,0	81,43	-	-
087	0,1484	-	-	-	-
093	0,1574	-	-	-	-
095	0,1623	3	1,84	1,3	0,80
104	0,1588	1,4	0,88	16,50	10,39
105	0,1799	-	-	0,65	0,36
111	0,1731	5,00	2,88	5,00	2,88
119	0,1810	2,20	1,21	24,00	13,26

-: no efecto

Tabla 4.33

Casos	lípidos (g)	Fración α (EqM) 10^{-12}	Fración α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fración β (EqM) 10^{-12}	Fración β (EqM/g lípido) 10^{-11}
2001	0,2012	86,00	42,74	350,00	17,39
2005	0,1566	1,60	1,02	42,00	26,82
2009	0,1208	0,30	0,24	0,20	0,16
2010	0,1779	4,00	2,24	4,50	2,52
2012	0,1370	0,85	0,62	1,70	1,24
2013	0,1148	5,00	4,35	-	-
2016	0,1790	8,00	4,46	-	-
2020	0,1515	1,90	1,25	2,80	1,84
2024	0,1895	0,002	0,01	0,43	0,26
2025	0,1114	2,50	2,24	8,50	7,63
2030	0,2326	0,27	0,11	4,50	1,93
2035	0,1685	0,43	0,25	-	-
2038	0,1880	4,90	2,60	18,50	9,84
2039	0,1943	9,60	4,94	2,30	1,18
2042	0,1746	0,65	0,37	-	-
2043	0,2119	-	-	0,007	0,003
2045	0,1928	2,30	1,19	-	-
2046	0,1742	1,60	0,91	150,00	86,10
2053	0,2036	-	-	0,004	0,001
2055	0,1876	-	-	-	-

-: no efecto

Tabla 4.34

Casos	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{11}
2058	0,1600	4,00	2,50	90,00	56,25
2059	0,1880	4,00	2,12	4,00	2,12
2060	0,1769	100,00	56,52	70,00	39,57
2062	0,1996	-	-	-	-
2063	0,1899	2,30	1,21	7,00	3,68
2065	0,1890	-	-	-	-
2067	0,1577	1,70	1,07	1,5	0,95
2068	0,1935	150,00	77,51	4,00	2,06
2069	0,2000	0,02	0,01	-	-
2074	0,1308	4,00	3,05	1,00	0,76
2086	0,1576	0,15	0,07	0,11	0,07
2092	0,1877	60,00	31,96	0,85	0,45
2093	0,1782	0,11	-	-	-
2094	0,1649	40,00	24,25	10,00	6,06
2099	0,0330	0,27	0,79	0,08	2,36
2104	0,1789	-	-	0,65	0,36
2105	0,1764	-	-	0,65	0,36
2106	0,1880	0,65	0,34	0,32	0,17
2107	0,1631	0,25	0,15	15,00	91,96
2109	0,1641	-	-	-	-

-: no efecto

Tabla 4.35

Casos	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{-11}
2111	0,1692	0,25	0,14	0,25	0,14
2112	0,1670	-	-	7,00	4,19
2120	0,1457	150,00	102,95	3,70	2,53
2121	0,1935	0,70	0,36	0,60	0,31
2124	0,1817	0,02	0,01	0,02	0,01
2158	0,1596	150,00	93,98	150,00	93,98
2164	0,1781	-	-	-	-
2165	0,2044	0,54	0,26	-	-
2175	0,1323	-	-	10,00	7,55
2185	0,1136	1,70	1,49	3,00	2,64
2186	0,1663	2,80	1,68	6,00	3,60
2187	0,1600	150,00	93,75	50,00	31,25
2199	0,1815	-	-	1,40	0,77
2212	0,077	0,85	1,09	1,90	2,43
2221	0,1848	3,30	1,78	4,50	2,43
2246	0,1813	0,004	0,02	0,32	0,17
2248	0,1203	-	-	1,90	1,57
2249	0,1971	-	-	-	-
2268	0,1925	0,25	0,12	0,32	0,16
2269	0,089	-	-	-	-

-: no efecto

Tabla 4.36

Controles	lípidos (g)	Fracción α (EqM)10 ⁻¹²	Fracción α (EqM/g lípido)10 ⁻¹¹	Fracción β (EqM)10 ⁻¹²	Fracción β (EqM/g lípido)10 ⁻¹¹
2002	0,1600	-	-	25,00	15,62
2003	0,1460	33,00	22,60	1,00	0,68
2004	0,1723	-	-	1,10	0,63
2017	0,1919	-	-	2,00	1,04
2031	0,2003	-	-	-	-
2036	0,1726	-	-	10,00	5,79
2037	0,1790	5,00	2,79	-	-
2051	0,1826	5,00	2,73	6,00	3,28
2057	0,1925	150,00	77,92	130,00	67,53
2064	0,1936	-	-	0,25	0,12
2072	0,1917	-	-	-	-
2073	-	-	-	70,00	50,21
2077	0,1833	-	-	1,50	81,83
2080	0,1691	3,00	1,77	5,00	2,95
2082	0,2081	150,0	72,08	3,30	15,85
2089	0,2081	-	-	-	-
2090	0,1969	1,5	0,76	3,00	1,52
2091	0,1747	5,00	-	-	-
2095	0,1551	-	-	0,80	0,51
2097	0,1959	9,00	1,12	-	-

-: no efecto

Tabla 4.37

Controles	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{-11}
2101	0,1604	3,00	1,87	8,00	4,98
2102	0,1901	0,54	0,28	3,00	1,57
2116	0,1773	-	-	66,00	37,22
2130		0,004	0,002	15,00	9,57
2132	0,1878	-	-	2,30	1,22
2135	0,1786	-	-	-	-
2136	0,1603	2,50	1,55	-	-
2138	0,1953	5,00			
2142	0,1499	66,00	44,02	150,0	100,07
2149		1,40	0,87	2,30	1,43
2153		1,70	0,98	2,70	1,56
2156	0,1624	44,00	27,09	44,00	27,09
2163	0,1689	-	-	-	-
2166	0,1581	-	-	8,00	5,06
2177	0,1737	3,70	2,13	8,00	4,60
2181	0,1507	150,00	99,53	0,30	0,19
2182	0,1982	2,80	1,41	6,30	3,17
2189	0,1737	4,00	2,30	-	-
2191	0,1632	150,00	91,91	10,00	6,12
2193	0,1628	-	-	1,00	0,61

-: no efecto

Tabla 4.38

Controles	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{11}	Fracción β (EqM) 10^{12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{11}
2197	0,1826	-	-	0,57	0,31
2198	0,2065	0,54	0,26	1,00	0,48
2202	0,1638	0,70	0,42	4,00	2,44
2203	0,1825	3,00	1,64	20,00	10,95
2205	0,1957	-	-	-	-
2207	0,1033	0,07	0,07	0,04	0,03
2213	0,1872	-	-	3,3	1,76
2215	0,1762	-	-	-	-
2217	0,1544	0,09	0,61	1,50	0,97
2219	0,1281	0,47	0,36	1,60	1,24
2227	0,1899	-	-	150,00	257,60
2229	0,1899	-	-	0,03	0,15
2232	0,1650	0,04	2,42	8,50	5,15
2233	0,1941	-	-	-	-
2255	0,1812	-	-	0,43	0,23
2256	0,1836	-	-	0,65	0,35
2257	0,1797	-	-	-	-
2259	0,1126	-	-	-	-
2274	0,1362	39,00	28,62	5,70	4,18
2278	0,1853	-	-	-	-

- : no efecto

RESULTADOS

Tabla 4.39

Casos	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{11}	Fracción β (EqM) 10^{12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{11}
4008	0,1612	14,00	8,68	8,50	5,27
4011	0,1661	-	-	0,04	0,02
4013	0,1548	17,00	10,98	5,00	3,22
4014	0,1861	3,30	1,77	30,00	16,12
4017	0,0698	-	-	1,00	1,43
4057	0,1729	3,30	1,90	0,07	0,04
4063	0,1634	150,00	91,79	1,00	0,61
4064	0,1877	-	-	1,50	0,79
4071	0,0907	30,00	33,07	2,50	2,75
4097	0,1859	-	-	2,50	1,34
4109	0,1751	10,00	5,71	75,00	42,83
4112	0,1837	-	-	-	-
4121	0,1872	2,70	1,44	-	-
4129	0,1839	-	-	-	-
4130	0,1450	8,50	4,71	52,50	29,11
4131	0,1803	0,35	0,19	-	-
4136	0,1685	7,70	4,56	150,00	89,02
4142	0,1872	-	-	0,07	0,03
4152	0,1860	-	-	0,85	0,45
4153	0,1799	-	-	0,46	0,25

-: no efecto

Tabla 4.40

Controles	lípidos (g)	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{-11}
4054	0,1825	0,20	0,10	20,00	10,95
4056	0,1471	3,90	2,65	50,00	33,99
4059	0,1623	0,20	0,12	0,35	0,21
4060	0,1645	6,50	3,95	150,00	91,18
4065	0,1508	2,30	1,52	0,95	0,62
4068	0,1827	-	-	5,00	2,73
4076	0,1670	0,54	0,32	-	-
4087	0,1629	-	-	4,00	2,45
4090	0,1554	25,00	16,08	0,27	0,17
4094	0,1526	-	-	-	-
4102	0,1644	-	-	-	-
4106	0,1835	11,50	6,26	5,10	2,77
4108	0,1778	9,50	5,34	10,00	5,62
4114	0,1814	1,10	0,60	-	-
4125	0,1766	-	-	6,00	3,39
4137	0,1025	3,70	3,60	0,50	0,48
4138	0,1600	0,18	0,11	0,27	0,16
4140	0,1679	150,00	89,33	6,50	3,87
4141	0,1595	-	-	-	-
4161	-	-	-	-	-

: no efecto

4.2.3 Tratamiento estadístico

Una vez obtenidos los resultados, se aplicó a los mismos el análisis estadístico descrito. De entrada y basándonos en la discontinuidad de los datos obtenidos, se concluyó que la distribución de los resultados no es normal.

Se analizaron, a continuación, los parámetros propios de un Estudio Comparativo de Población (E.C.P.), tratando de apreciar la existencia de diferencias entre los resultados obtenidos en casos y controles tras el análisis de las muestras. Los parámetros analizados fueron: media, mediana, desviación estándar y máximo, centrándose la observación en los parámetros que relacionan frecuencia de sucesos. Las tablas 4.41 a 4.43 recogen los parámetros citados.

Tabla 4.41: Casos

	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{-11}
Máximo	150,0	102,9	150,0	93,9
Mediana	0,67	0,36	1,00	0,76
$\pm\sigma$	35,2	21,3	35,3	19,5
Media	13,0	7,6	14,3	7,9

Tabla 4.42: Controles

	Fracción α (EqM) 10^{-12}	Fracción α (EqM/g lípido) 10^{-11}	Fracción β (EqM) 10^{-12}	Fracción β (EqM/g lípido) 10^{-11}
Máximo	150,0	91,9	150,0	257,6
Mediana	0,62	0,34	1,80	0,80
$\pm\sigma$	36,6	19,2	31,0	30,2
Media	13,9	7,0	12,4	9,0

Tabla 4.43

	Casos n=100	Controles n= 100	O.R	LC 95%
EEqM α				
>0	69	59	1,5	1,17-3,30
<0	31	41	1	
EqM β				
>0	78	75	1,18	0,69-2,81
<0	22	25	1	

4.3 ANÁLISIS DE MOLÉCULAS ORGANOCLORADAS EN TEJIDO ADIPOSEO HUMANO

Hemos procedido a la identificación de los contaminantes químicos presentes en las muestras biológicas estudiadas, mediante el análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE). Para ello, se analizaron 100 muestras de tejido adiposo de enfermas afectas de cáncer de mama y 100 muestras pertenecientes a enfermas sin patología mamaria. La metodología seguida fue la siguiente:

1. Se pesaron 0,2 g de muestra y se sometieron al proceso de extracción de moléculas organocloradas anteriormente descrito.
2. El extracto obtenido se desecó completamente en corriente de nitrógeno.
3. El residuo seco se solubilizó en 500 μ l y se sometió a purificación mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa (HPLC).
4. La fracción α obtenida mediante cromatografía líquida preparativa se redisolvió en 1 ml de hexano y se separaron dos alícuotas: 0,9 ml se analizaron en el ensayo biológico y 0,1 ml marcados con el patrón interno se analizaron por cromatografía de gases y detector de captura de electrones (CG/DCE) en las condiciones ya establecidas.

Las figuras 4.32 y 4.33 muestran algunos de los cromatogramas obtenidos. Las tablas 4.44 a 4.49 ofrecen, por otra parte, el contenido de pesticidas organoclorados observado en el análisis de tejido adiposo de casos y controles pertenecientes al Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada. Por último, en las tablas 4.50 a 4.66 se muestran los análisis efectuados a las muestras procedentes del

Hospital "Virgen de las Nieves" de Granada y en las tablas 4.67 a 4.73 quedan recogidos los residuos de los pesticidas organoclorados estudiados en muestras procedentes del Hospital "Torrecárdenas de Almería". Los valores de las tablas se expresan en ng/g de lípido de la muestra, previa estimación en todas las muestras del contenido en lípidos del tejido adiposo.

RESULTADOS

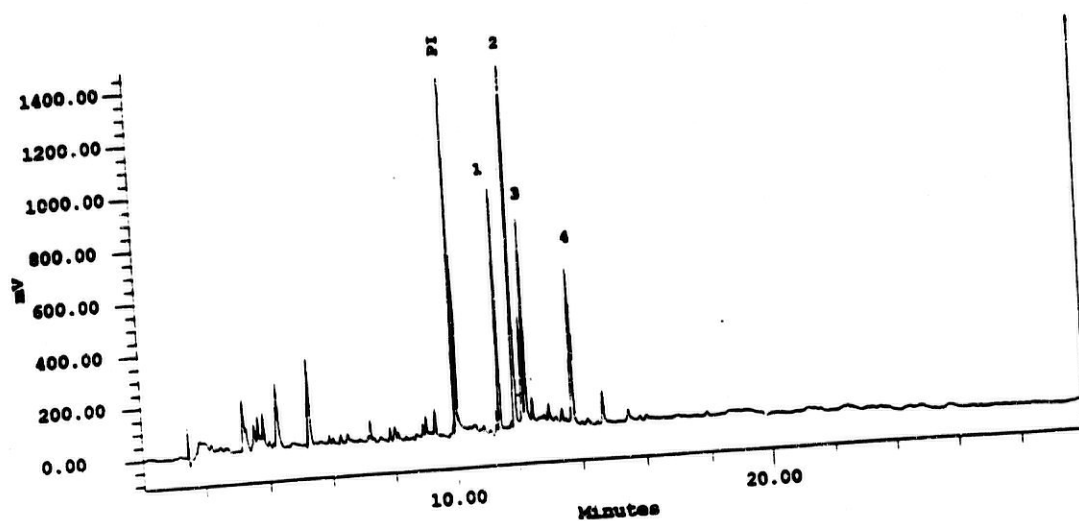


Fig 4.32a: Cromatograma de una muestra de tejido adiposo de un caso, en la cual han sido identificados p,p'-DDE(1), endo II (2), o,p'-DDT (3) y metoxicloro (4)

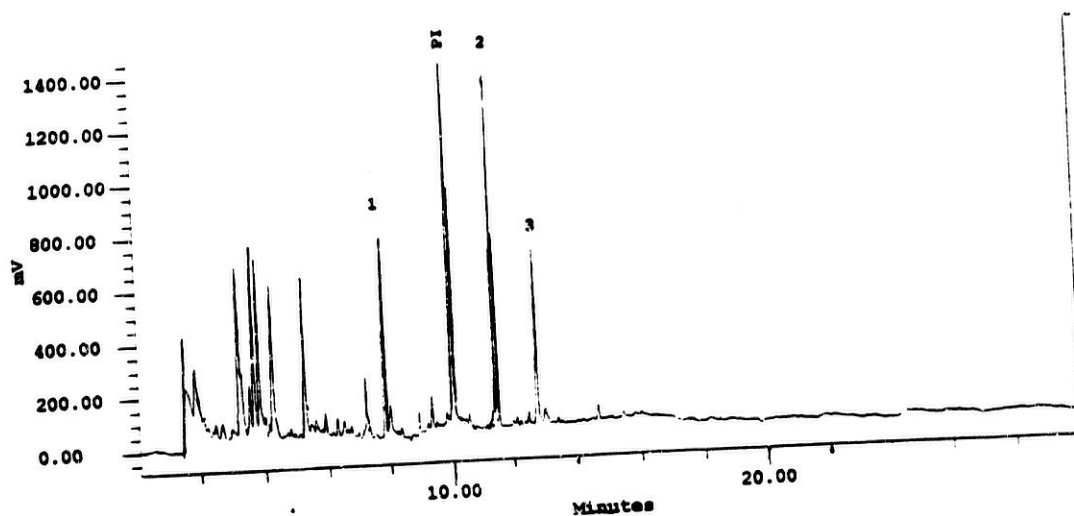


Fig 4.32b: Cromatograma de una muestra de tejido adiposo de un caso, en la cual han sido identificados lindano (1), p,p'-DDE (2) y endo-sulfato (3)

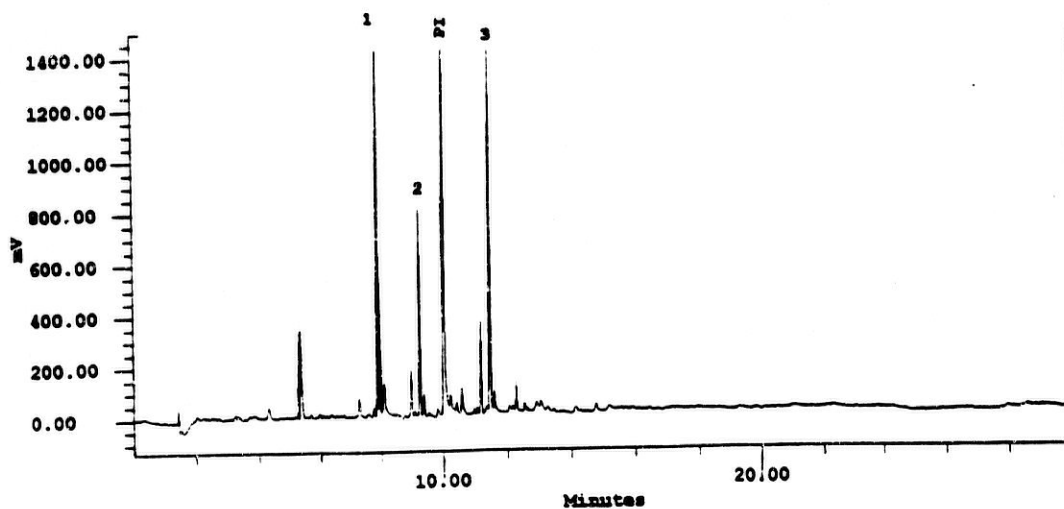


Fig 4.33a: Cromatograma de una muestra de tejido adiposo de un control, en la cual han sido identificados lindano (1), Endo-éter (2), y p,p'-DDE (3)

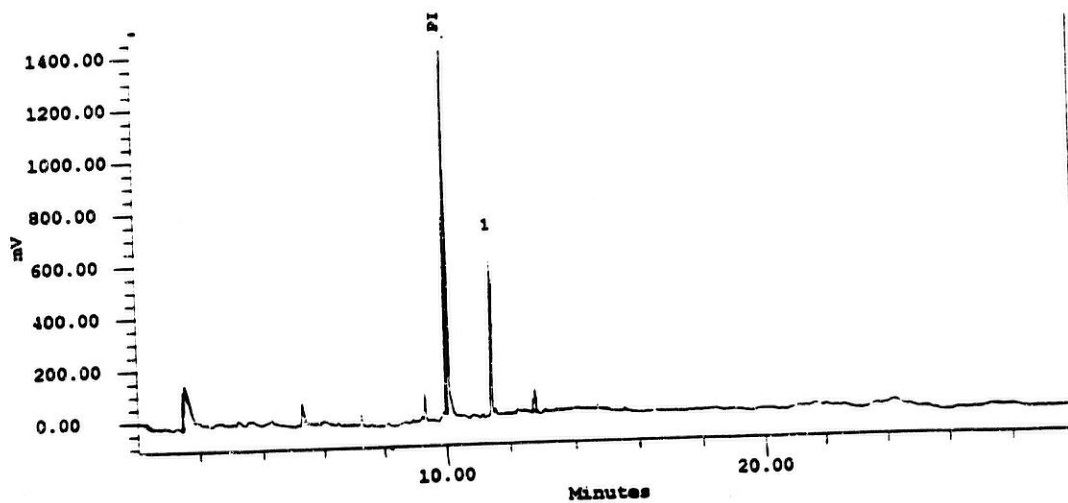


Fig 4.33b: Cromatograma de una muestra de tejido adiposo de un control, en la cual ha sido identificado p,p'-DDE (1)

RESULTADOS

Tabla 4.44: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
037	21,12	-	-	-	-
039	-	-	-	-	-
047	42,18	27,13	-	-	-
054	22,77	-	-	-	-
057	50,51	-	-	-	-
059	46,64	-	3,96	-	-
061	34,22	12,14	6,19	-	-
063	37,59	-	-	-	-
073	99,24	138,50	-	-	-
092	5,12	13,33	12,09	-	-
106	-	24,83	-	-	-
120	-	10,99	-	-	-
149	-	7,51	-	-	-
152	6,69	11,09	4,29	-	-
156	5,45	-	-	-	-
157	4,79	-	8,27	-	-
161	2,72	-	-	-	-
163	12,59	21,89	-	33,07	194,63
170	29,81	-	-	-	-
174	-	34,15	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.45. Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
037	145,5	6399,27	-	178,20	-
039	210,1	1184,09	-	-	-
047	314,8	98,19	-	-	-
054	96,2	-	-	-	-
057	202,0	-	-	-	-
059	665,5	-	4,75	-	-
061	259,4	-	-	-	-
063	849,2	-	-	21,75	-
073	770,8	-	-	-	-
092	421,6	-	-	-	-
106	89,5	92,26	-	-	-
120	47,8	96,37	-	-	-
149	49,1	-	-	-	-
152	43,6	-	7,00	10,17	-
156	824,8	75,23	-	-	-
157	841,2	-	-	-	-
161	65,1	-	-	38,88	-
163	325,3	1267,44	-	-	-
170	613,8	186,94	-	-	-
174	20,7	87,51	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.46: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
037	1,13	-	4,31	-	12,60	-
039	0,51	-	-	-	-	-
047	1,60	-	5,43	-	-	-
054	-	-	1,84	-	-	-
057	-	-	-	-	-	-
059	1,79	-	56,38	-	-	-
061	2,46	-	-	-	-	-
063	1,17	1,78	-	-	-	-
073	12,23	19,10	321,77	-	-	-
092	0,69	-	5,02	-	22,43	-
106	1,88	-	2,65	-	-	-
120	0,48	-	1,90	-	-	-
149	0,20	-	-	-	-	-
152	0,23	-	-	2,12	-	-
156	0,57	-	5,87	-	-	-
157	0,50	-	5,15	-	-	-
161	-	-	-	-	-	-
163	-	-	-	10,09	-	-
170	-	-	-	-	-	-
174	0,39	-	-	0,81	-	-

221 - no detectado

Tabla 4.47: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	Lindano	Aldrín	Dieldrín	Endrín	Mirex
031	-	-	7,27	40,92	-
034	37,66	27,35	-	-	70,24
045	206,09	8,72	-	-	-
053	49,57	13,52	-	-	-
060	-	-	-	-	-
062	-	-	14,38	41,14	-
065	13,50	11,39	15,52	43,45	-
070	22,93	-	-	-	-
071	-	-	-	-	-
074	3,05	9,05	393,87	-	-
083	-	-	25,45	17,91	-
084	27,39	-	-	-	-
085	-	-	-	-	-
087	29,02	12,89	-	-	-
093	8,83	-	-	-	-
095	13,33	-	6,26	-	-
104	-	18,06	-	-	-
105	16,45	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-
119	10,34	-	-	-	-

- : no detectado

Tabla 4.48. Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
031	33,8	145,69	3,51	-	-
044	1002,6	513,06	8,27	-	-
045	399,0	557,28	-	-	13,47
053	938,8	-	-	14,88	-
060	194,4	59,88	1,42	-	-
062	553,3	-	-	-	-
065	26,4	-	-	-	-
070	675,9	407,89	-	-	-
071	31,5	-	-	-	-
074	562,3	-	-	-	53,57
083	798,1	409,26	24,59	62,14	-
084	921,4	-	-	85,65	-
085	69,0	-	-	-	-
087	455,6	142,96	-	-	-
093	308,3	397,16	-	40,83	-
095	256,5	-	-	-	-
104	84,4	98,44	-	-	-
105	147,0	-	-	-	-
111	59,8	-	-	-	-
119	42,8	-	-	-	-

- : no detectado

Tabla 4.49: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
031	1,25	-	2,73	2,62	-	-
044	2,37	-	-	-	23,17	194,88
045	2,62	-	-	-	-	-
053	3,15	-	-	-	-	-
060	0,47	-	-	0,82	-	-
062	20,16	1,02	11,04	1,78	-	-
065	3,19	-	-	1,55	-	-
070	0,70	-	5,35	3,00	-	-
071	1,31	-	-	-	-	6,23
074	2,06	-	-	1,35	-	3,67
083	-	4,90	7,01	5,40	-	34,91
084	-	-	-	-	-	-
085	0,63	-	-	-	-	-
087	1,69	1,21	4,28	-	-	-
093	0,36	-	7,28	1,51	-	-
095	-	-	-	-	-	20,35
104	2,35	2,98	-	-	-	-
105	0,24	-	-	-	-	-
111	0,81	-	5,76	-	-	-
119	0,65	-	-	-	-	-

224 - : no detectado

Tabla 4.50: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
2001	15,82	26,30	-	-	-
2005	-	-	-	172,80	-
2009	-	-	-	-	-
2010	-	9,15	-	-	-
2012	-	-	-	-	-
2013	-	-	-	-	-
2016	-	-	-	-	-
2020	-	-	9,87	-	-
2024	-	11,91	-	-	-
2025	2,19	3,16	-	287,49	6,40
2030	7,81	-	-	-	-
2035	-	-	13,71	-	-
2038	9,50	-	6,92	-	-
2039	110,74	-	27,96	-	-
2042	20,99	-	-	-	-
2043	8,59	10,51	-	-	-
2045	8,11	-	17,25	-	-
2046	-	-	-	55,75	-
2053	-	9,59	16,38	-	-
2055	-	-	11,62	-	-

-: no detectado

Tabla 4.51: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
2058	49,46	183,98	-	-	-
2059	149,61	-	7,84	-	-
2060	12,60	20,00	-	71,68	-
2062	-	-	-	-	-
2063	23,59	-	-	91,28	-
2065	-	-	6,71	-	-
2067	-	-	10,00	-	-
2068	39,14	-	-	-	-
2069	11,88	-	-	-	-
2074	29,44	-	25,99	-	-
2086	-	-	-	-	-
2092	-	28,70	10,79	-	36,28
2093	23,11	-	-	-	-
2094	5,19	16,17	-	-	65,01
2099	-	-	22,25	-	-
2104	-	-	-	-	-
2105	-	18,38	-	-	-
2106	-	-	-	-	-
2107	3,81	-	-	-	-
2109	2,70	21,71	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.52: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
2111	4,48	-	12,68	-	-
2112	6,23	23,67	-	-	-
2120	3,11	-	-	-	-
2121	-	-	8,29	-	-
2124	2,97	19,54	-	-	-
2158	15,45	-	8,77	-	-
2164	61,78	52,02	-	140,94	-
2165	-	-	-	-	-
2175	-	-	-	49,30	-
2185	15,85	-	-	-	-
2186	39,93	-	9,05	-	-
2187	7,55	37,54	12,78	-	-
2199	-	-	6,58	-	-
2212	-	-	18,99	-	-
2221	-	-	-	-	-
2246	-	-	13,05	-	-
2248	9,00	17,02	18,58	-	-
2249	-	12,36	-	-	-
2268	-	-	-	-	-
2269	-	-	14,33	-	-

-: no detectado

Tabla 4.53. Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
2001	114,9	130,89	-	-	-
2005	364,0	372,42	523,56	-	24,42
2009	169,5	-	-	-	-
2010	343,7	-	-	-	36,08
2012	23,5	-	-	-	-
2013	552,6	-	12,75	-	-
2016	69,6	-	-	-	-
2020	305,5	-	-	-	-
2024	509,8	-	-	16,35	-
2025	86,7	29,79	37,18	11,80	-
2030	81,1	59,25	-	-	-
2035	124,6	-	-	-	-
2038	150,5	-	-	-	-
2039	1203,6	-	-	18,57	-
2042	763,6	178,20	-	-	-
2043	233,1	-	-	86,53	-
2045	293,1	-	-	-	-
2046	147,5	-	-	-	-
2053	646,9	-	13,14	-	-
2055	579,9	-	-	26,00	-

-: no detectado

Tabla 4.54: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
2058	942,8	920,74	-	-	-
2059	780,3	-	-	15,12	-
2060	1004	173,62	-	18,29	-
2062	249,5	-	-	-	35,89
2063	719,3	461,06	-	-	-
2065	450,5	-	-	-	-
2067	191,4	-	-	-	-
2068	341,9	194,02	-	-	-
2069	166,9	-	-	-	-
2074	382,0	-	8,80	-	-
2086	150,0	-	-	-	-
2092	719,4	-	4,68	-	-
2093	366,7	80,34	-	19,76	-
2094	43,2	-	5,83	-	-
2099	110,9	-	-	-	-
2104	485,4	-	-	-	-
2105	325,3	-	8,45	56,52	-
2106	495,7	-	-	12,98	-
2107	195,9	-	-	32,50	-
2109	289,6	-	2,65	-	-

-: no detectado

Tabla 4.55: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
2111	221,3	-	-	-	-
2112	192,2	106,89	4,94	-	-
2120	136,2	-	-	-	-
2121	95,0	-	-	-	-
2124	88,4	-	-	8,37	-
2158	528,6	-	-	23,16	-
2164	161,9	172,46	-	43,98	-
2165	177,3	-	-	-	-
2175	372,8	344,47	-	-	-
2185	143,1	-	-	-	-
2186	642,3	-	-	-	-
2187	872,7	-	6,60	27,71	-
2199	287,5	-	-	-	-
2212	572,1	-	-	-	-
2221	600,9	-	4,49	-	-
2246	472,8	-	-	-	-
2248	1539,8	-	-	85,92	-
2249	724,0	144,79	-	-	-
2268	1162,2	-	-	-	-
2269	849,7	-	-	-	-
- no detectado					

Tabla 4.56: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
2001	0,58	-	3,37	-	-	4,98
2005	61,83	6,17	338,17	22,01	-	644,63
2009	-	-	-	-	-	-
2010	0,37	-	-	-	-	-
2012	-	-	-	-	-	-
2013	-	-	-	-	-	-
2016	-	-	-	-	-	-
2020	1,31	-	-	-	-	-
2024	-	-	5,46	-	-	-
2025	0,23	-	0,77	-	-	2,87
2030	-	-	-	-	-	-
2035	0,62	-	5,91	-	-	-
2038	-	-	-	-	-	-
2039	-	-	5,45	-	-	-
2042	-	-	3,20	-	-	-
2043	0,60	-	-	-	-	19,26
2045	0,52	-	2,57	-	19,00	-
2046	-	2,38	4,16	-	-	-
2053	-	-	4,37	0,56	24,73	-
2055	1,16	-	3,44	3,44	-	-

- no detectado

Tabla 4.57: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
2058	-	-	53,80	17,85	-	-
2059	0,59	-	-	-	-	-
2060	0,33	-	-	1,31	-	39,38
2062	-	-	-	-	-	737,88
2063	2,52	-	-	7,24	-	-
2065	0,89	-	-	-	-	-
2067	0,65	-	3,02	-	-	-
2068	-	-	5,20	-	14,85	-
2069	-	-	-	-	-	-
2074	-	-	-	-	-	-
2086	0,68	-	1,94	-	-	-
2092	0,81	1,46	44,49	-	19,44	-
2093	-	-	2,01	-	-	-
2094	0,99	-	2,16	-	-	-
2099	2,05	-	-	5,70	-	-
2104	0,38	-	-	-	-	-
2105	2,13	-	-	-	-	-
2106	-	-	-	-	-	-
2107	0,471	-	-	-	-	-
2109	0,400	-	3,37	-	-	-
- no detectado						

Tabla 4.58: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
2111	0,74	1,46	-	-	-	-
2112	0,73	-	-	1,32	-	-
2120	1,36	-	-	-	-	-
2121	-	-	-	-	-	-
2124	-	-	-	-	-	-
2158	0,71	-	2,22	-	-	-
2164	1,50	7,74	22,95	-	-	8,11
2165	0,53	-	-	-	-	6,08
2175	1,05	-	-	-	-	-
2185	-	1,84	-	-	-	-
2186	3,07	-	-	-	-	-
2187	1,18	-	4,22	1,31	-	-
2199	0,60	-	-	-	-	-
2212	3,02	2,25	-	-	-	-
2221	0,44	-	2,72	-	-	-
2246	0,73	1,34	-	-	-	-
2248	1,30	-	-	-	-	-
2249	0,86	-	-	-	-	-
2268	1,01	-	-	-	-	-
2269	1,14	1,05	-	-	-	5,92
- no detectado						

Tabla 4.59: Pesticidas organoclorados ng/g lípido.

Controles	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
2002	-	51,93	12,40	-	-
2003	-	-	-	-	-
2004	-	-	-	-	-
2017	4,96	-	18,66	-	-
2031	113,31	-	-	-	-
2036	-	-	-	-	-
2037	19,84	-	7,12	1640,40	-
2051	-	-	-	32,56	-
2057	-	-	-	-	-
2064	225,73	-	-	47,82	-
2072	-	12,14	-	-	-
2073	-	24,92	17,44	-	-
2077	2,71	-	-	-	-
2080	-	-	-	-	-
2082	-	-	-	-	-
2089	-	-	-	-	-
2090	3,47	-	-	35,53	-
2091	13,65	29,16	-	-	-
2095	33,80	10,97	4,07	-	-
2097	5,80	13,55	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.60: Pesticidas organoclorados ng/g lipido

Controles	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
2101	-	-	15,44	-	-
2102	3,76	-	6,15	-	-
2116	-	-	84,05	-	-
2130	23,93	-	7,85	-	-
2132	8,08	-	13,70	-	-
2135	-	7,53	7,91	-	-
2136	-	12,88	9,99	-	-
2138	-	27,17	13,42	-	-
2142	-	20,34	7,74	24,29	-
2149	-	-	-	-	-
2153	32,85	-	-	-	-
2156	-	64,58	-	-	38,51
2163	2,43	11,30	-	-	-
2166	-	-	75,52	-	-
2177	8,42	-	-	-	-
2181	5,39	17,12	-	63,06	-
2182	25,79	-	-	-	-
2189	5,24	18,06	6,39	-	-
2191	108,37	-	-	-	-
2193	24,33	-	-	-	-

- : no detectado

Tabla 4.61: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
2197	124,27	22,86	11,36	-	-
2198	-	-	-	-	36,61
2202	9,16	8,60	-	-	-
2203	14,87	-	-	-	-
2205	-	-	-	-	-
2207	22,51	-	15,57	-	-
2213	16,11	-	-	-	-
2215	27,01	24,20	-	102,22	-
2217	8,45	22,42	-	57,02	-
2219	7,44	18,79	-	49,64	-
2227	-	-	10,20	-	-
2229	9,51	12,90	13,13	-	-
2232	1,98	23,95	-	-	-
2233	11,48	-	-	-	-
2255	20,37	-	-	53,10	-
2256	164,50	123,18	12,96	52,55	119,33
2257	43,22	-	-	-	-
2259	30,99	-	-	-	-
2274	44,85	-	-	-	-
2278	18,62	-	28,46	-	-

-: no detectado

Tabla 4.62: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
2002	380,8	-	-	-	-
2003	310,1	542,64	-	-	-
2004	823,4	-	-	-	-
2017	647,8	-	-	45,79	-
2031	522,3	85,80	-	17,81	-
2036	250,1	53,73	-	-	-
2037	237,5	-	1667,90	19,66	-
2051	270,3	100,08	8,06	12,37	-
2057	250,2	86,63	-	-	-
2064	484,6	281,32	-	-	-
2072	21,8	217,50	-	-	-
2073	863,7	264,55	-	-	-
2077	319,8	97,01	-	-	-
2080	216,5	-	-	-	-
2082	701,0	720,56	36,48	-	-
2089	87,6	67,79	-	-	-
2090	778,7	-	-	54,04	-
2091	77,7	86,79	-	-	-
2096	1012,6	-	-	18,22	-
2097	72,6	-	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.63. Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
2101	406,3	-	-	61,23	13,50
2102	353,7	-	-	16,37	-
2116	485,8	-	162,92	-	-
2130	359,7	-	6,45	63,01	13,59
2132	130,8	-	-	-	-
2135	172,3	-	-	-	-
2136	205,3	-	-	-	-
2138	95,4	-	-	-	-
2142	116,3	-	-	-	-
2149	181,4	-	-	-	-
2153	149,5	-	-	-	-
2156	122,2	-	-	-	-
2163	126,9	-	-	33,06	-
2166	367,5	-	-	-	-
2177	147,4	65,63	16,46	-	-
2181	69,6	323,88	3,67	-	-
2182	759,0	-	-	36,06	-
2189	216,9	-	-	-	-
2191	628,0	320,90	-	51,78	-
2193	257,6	283,35	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.64: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
2197	977,6	-	-	69,78	-
2198	619,3	-	-	58,23	6,85
2202	67,7	-	-	-	-
2203	270,4	76,50	-	64,23	-
2205	530,2	114,97	-	-	-
2207	407,3	-	-	-	-
2213	405,0	-	-	-	-
2215	660,3	868,00	-	-	-
2217	280,1	211,87	-	-	-
2219	305,0	-	-	-	-
2227	73,2	-	-	-	-
2229	181,9	-	-	-	-
2232	10,5	71,62	-	39,29	-
2233	798,9	-	-	-	-
2255	307,0	225,80	-	-	-
2256	1005,4	203,69	-	92,83	-
2257	407,1	-	-	-	-
2259	268,1	-	-	-	-
2274	386,9	-	-	-	-
2278	1772,9	-	-	169,64	-

-: no detectado

Tabla 4.65: Pesticidas organoclorados ng/g lipido

Controles	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
2002	1,51	1,46	3,12	-	-	15,34
2003	-	-	-	-	-	-
2004	0,69	-	-	-	-	-
2017	0,92	-	10,22	1,25	-	6,40
2031	-	-	1,83	-	-	-
2036	0,52	-	-	-	-	4,43
2037	0,60	9,20	5,45	-	-	3,21
2051	-	1,66	-	-	20,75	-
2057	-	-	-	-	-	-
2064	0,74	-	-	-	-	8,62
2072	0,73	-	-	1,84	-	-
2073	1,61	-	5,35	3,24	-	-
2077	-	-	-	-	-	-
2080	0,42	-	-	-	-	22,34
2082	1,01	-	1,07	-	11,12	-
2089	1,10	3,45	-	0,95	-	11,48
2090	0,77	-	3,78	-	20,23	50,96
2091	0,47	1,63	-	1,74	-	-
2096	0,54	-	2,65	-	-	-
2097	-	3,82	-	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.66: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
2101	1,07	-	3,37	1,45	17,84	-
2102	0,31	-	-	3,05	314,15	-
2116	-	1,07	0,98	-	1382,47	-
2130	0,48	-	-	-	-	-
2132	0,48	-	-	-	-	-
2135	1,79	-	4,58	1,47	-	-
2136	1,32	1,18	3,04	-	35,87	-
2138	0,53	2,63	5,02	1,15	-	-
2142	0,32	0,93	3,99	-	-	-
2149	-	-	-	-	-	-
2153	-	-	-	-	-	29,15
2156	-	-	-	-	-	-
2163	0,35	-	-	-	-	-
2166	-	-	-	-	-	-
2177	-	-	-	-	-	-
2181	0,79	-	8,55	-	-	21,87
2182	0,66	-	-	-	-	-
2189	0,45	4,23	3,39	1,49	16,02	-
2191	-	1,64	12,20	-	20,32	-
2193	0,70	-	-	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.67: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
2197	-	2,80	8,10	-	-	-
2198	0,38	-	2,12	0,97	85,17	-
2202	3,35	-	-	-	-	-
2203	-	-	-	1,70	-	19,59
2205	1,27	3,22	1,93	-	-	7,29
2207	-	-	-	-	-	-
2213	-	-	-	-	-	-
2215	1,05	1,34	2,48	-	-	-
2217	1,81	-	4,44	-	-	-
2219	0,41	-	-	-	-	9,13
2227	0,35	-	-	-	-	-
2229	0,24	3,43	-	1,14	-	-
2232	0,21	-	-	1,29	-	-
2233	1,30	-	4,80	-	-	-
2255	0,77	-	-	3,54	-	-
2256	1,64	1,87	3,75	2,08	45,33	-
2257	0,75	0,88	-	-	-	-
2259	2,21	-	14,00	4,20	-	-
2274	-	-	4,00	-	-	-
2278	0,86	-	-	2,43	119,69	-

-: no detectado

Tabla 4.68: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Cases	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
4008	11,12	29,55	-	95,72	-
4011	-	-	10,22	-	-
4013	8,970	69,98	25,96	-	-
4014	30,48	17,44	7,724	49,38	44,69
4017	19,31	-	-	-	-
4057	-	-	45,98	-	-
4063	-	-	-	-	-
4064	-	-	3,350	-	-
4071	-	-	14,81	-	-
4097	-	-	24,23	31,29	-
4109	16,40	12,27	-	45,48	-
4112	13,38	-	14,20	-	-
4121	30,26	-	-	-	-
4129	35,41	-	-	-	-
4130	-	-	-	-	-
4131	-	-	-	-	-
4136	-	-	-	79,99	-
4142	-	-	21,14	-	-
4152	20,61	-	-	-	-
4153	-	-	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.69: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Casos	p,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	Metoxicloro
4008	309,1	201,3	-	-	14,39
4011	562,7	-	5,89	-	-
4013	712,6	170,2	-	21,37	-
4014	633,5	-	26,66	-	-
4017	347,3	-	-	-	-
4057	948,1	-	-	75,08	-
4063	170,1	117,5	7,73	-	-
4064	250,3	-	-	-	-
4071	924,0	-	-	85,61	-
4097	786,4	-	9,53	16,32	-
4109	174,7	68,30	-	18,79	11,50
4112	724,8	177,6	18,28	-	-
4121	339,2	284,7	-	-	-
4129	402,2	161,1	-	-	-
4130	558,0	267,7	-	-	-
4131	259,3	482,6	-	33,32	-
4136	377,2	941,1	73,26	-	-
4142	906,9	-	-	26,61	-
4152	189,5	57,23	13,76	-	-
4153	589,2	175,1	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.70: Pesticidas organoclorados ng/g lipido

Casos	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diol	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
4008	0,695	-	6,53	-	-	-
4011	0,760	1,15	7,14	-	-	-
4013	1,365	1,99	7,11	-	23,21	-
4014	0,675	-	5,18	-	-	-
4017	0,781	-	-	-	-	-
4057	0,60	-	-	-	279,77	-
4063	1,63	-	-	-	9,80	-
4064	0,51	-	-	-	-	-
4071	-	-	-	3,01	-	-
4097	1,65	2,21	3,19	2,02	-	-
4109	4,59	4,97	-	-	219,71	-
4112	1,10	2,78	-	2,08	55,70	-
4121	-	-	-	5,32	-	-
4129	1,02	-	-	-	-	-
4130	0,19	4,21	-	-	-	-
4131	-	-	-	-	-	13,69
4136	-	2,84	-	18,45	-	882,95
4142	2,60	-	-	-	-	-
4152	-	-	-	-	-	-
4153	-	-	-	-	25,59	-

-: no detectado

Tabla 4.71: Pesticidas organoclorados ng/g lipido

Contr	Lindano	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Mirex
4054	-	0,65	15,45	-	-
4056	35,73	-	-	-	-
4059	10,39	15,84	-	-	-
4060	-	-	-	51,60	-
4065	-	-	-	-	-
4068	-	-	-	17,34	-
4076	5,39	73,19	20,45	148,13	61,24
4087	12,48	22,56	17,45	-	-
4090	15,71	15,07	-	-	-
4094	5,30	-	3,88	-	-
4102	-	-	-	-	-
4106	-	-	11,39	-	-
4108	-	11,13	-	-	-
4114	-	-	-	-	-
4125	27,49	-	-	-	-
4137	28,15	-	7,08	-	-
4138	-	-	-	-	-
4140	31,36	-	-	36,82	-
4141	47,01	-	-	-	-
4161	19,09	16,23	6,46	-	-

-: no detectado

Tabla 4.72: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	p.p'-DDE	o.p'-DDD	o.p'-DDT	p.p'-DDT	Metoxicloro
4054	614,10	-	-	-	-
4056	557,75	132,57	-	29,90	11,86
4059	245,86	137,18	-	56,31	-
4060	53,06	-	-	25,60	-
4065	695,17	-	-	34,74	-
4068	668,39	-	5,66	-	-
4076	851,04	226,94	-	65,73	-
4087	698,32	-	6,07	46,11	-
4090	450,98	230,74	-	-	-
4094	46,42	-	1,15	-	-
4102	456,38	-	-	-	-
4106	274,22	-	-	-	-
4108	283,12	-	-	-	-
4114	275,07	-	-	-	-
4125	566,85	140,81	-	23,97	-
4137	753,62	330,71	-	-	-
4138	588,98	224,38	-	26,29	-
4140	1058,96	1835,75	1154,26	8,46	-
4141	384,00	-	-	184,06	-
4161	517,86	-	-	-	-

-: no detectado

Tabla 4.73: Pesticidas organoclorados ng/g lípido

Controles	Endo-éter	Endo-lactona	Endo-diopl	Endo I	Endo II	Endo-sulfato
4054	0,88	-	1,87	2,71	10,74	-
4056	2,81	-	3,38	3,37	-	-
4059	-	-	-	3,29	-	3,69
4060	0,89	-	-	-	-	6,77
4065	-	-	-	-	-	-
4068	0,54	-	-	0,69	9,20	-
4076	1,32	-	8,30	5,53	62,04	22,16
4087	0,77	3,97	-	-	-	-
4090	2,61	-	-	-	-	-
4094	-	0,50	0,51	-	-	-
4102	-	-	-	-	-	-
4106	-	-	8,75	-	7,90	-
4108	2,53	-	-	-	-	-
4114	-	-	-	-	-	-
4125	-	-	2,47	-	-	-
4137	3,83	-	-	14,26	37,75	-
4138	-	-	-	-	-	-
4140	1,56	2,05	3,14	-	19,62	-
4141	2,62	-	-	-	-	-
4161	2,97	-	-	-	-	-

-: no detectado

4.3.1 Tratamiento estadístico

Una vez obtenidos los resultados, se aplicó el análisis estadístico pertinente. De entrada y basándonos en la discontinuidad de las series obtenidas, se concluyó que la distribución de los resultados no es normal.

Se analizaron a continuación los parámetros propios de un Estudio Comparativo de Población (E.C.P.) tratando de apreciar la existencia de diferencias entre los resultados obtenidos en casos y controles tras el análisis de las muestras. Los parámetros analizados fueron: media, mediana, desviación estándar y máximo, centrándose en aquellos que relacionan frecuencia de sucesos así como porcentaje de concentración de medias de los pesticidas analizados aplicando el t-test.

Las tablas 4.74 a 4.79 recogen los parámetros citados.

Las figuras 4.34 y 4.35 muestran la distribución porcentual de pesticidas organoclorados en casos y controles.

Las figuras 4.36 a 4.38 muestran la concentración media de los grupos de pesticidas estudiados en casos y controles

Tabla 4.74: Casos

Producto	Máximo	Mediana	Desv.Estándar ($\pm\sigma$)	Media
Lindano	149,6	2,8	23,5	13,6
Aidrin	183,9	2,5	24,5	11,2
Dieldrin	45,9	2,5	7,5	6,7
Endrin	287,4	7,5	38,1	18,5
Mirex	194,6	12,5	19,2	15,3
p,p'-DDE	1539,8	340,6	311,8	420,5
o,p'-DDD	1267,4	12,5	230,2	110,1
o,p'-DDT	523,5	1,2	52,7	8,9
p,p'-DDT	1874,9	12,5	186,8	38,0
Metoxicloro	36,0	2,5	5,3	3,5
Endosulfán-éter	61,8	0,5	6,2	1,5
Endosulfán-lactona	19,1	5,0	1,8	4,8
Endosulfán-diol	338,1	1,2	46,7	10,4
Endosulfán I	22,0	1,2	3,3	2,0
Endosulfán II	279,7	5,0	35,0	11,6
Endosulfán-sulfato	882,9	1,2	114,2	18,2

Tabla 4.75: Controles

Producto	Máximo	Mediana	Desv.Estándar ($\pm\sigma$)	Media
Lindano	225,7	5,3	38,6	19,7
Aldrín	123,1	2,5	16,7	9,9
Dieldrín	393,8	2,5	40,4	11,0
Endrín	1640,4	7,5	163,8	31,9
Mirex	119,3	12,5	13,3	15,1
p,p'-DDE	1772,9	336,7	313,4	410,4
o,p'-DDD	1835,7	12,5	238,2	121,1
o,p'-DDT	1667,9	1,25	202,0	32,1
p,p'-DDT	184,0	12,5	28,5	24,7
Metoxicloro	53,5	2,5	5,4	3,4
Endosulfán-éter	20,1	0,62	2,1	1,1
Endosulfán-lactona	9,2	5,0	1,4	4,3
Endosulfán-diol	14,0	1,25	2,6	2,7
Endosulfán I	14,2	1,25	1,5	1,6
Endosulfán II	1382,4	5,0	141,2	26,6
Endosulfán-sulfato	194,8	1,2	20,6	5,9

Tabla 4.76

Concentración (ng/g lípido)	Casos n=100	Controles n= 100	O.R	I.C 95%
Lindano				
>LD	53	60	0,75	0,35-1,59
<LD	47	40	1	
Aldrin				
>LD	32	36	0,84	0,44-1,56
<LD	68	64	1	
Dieldrin				
>LD	37	35	1,1	0,47-2,35
<LD	63	65	1	
Endrin				
>LD	13	20	0,6	0,31-1,12
<LD	87	80	1	
Mirex				
>LD	5	5	-	-
<LD	95	95		

RESULTADOS

Tabla 4.77

Concentración (ng/g lípido)	Casos n=100	Controles n= 100	O.R	LC 95%
p,p'-DDE				
>800	13	11	0,99	0,39-1,71
> 400 ≤800	28	31	0,88	0,26-2,97
≤ 400	59	58	1	
o,p'-DDD				
>LD	35	40	0,8	0,37-1,74
<LD	65	60	1	
o,p'-DDT				
>LD	21	15	1,5	0,61-3,48
<LD	79	85	1	
p,p'-DDT				
>LD	28	32	0,82	0,41-1,59
<LD	72	68	1	
Metoxicloro				
>LD	5	6	0,81	0,42-1,61
<LD	95	94	1	

Tabla 4.78

Concentración (ng/g lípido)	Casos n=100	Controles n= 100	O.R	I.C 95%
Endosulfán-éter				
>LD	68	71	0,86	0,26-2,98
<LD	32	29	1	
Endosulfán-lactona				
>LD	18	25	0,65	0,19-1,81
<LD	82	75	1	
Endosulfán-diol				
>LD	38	40	0,92	0,51-2,11
<LD	62	60	1	
Endosulfán I				
>LD	17	32	0,43	0,12
<LD	83	68	1	1,52
EndosulfánII				
>LD	12	19	0,6	0,32-1,12
<LD	88	81	1	
Endosulfán-sulfato				
>LD	11	21	0,46	0,19-1,1
<LD	89	79	1	

Tabla 4.79: Porcentaje de diferencias de la concentración media

Producto	Caso	Control
Lindano	---	31%
Aldrin	11,4%	---
Dieldrin	---	41%
Endrin	---	40%
Mirex	1,37%	---
p-p'-DDE	2,29%	---
o-p'-DDD	---	30,7%
o-p'-DDT	---	75%
p-p'-DDT	33%	---
Metoxicloro	3,35%	---
Endosulfán-éter	26,2%	---
Endosulfán-lactona	8,75%	---
Endosulfán-diol	73%	---
Endosulfán I	35%	---
Endosulfán II	---	65%
Endosulfán-sulfato	73%	---

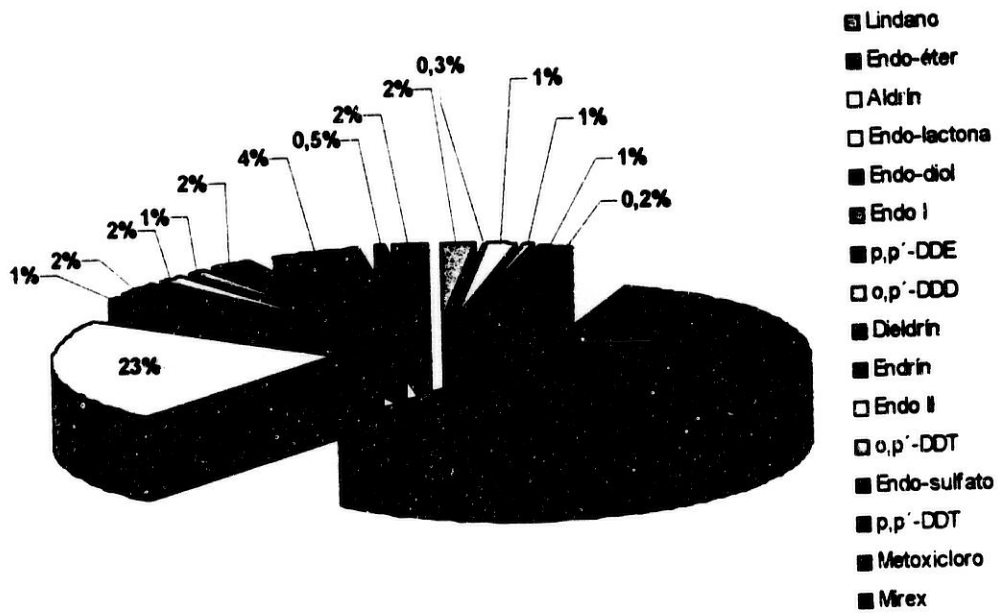


Fig 4.34: Porcentaje de concentración media de pesticidas organoclorados en casos

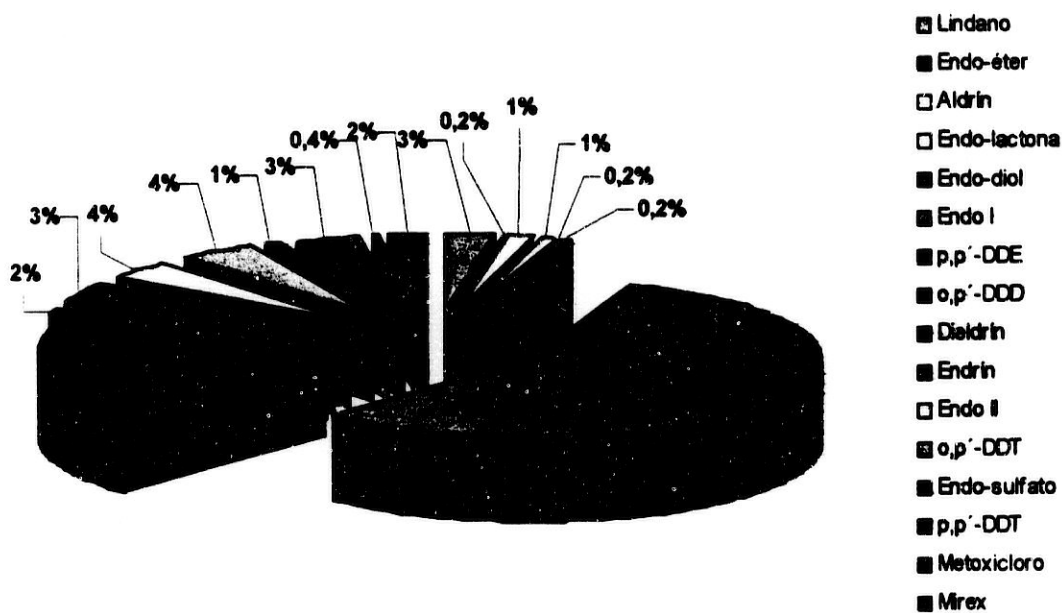


Fig 4.35: Porcentaje de concentración media de pesticidas organoclorados en controles

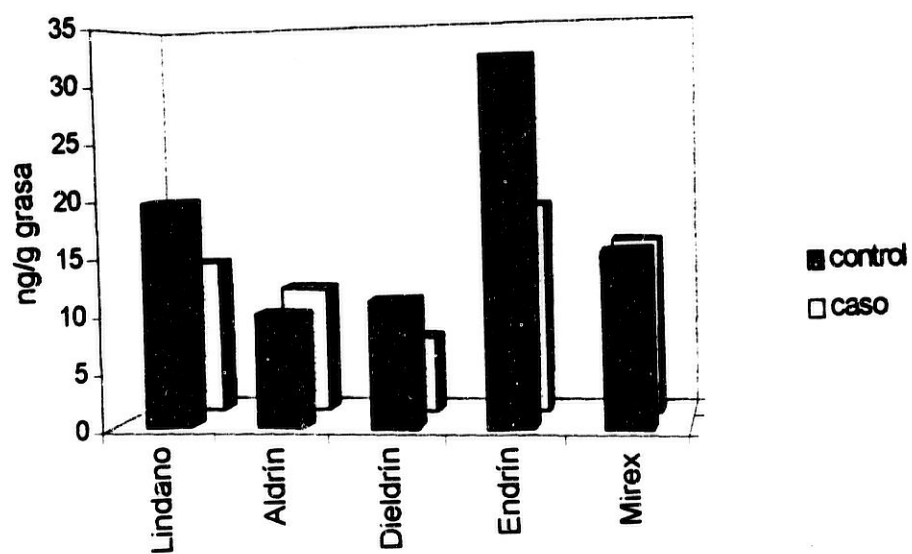


Fig 4.36: Concentraciones medias de pesticidas organoclorados en casos y controles

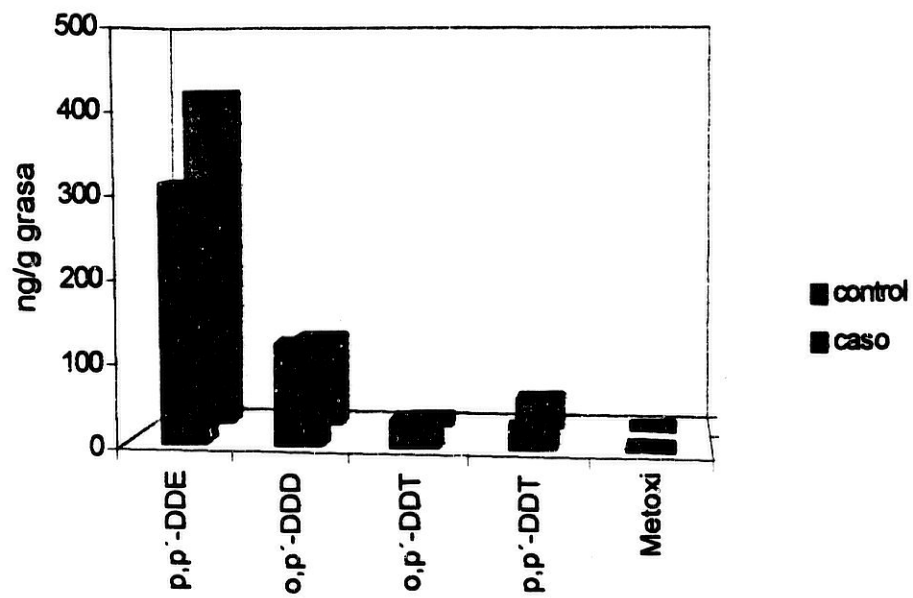


Fig 4.37: Concentraciones medias de pesticidas organoclorados en casos y controles

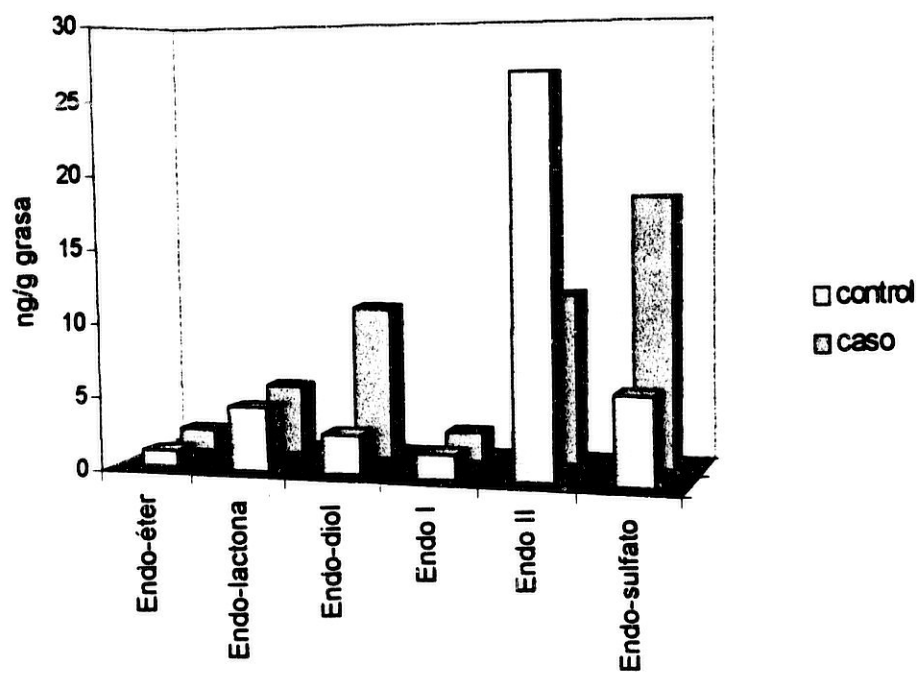


Fig 4.38: Concentraciones medias de pesticidas organoclorados en casos y controles

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Las relaciones de causalidad existentes entre hormonas y cáncer son bien conocidas y no necesitan ser probadas con nuevos análisis conceptuales. De hecho los estudios clínicos han reconocido un papel primordial para las hormonas en la patología tumoral mamaria, bien como factores predisponentes en la génesis del proceso tumoral, bien como agentes inductores del desarrollo de la enfermedad una vez establecida ésta.

En el caso concreto de la estimación del riesgo los estudios epidemiológicos han sido determinantes. Así por ejemplo, el análisis de la historia reproductiva, el conocimiento del hábito menstrual o la medida de las hormonas circulantes constituyen elementos clave para el establecimiento de una relación de sospecha entre ciertos hábitos hormonales, la historia expositiva y la mayor frecuencia de padecimiento de cáncer de mama (Fernández y cols., 1998).

En lo que respecta al comportamiento del tumor, una vez establecido éste, la asociación tumor--estatus hormonal es aún más evidente. Por ejemplo, la presencia de receptores hormonales en el tejido mamario tumoral, indicativa de una mayor probabilidad de respuesta a los tratamientos hormonales y antihormonales, demuestra de manera indirecta la dependencia hormonal del cáncer mamario.

Objetivo fundamental de este trabajo ha sido la profundización en el conocimiento de los mecanismos que conducen a la génesis de los tumores mamarios. Por esta razón se ha desarrollado, validado y aplicado una técnica mixta, química-biológica, que permite analizar la actividad hormonal estrogénica correspondiente a muestras de tejido graso en pacientes afectas de cáncer de mama. La expresión cuantitativa de esa actividad hormonal se ha identificado a lo largo del presente trabajo, bajo el término de "carga estrogénica" y la hemos expresado en unidades equivalentes estradiol por contenido lipídico. Se han comparado, además, los resultados obtenidos con los resultantes de la aplicación de una metodología idéntica

a muestras procedentes de mujeres libres de tumor con objeto de analizar las similitudes y diferencias entre ambas poblaciones y establecer así el valor de la exposición interna a sustancias químicas hormonalmente activas.

Evidentemente el trabajo planteado sigue aún abierto, probablemente, no concluirá hasta el establecimiento, para la carga estrogénica corporal, de un papel definido en la carcinogénesis mamaria.

Nos ha parecido importante, por otra parte, dedicar un cierto esfuerzo a la estandarización de la metodología, toda vez que los antecedentes de la aplicación de técnicas como la que aquí se presentan son escasos. La razón fundamental para ello es que la producción científica de nuestro propio grupo de trabajo, y de algunos otros grupos con los que mantenemos estrecha relación, constituye la base bibliográfica y conceptual sobre la que han construido las premisas de partida (Sonnenschein y cols., 1995; Soto y cols., 1997; Pazos y cols., 1998; Rivas y cols., 1997).

Con las naturales limitaciones, el presente trabajo intenta definir, por tanto, un método que permita estimar la importancia de la actividad hormonal estrogénica atribuida a compuestos exógenos al organismo, acumulados en el tejido adiposo, en la génesis del cáncer de mama.

Estrógenos y cáncer de mama: Estrógenos ováricos y Xenoestrógenos

Es indudable que la etiología de cáncer de mama tiene un fuerte componente hormonal. La enfermedad tumoral, por ejemplo, no ocurre nunca en mujeres que no han alcanzado la pubertad y se mantiene en nivel cero si el desarrollo secundario no ocurre a lo largo de la vida (Boyle, 1988). Por otra parte, una vida reproductiva prolongada incrementa sustancialmente el riesgo de padecimiento de la enfermedad. (Mac Mahon y cols., 1973). Así, por ejemplo, la menopausia prematura parece ser

protectora y la ovariectomía realizada temprana, (Trichopoulos y cols., 1972) en torno a los 35 años, reduce en un tercio el riesgo de padecimiento de cáncer de mama. Aunque el papel de los estrógenos ováricos en el desarrollo tumoral parece claro, no deben de dejar de tomarse en consideración algunos otros factores, sobre todo si se considera que a los 35 años una mujer se ha expuesto, al menos, a la mitad de los estrógenos endógenos presentes en su organismo durante toda la vida.

Es interesante también, destacar el hecho de que el embarazo parece ejercer un papel protector del riesgo de cáncer y ello a pesar del elevado nivel de exposición hormonal existente durante el mismo. La interrupción de los ciclos menstruales es, según White (1987) clave en la protección.

Uno de los aspectos más interesantes a considerar en este trabajo es la aparición de cáncer de mama en la postmenopausia. En diversas series, se han identificado, en efecto, ciertos factores de riesgo de especial relevancia que afectan a los periodos más avanzados de su etapa menstrual. Por ejemplo, el hábito corporal de la menopausia es un factor de riesgo de cáncer mamario cuando este periodo está dominado por el exceso de peso (De Waard y cols., 1977). La explicación patogénica sugerida para esta observación es la capacidad del tejido adiposo para convertir proestrógenos, principalmente andrógenos, en hormona estrogénicamente activa (Vermeulen y Verdonck, 1978). Apoyándose en tal hipótesis se ha sugerido que las diferencias geográficas en el riesgo de cáncer de mama, que están muy marcadas en el cáncer postmenopáusico, podrían explicarse por diferencias en sobrepeso concomitantes a la distribución regional (Pike y cols., 1993).

Aproximadamente el 75% de las pacientes incluidas en este estudio son postmenopáusicas, siendo la edad media de la presentación de la enfermedad tumoral de $55,5 \pm 10,1$ años. Como la hipótesis de trabajo gira en torno a la exposición interna, parece claro que la variable edad tenga especial significación.

Si la exposición a las hormonas endógenas aumenta el riesgo de cáncer de

mama, las mujeres sometidas a diversas terapias hormonales deberían mostrar un mayor riesgo de padecimiento de la enfermedad. Esta asociación no ha sido fácil de probar. Aunque existe, en principio, la evidencia de que pacientes tratadas con DES, aparte de presentar en su descendencia un acusado incremento en el riesgo de padecimiento de cáncer de vagina (Greenberg y cols., 1984; Colton y cols., 1993), el riesgo de desarrollo de cáncer de mama es un 35% más elevado que el de pacientes comparables no tratadas con esta sustancia, y otro tanto ocurre para la estimación del riesgo ligado al consumo de anticonceptivos hormonales o en la terapia hormonal de reemplazamiento en la postmenopausia. En ambos casos, tan sólo se ha demostrado un efecto promotor, de carácter débil, en pacientes tratadas durante largos periodos de tiempo o, en el caso de los anticonceptivos, en fases tempranas previas al primer embarazo (Steinberg y cols., 1991; La Vecchia, 1992).

Probablemente, gran parte de las incógnitas planteadas se resolverían realizando estudios apropiados en los que se midieran de forma pormenorizada los niveles hormonales de los individuos en riesgo y se comparasen grandes series de casos y controles apareados. En la ejecución de esta tarea existen una serie de dificultades, que limitan el valor de los estudios, entre las que sobresalen (Miller y Sharpe, 1998):

1. Las modificaciones de los niveles hormonales involucrados en el desarrollo del tumor mamario pueden ser temporales y limitadas a periodos críticos.
2. Variaciones hormonales leves, de difícil identificación, pueden ser de gran importancia cuando se mantienen durante largos periodos de tiempo.
3. La ciclicidad o periodicidad de la exposición puede ser un factor crucial y no demostrable con facilidad.
4. La sensibilidad específica de cada órgano puede ser tan importante como

la exposición hormonal en sí misma.

5. La promoción hormonal en cáncer podría estar más ligada a la combinación adecuada de ciertas fracciones o asociaciones de hormonas que a los niveles circulantes específicos de algunas de ellas.

6. El efecto de las hormonas circulantes de producción interna puede verse matizado por la existencia de compuestos hormonales exógenos a los que quedan expuestos los individuos de forma inadvertida.

En contraste con la situación de incertidumbre en la relación existente entre exposición a hormonas estrogénicas y riesgo de padecimiento ulterior de cáncer de mama, el papel de las hormonas en la progresión de los tumores mamarios es mucho más evidente. La experiencia clínica, junto con la experimentación sobre tumores inducidos en animales de experimentación han demostrado la realidad de dicha asociación. Es importante tener en cuenta, por tanto, que los niveles hormonales de estrógenos pueden condicionar el crecimiento de tumores mamarios subclínicos y condicionar el tiempo de aparición de los mismos y su diagnóstico clínico.

En el contexto del presente trabajo, un disruptor endocrino, y de forma particular un xenoestrógeno, describe a cualquier compuesto químico al que los individuos están potencialmente expuestos y que una vez incorporado al organismo ejerce una actividad estrogénica intrínseca o modifica los niveles de hormonas naturales circulantes. (Olea y cols., 1998; Olea y cols., 1999).

Si difícil es probar que las hormonas naturales están asociadas con el desarrollo del cáncer de mama, una tarea mucho más ardua es demostrar que los xenoestrógenos puedan estar en la base de este proceso. Algunas de las dificultades subyacentes al establecimiento de dicha asociación han sido magníficamente enunciadas por Miller and Sharpe (1998) y pueden ser resumidas en los siguientes puntos:

1. La baja potencia hormonal de los compuestos químicos identificados como xenoestrógenos.
2. Su naturaleza y estructura química tan variada que dificultan su identificación y el asignar a cada uno de ellos un papel de forma aislada.
3. La posibilidad de que los efectos combinados puedan ser críticos para el desarrollo del efecto hormonal y la no disponibilidad de métodos adecuados para evaluar tales efectos.
4. La incertidumbre que rodea al efecto de tales compuestos químicos, que varía dependiendo del órgano blanco y de las circunstancias de la exposición.

No obstante estas dificultades, lo cierto es que la evidencia de la asociación entre exposición a xenoestrógenos y cáncer de mama es cuanto menos inquietante y se apoya tanto en estudios epidemiológicos como en los resultados de la investigación experimental (Ahlborg y cols., 1995; Toppari y cols., 1996; Miller y Sharpe, 1998; Fernández y cols., 1998).

Nuestro trabajo ha servido para poner de manifiesto, en primer lugar, la actividad hormonal estrogénica de una serie de pesticidas organoclorados que entran dentro de la clasificación de xenoestrógenos (Tabla 1.1). Se trata de los pesticidas lindano, aldrín, dieldrín, endrín, p,p'-DDE, o,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, metoxicloro y endosulfán que han demostrado ser agonistas totales (o,p'-DDT) o parciales (el resto de los compuestos), con una eficacia proliferativa (EPR) muy variable. Así por ejemplo, lindano presenta un valor de EPR relativamente bajo (29%) a pesar de haber sido ensayado a altas concentraciones, mientras que la eficacia proliferativa del endosulfán supera el 65%. La potencia proliferativa nos ha servido también para ordenarlos en función de la concentración mínima a la que desencadenan el efecto estrogénico. Siguiendo esta metodología, los pesticidas organoclorados más potentes han resultado ser o,p'-DDD, p,p'-DDT, metoxicloro y endosulfán. Tan sólo

mirex resultó inactivo en el ensayo de estrogenicidad.

Cuando se considera la estrogenicidad de los pesticidas organoclorados, debe recordarse el hecho de que el descubrimiento de la actividad hormonal de los mismos está en la base de la hipótesis de los disruptores endocrinos. En efecto, como hemos comentado anteriormente, la hipótesis de los xenobióticos con actividad hormonal empezó a dibujarse tras el análisis de los datos producidos por las observaciones medio ambientales en las que se mostraba la evidencia de una asociación entre exposición a pesticidas y efectos negativos sobre la salud de poblaciones animales (Hickey y Anderson, 1968; Heath y cols., 1969; Woodward y cols., 1993; Guillette y cols., 1995; Colborn y cols., 1996, Short y Colborn, 1999).

Además del efecto estrogénico puesto de manifiesto en este trabajo, que confirma observaciones previas (Soto y cols., 1995), es necesario tener en cuenta que ha sido igualmente descrito un efecto androgénico para algunos de los pesticidas considerados aquí. Este es el caso de p,p'-DDE (Kelce y cols., 1995).

Metodología cromatográfica para la preparación y limpieza de muestras de tejido adiposo y estimación de la carga estrogénica

La metodología analítica desarrollada en el presente trabajo necesaria para separar los xenobióticos lipofílicos con actividad estrogénica de los estrógenos naturales contenidos en muestras tejido adiposo humano es original. Su objetivo fundamental consiste en la preparación de muestras biológicas adecuadas para el estudio del efecto de los estrógenos naturales y la actividad estrogénica de los xenobióticos sobre la proliferación celular y la expresión de genes ligados con la acción hormonal. Se trata en síntesis, de obtener muestras "limpias" de estrógenos naturales o endógenos que al ser evaluadas mediante un test específico permitan

identificar la respuesta hormonal atribuible a los xenoestrógenos, sin interferencia alguna de las hormonas ováricas.

En el diseño experimental del estudio epidemiológico realizado se decidió utilizar el tejido adiposo de las pacientes como fuente de información para estimar la dosis interna de xenoestrógenos y, tras la pertinente consulta bibliográfica, se seleccionaron los métodos de extracción de xenobióticos que nos parecieron mejores. Así, tras el ensayo de alguno de ellos terminamos aceptando el propuesto por Okond'Ahoka y cols. (1984), adaptado a las condiciones específicas de nuestro trabajo.

Un aspecto importante en el desarrollo del método analítico utilizado fue la puesta a punto de una técnica de extracción que permitiera obtener porcentajes de recuperación elevados. Para conseguir este objetivo y disponer de un rendimiento elevado en el proceso de extracción, fue preciso evitar la presencia en el extracto de contaminantes que pudiesen alterar los resultados del ensayo biológico. Se tomó, por ello, especial precaución en evitar métodos de extracción basados en la utilización de mezclas de hexano y éter de petróleo por su influencia nociva en los ensayos de análisis de las muestras (Valenzuela, 1995).

Así por ejemplo, se ha eliminado el éter de petróleo realizándose la extracción y elución inicial en columna cromatográfica con hexano. La tabla 3.36, en la que se muestran los rendimientos de extracción de muestras de grasa marcadas con algunos de los pesticidas objeto de estudio, resulta indicativa de la bondad de la técnica empleada.

La purificación de las muestras para análisis cromatográfico se ha realizado mediante el empleo de HPLC semipreparativa, método ya desarrollado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Valenzuela, 1995) en ensayos realizados con muestras de suero y que se adapta perfectamente a las muestras de tejido adiposo. La elución de los xenoestrógenos organoclorados, fundamentalmente pesticidas, tiene

lugar en los primeros 11 minutos del cromatograma, mientras que las hormonas estrogénicas y otros derivados fenólicos eluyen a tiempo superior a 13 minutos, debido a su menor liposolubilidad. Un cromatograma ilustrativo de este tipo de análisis preparativo es el correspondiente a la figura 3.20.

Por otra parte, con objeto de definir, de manera sistemática, las fracciones colectadas en el protocolo HPLC se asignó el nombre de fracción alfa al eluido colectado durante los 11 primeros minutos del desarrollo cromatográfico y se reservó el nombre de fracción beta al eluido colectado entre los minutos 13 y 25. El protocolo experimental desarrollado para ello incluyó la desecación de las fracciones alfa y beta y su adaptación a las exigencias de procesamiento del test biológico, en la forma previamente descrita.

En definitiva, el desarrollo de la metodología analítica empleada nos ha permitido utilizar una técnica suficientemente precisa para la estimación de la carga hormonal estrogénica y la cuantificación de xenobióticos estrogénicos, fundamentalmente pesticidas organoclorados, en muestras de tejido adiposo humano. La aplicación de la misma nos ha permitido analizar un total de 200 muestras de tejido adiposo distribuidas del siguiente modo:

1. 100 muestras de pacientes con patología no oncológica ni endocrina (controles) emparejadas con los casos por razón de la edad en ± 3 años.
2. 100 muestras de tejido adiposo correspondientes a otras tantas mujeres diagnosticadas e intervenidas quirúrgicamente de cáncer de mama (casos) en los hospitales "San Cecilio" y "Virgen de las Nieves" de Granada y el hospital "Torrecárdenas" de Almería.

Las fracciones alfa y beta de cada una de las muestras de tejido adiposo obtenidas fueron sometidas en el bioensayo E-SCREEN a diluciones sucesivas con objeto de estimar el efecto proliferativo y así poder deducir su equivalencia en

concentración respecto de la hormona natural. Este método ha permitido expresar, para cada paciente y para cada una de las fracciones cromatográficas observadas una estimación de la carga estrogénica en equivalentes de estradiol por peso de grasa extraída.

En términos generales, un 69% de las fracciones alfa de las muestras correspondientes a enfermas afectas de cáncer de mama mostraron una fracción α positiva en el E-SCREEN, con un valor medio de 76,5 pM de equivalente estradiol por gramo de lípido. Este porcentaje cayó a un 59% en el caso de los controles, con un valor medio de actividad estrogénica de 70,8 pM de equivalentes estradiol por gramo de lípido.

De igual modo, realizado el análisis de la actividad proliferativa de las fracciones beta y su expresión en unidades equivalentes de estradiol, tanto para casos como para controles, los porcentajes de muestras con actividad medible fueron de 78% y 75%, mientras que los valores medios de carga estrogénica fueron 79 pM de equivalentes estradiol/g de lípido y 90,52 pM equivalentes estradiol/g de lípido, respectivamente.

Un análisis detenido de estos resultados permite extraer ciertas conclusiones:

1. La metodología propuesta es útil para extraer xenobióticos estrogénicos de muestras de tejido adiposo y separarlos de los estrógenos ováricos.
2. La positividad de las muestras (65% de las fracciones alfa y 76% de las fracciones beta) indica que el método es lo suficientemente sensible para asignar un valor de carga estrogénica a un número significativo de muestras procesadas. Si se tiene en cuenta, además, que la cantidad de tejido graso utilizada en los ensayos es de 0,2 g, parece claro que la metodología propuesta es susceptible de aplicación en estudios epidemiológicos que necesiten de la medida de carga estrogénica y que incluyan en su diseño la obtención de muestras de pequeño tamaño de tejido adiposo.

El método así desarrollado podría ser igualmente aplicable a muestras de tejido graso obtenidas mediante punción aspiración (en este trabajo todas las muestras se obtuvieron durante un acto operatorio de cirugía mayor).

Si interesante es la demostración de que el método propuesto asigna un valor de carga estrogénica a la fracción cromatográfica alfa, en la que eluyen los pesticidas organoclorados y xenobióticos menos polares, no menos importante es el considerar el alto porcentaje de muestras que presentan actividad hormonal en la fracción cromatográfica beta (76%), observación que merece un pequeño comentario.

Una gran parte del esfuerzo realizado en el presente trabajo se ha dirigido a la identificación de los contaminantes contenidos en la fracción cromatográfica alfa en la que, como hemos visto antes, eluyen los pesticidas organoclorados y aunque, inicialmente se decidió no entrar en el estudio de la fracción cromatográfica beta, lugar de elución de los estrógenos naturales y polifenoles, es necesario resaltar la importancia que puede tener el hallazgo de tan elevado porcentaje de actividad hormonal en dicha fracción para un entendimiento cabal del papel endocrino del compartimento graso del organismo humano. El hecho de que cerca del 76% de las muestras analizadas presenten actividad hormonal estrogénica en torno a 80 pM de estradiol/ g de grasa significa que el reservorio de estrógenos en este compartimento orgánico es enorme.

La movilización de la carga estrogénica contenida en dicho compartimento graso es un asunto de gran envergadura que debería ser abordado, en nuestro juicio, en estudios posteriores y que, por el momento, escapa a los objetivos de la investigación realizada. Poco se ha publicado a este respecto, si bien la actividad enzimática del compartimento graso está bien estudiado (Bradlow y cols., 1995). No obstante, los datos aquí presentados obligan a considerar: 1) la sospecha de un papel de relevancia del estrógeno acumulado en la grasa tanto en la génesis del proceso

tumoral como en su evolución posterior y en el grado de respuesta directa e indirecta al tratamiento antitumoral, 2) el papel de la obesidad y el hábito corporal en el riesgo de desarrollo de cáncer de mama (De Waard y cols., 1977).

Biomarcadores de efecto estrogénico

Objetivo de este trabajo ha sido, también, la optimización de un marcador de efecto estrogénico susceptible de ser aplicado de forma rutinaria en los estudios epidemiológicos de cáncer de mama y en aquellos otros encaminados hacia la investigación del efecto derivado de la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal. Hemos tratado de definir, en este sentido, un biomarcador de actividad hormonal aplicable a muestras humanas y que vaya más allá de la simple cuantificación de una, o unas pocas sustancias químicas relacionadas con mayor o menor certeza con la patogenia de la enfermedad tumoral.

Clásicamente los biomarcadores de riesgo se han dividido en tres grandes grupos:

1. Biomarcadores de exposición, que hacen referencia a sustancias exógenas al organismo humano, a sus metabolitos o a la interacción de cualquiera de ellos con células o moléculas blanco, que puedan ser identificadas y cuantificadas en un compartimento corporal determinado.

2. Biomarcadores de susceptibilidad, que definen la capacidad del organismo, inherente o adquirida, para adaptarse a las consecuencias derivadas de la exposición a agentes exógenos presuntamente tóxicos.

3. Biomarcadores de efecto, definidos en términos de alteración bioquímica, fisiológica o de cualquier otro tipo que pueda ser medida y cuantificada, y que, dependiendo de su magnitud, pueda ser reconocida como un defecto potencial o enfermedad ya establecida.

No es difícil, en principio, clasificar la carga estrogénica acumulada en el tejido graso como un marcador de exposición. Debe quedar claro, no obstante que dicha carga no es un marcador de dosis interna, en el sentido más estricto de la palabra, puesto que con su determinación no tratamos sólo de conocer la concentración de una o unas pocas sustancias químicas en el tejido adiposo.

Probablemente, el concepto de dosis en el blanco podría ser más apropiado para definir la carga estrogénica. Pero, sin duda, el término que mejor ajusta con su significado es el de dosis biológica efectiva puesto que con el mismo nos referimos a la interacción de compuestos con macromoléculas de relevancia en la patogenia de ciertos procesos biológicos. En efecto, lo que el E-SCREEN cuantifica es el efecto hormonal estrogénico desencadenado tras la interacción de los xenoestrógenos con el sistema de receptores hormonales y la expresión última de ese complejo mecanismo.

En cualquier caso, el concepto de biomarcador de exposición es excesivamente restrictivo, puesto que con su expresión nos limitamos a indicar exposición sin establecer ningún vínculo con el efecto biológico producido. La medida de la carga estrogénica en una situación determinada, debería entenderse por ello, más como un marcador de efecto que de exposición, lo que obligaría a considerar la dependencia presuntamente existente entre marcador y efecto y, por tanto, a reconocer una posible relación entre hiperestrogenismo y riesgo de cáncer de mama. En sentido estricto, si se admite una relación de causalidad entre estrógenos ováricos y estrógenos farmacológicos y cáncer de mama, este soporte conceptual debe extenderse al papel de la actividad de los xenoestrógenos (carga estrogénica) en el desarrollo ulterior del carcinoma mamario.

Una especial atención se ha prestado en el presente trabajo a la búsqueda de tests alternativos al ensayo E-SCREEN que permitan, de una parte, confirmar la especificidad y sensibilidad del test de rutina y, de otra, mejorar sus prestaciones y

facilitar su aplicación.

El test E-SCREEN exige el cultivo y mantenimiento en condiciones muy precisas de las células de cáncer mamario MCF-7 (Soto y cols., 1992). Exige, además, la selección estricta de clones celulares de probada dependencia hormonal (Villalobos y cols., 1995). No obstante, y a pesar de su simplicidad, lo cierto es que el test no ha sido desarrollado de forma exitosa en todos los laboratorios que lo han intentado (Andersen y cols., 1999). Además el test exige para su desarrollo, un tiempo excesivamente largo pues la respuesta estrogénica proliferativa es evidente tan sólo tras 144 horas de subcultivo, hecho que unido al tiempo de siembra y lectura final supone un tiempo de al menos diez días de realización. Cuenta a favor del ensayo el que se pueden procesar bastantes muestras de forma concomitante. En nuestro laboratorio se procesa, en este sentido, una media de treinta muestras semanalmente.

La búsqueda de mejoras en el test E-SCREEN nos ha inducido a utilizar ensayos de estrogénicidad alternativos que utilizando la misma línea celular MCF-7 pudieran ofrecer una mejora en el tiempo de ensayo sin pérdida de la sensibilidad y especificidad del E-SCREEN. Estos ensayos están basados en un principio de observación de estrogénicidad diferente al E-SCREEN, ya que mientras que éste se fundamenta en el efecto proliferativo liderado por los xenoestrógenos, el punto de observación en los bioensayos alternativos es la expresión génica del complejo xenoestrógeno-receptor hormonal.

Los tests ensayados han sido tres:

- 1) La inducción de la síntesis y secreción de la proteína estrógeno-dependiente pS2 y su cuantificación en el medio extracelular.
- 2) La cuantificación del ARN mensajero específico para la síntesis de pS2.
- 3) La medida de la actividad luminiscente determinada por la actividad de un enzima expresado en las células MCF7 tras la inducción de un gen dependiente del

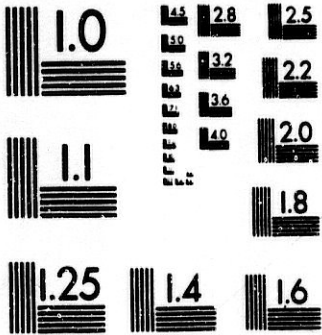
receptor estrogénico.

En todos los casos, el soporte funcional ha sido la línea celular MCF-7, a través de uno de sus subclones más estrógenos-sensibles (Clon BUS utilizado en el E-SCREEN o en el ensayo de cuantificación de la proteína pS2), o mediante un clon que ha ido transfectado con un constructo que incluye el elemento de respuesta estrogénico ERE y el gen para la expresión del enzima luciferasa (Test MVLN) (Pons y cols., 1990).

En todos los casos se ha empleado una misma y única serie de compuestos identificados como xenoestrógenos (contaminantes medio ambientales), para los cuales nuestro grupo tiene una experiencia probada. Se trata de una serie de derivados bifenólicos que partiendo de la estructura más sencilla del p'-metildifenol va adquiriendo complejidad estructural mediante el incremento en longitud de las cadenas de sustituyentes en el carbono central del esqueleto bifenólico. La actividad hormonal estrogénica de estos compuestos ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo (Olea y cols., 1996; Olea y cols., 1998; Pérez y cols., 1998; Pulgar y cols., 1999), que ha confirmado hallazgos previamente publicados en la literatura científica (Dodds y Lawson, 1936).

Pues bien, con este grupo de bisfenoles hemos programado una serie de protocolos experimentales cuyo objetivo fue analizar, en idéntico rango de concentraciones cada uno de los compuestos químicos identificados como xenoestrógenos en los diferentes bioensayos de estrogénicidad. Los resultados, presentados anteriormente (tablas 4.12 a 4.30 y figuras 4.12 a 4.29) merecen a nuestro juicio un comentario detallado.

Las observaciones recogidas en las tablas y figuras indicadas sugiere que, con una cierta variación, todos los ensayos son igualmente eficaces y que cualquiera de ellos podría ser utilizado en el desarrollo del biomarcador de exposición, puesto que todos los tests "identifican" la estrogénicidad de los compuestos. Tres son los



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
 NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
 (ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

receptor estrogénico.

En todos los casos, el soporte funcional ha sido la línea celular MCF-7, a través de uno de sus subclones más estrógenos-sensibles (Clon BUS utilizado en el E-SCREEN o en el ensayo de cuantificación de la proteína pS2), o mediante un clon que ha ido transfectado con un constructo que incluye el elemento de respuesta estrogénico ERE y el gen para la expresión del enzima luciferasa (Test MVLN) (Pons y cols., 1990).

En todos los casos se ha empleado una misma y única serie de compuestos identificados como xenoestrógenos (contaminantes medio ambientales), para los cuales nuestro grupo tiene una experiencia probada. Se trata de una serie de derivados bifenólicos que partiendo de la estructura más sencilla del p'-metildifenol va adquiriendo complejidad estructural mediante el incremento en longitud de las cadenas de sustituyentes en el carbono central del esqueleto bifenólico. La actividad hormonal estrogénica de estos compuestos ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo (Olea y cols., 1996; Olea y cols., 1998; Pérez y cols., 1998; Pulgar y cols., 1999), que ha confirmado hallazgos previamente publicados en la literatura científica (Dodds y Lawson, 1936).

Pues bien, con este grupo de bisfenoles hemos programado una serie de protocolos experimentales cuyo objetivo fue analizar, en idéntico rango de concentraciones cada uno de los compuestos químicos identificados como xenoestrógenos en los diferentes bioensayos de estrogénicidad. Los resultados, presentados anteriormente (tablas 4.12 a 4.30 y figuras 4.12 a 4.29) merecen a nuestro juicio un comentario detallado.

Las observaciones recogidas en las tablas y figuras indicadas sugiere que, con una cierta variación, todos los ensayos son igualmente eficaces y que cualquiera de ellos podría ser utilizado en el desarrollo del biomarcador de exposición, puesto que todos los tests "identifican" la estrogénicidad de los compuestos. Tres son los

aspectos que se han considerado para comparar entre sí las propiedades de los ensayos descritos:

1) La concentración mínima de cada uno de los compuestos capaz de elicitar una respuesta estrogénica (Potencia).

2) La similitud de dicha respuesta, en términos de actividad, respecto de la desencadenada por el estradiol (Eficacia).

3) La amplitud del rango de respuesta en el bioensayo para el estrógeno natural y para los agonistas estrogénicos con objeto de discernir entre agonismo total y parcial.

En principio, es interesante considerar que no todos los derivados bifenólicos fueron igualmente activos en la inducción de la respuesta estrogénica. En orden de mayor a menor potencia estrogénica hemos podido clasificarlos en la forma siguiente:

1. Test E-SCREEN

MM5 > MM4 > MM2, MM3, MM6, MM7 > MM1 > MM8, MM9

2. Test MVLN

MM5 > MM3, MM4, MM6, MM7 > MM1, MM2, MM8, MM9

3. Test proteína pS2

MM5 > MM3, MM6, MM7, MM4 > MM1, MM2, MM8, MM9

4. Test ARNm de pS2

MM5 > MM7, MM4, MM3 > MM6 > MM1, MM2, MM8, MM9

Es posible observar en el primer análisis la coincidencia entre la potencia estrogénica en términos de ordenación por actividades, pero es aún más interesante para este estudio entender que no todos los ensayos son igualmente efectivos para dar una respuesta en un mismo rango de concentraciones. Así por ejemplo, el producto de mayor "estrogenicidad" (MM5 en el E-SCREEN), da una respuesta total,

equivalente a la del estrógeno natural, a una concentración 10 nM. Esta respuesta de agonista total es también evidente a una concentración 100 nM en el ensayo MVLN al igual que ocurre en el test de expresión de la pS2 y del ARNm de esta proteína. De igual modo, el bisfenol MM8, que tiene la particularidad de incluir un grupo cetónico en el carbono central, lo que le confiere unas especiales características en cuanto a rigidez estructural, polaridad y la ausencia de efecto "bulky" que dan las cadenas largas centrales (Pérez y cols., 1998), es uno de los compuestos de menor actividad hormonal estrogénica en los cuatro ensayos considerados.

En términos generales, el análisis de la amplitud de la respuesta sitúa al test E-SCREEN en un lugar privilegiado. Frente a un rango de efecto que alcanza un factor de 6, en el ensayo de proliferación, éste se reduce a tan sólo un valor de 3 en el caso de la inducción de la proteína pS2. La razón de esta "caída" puede estar justificada por el propio diseño metodológico del test. De una parte, porque los valores de pS2 se expresan en concentración de proteína (ng) por millón de células en el cultivo (de esta manera se "corrige" por el crecimiento de la población celular durante el tiempo de subcultivo). En segundo lugar, porque la medida de la proteína se realiza de forma estándar tras seis días de subcultivo, lo que permite inferir que las diferencias entre grupos celulares tratados y no tratados serían más evidentes si ésta se cuantificara de forma más precoz.

Por otra parte, la medida del ARNm de pS2 puede ofrecer información complementaria de utilidad. Así, en el protocolo de medida del ARNm, las tasas de expresión del gen tras 24 horas de exposición hormonal alcanzan valores diez veces superiores (10x) a los niveles basales, cuando aún no se ha producido un efecto neto sobre la proliferación celular. De hecho, las concentraciones de proteína en el medio extracelular se incrementan por un factor superior a veinte, aunque dicho factor merma de modo importante cuando se corrigen los datos por el crecimiento de la población celular.

El último de los ensayos de expresión génica, el test MVLN, ofreció un rango de respuesta muy bajo en el que no se alcanzaron efectos superiores a 3-3,5 sobre el nivel de expresión basal. Este es un ensayo rápido que necesita tan sólo 24 horas de exposición hormonal y que permite la mecanización. Estas dos características lo podría convertir en el test de elección para la búsqueda de un biomarcador de exposición estrogénica. Cabe preguntarse, entonces, el porqué de nuestro empeño en conseguir una buena amplitud en el rango de respuesta. La razón fundamental para ello ha sido la necesidad de encontrar un test que identifique no solo respuestas hormonales totales (agonismo total) sino también respuestas intermedias (agonismo parcial). Si la amplitud de la respuesta es pequeña, las diferencias entre las medias de los grupos control y los casos han de ir acompañadas de una desviación estándar y un error mínimo para que sea posible distinguir entre respuestas parciales de "no efecto" y de efecto total o máximo. A este respecto, el ensayo E-SCREEN y el bioensayo basado en la expresión del ARNm de pS2 pueden considerarse óptimos.

Analizando de forma global los resultados de los ensayos ha sido posible encontrar asociaciones de concordancia entre entidades presumiblemente dependientes. Así por ejemplo, el coeficiente (r) de correlación entre la expresión de pS2 total (cuantificada en el medio extracelular sin ajuste por el número de células), es superior a 0,840 cuando se compara dicha expresión con la respuesta proliferativa en el ensayo E-SCREEN y con el resultado del test MVLN. La correlación es algo peor cuando se compara la expresión ARNm de pS2 y la medida de la proteína pS2 (discrepancia que puede estar mediatizada por factores de orden metodológico, como se ha comentado anteriormente). Es importante destacar, por último, el hallazgo de ajustes intermedios ($r=0,748$) en la comparación de los resultados obtenidos mediante los tests E-SCREEN y MVLN. Esta observación tiene cierto interés, dado que el test de células transfectadas es el que ha sido propuesto con más ahínco como alternativa al test de proliferación (Andersen y cols., 1999) sin que se hayan explicitado bien las

razones para ello.

Debe hacerse notar, por otro lado, el considerable esfuerzo realizado en este trabajo para transformar un biomarcador de exposición tipo dosis interna en un marcador de equivalencia biológica y efecto. En este sentido, hemos sido muy cautos en la definición de los equivalentes estradiol, unidad en la que se expresa la actividad hormonal estrogénica de los extractos analizados en el bioensayo de estrogénicidad, debido al carácter original de esta aproximación, sin antecedentes en estudios epidemiológicos de xenoestrogénos y cáncer de mama.

En resumen, el bioensayo E-SCREEN presenta cualidades que lo hacen el test de elección para ensayos de estrogénicidad, tanto por razones de sensibilidad y especificidad como por la amplitud del rango de respuesta obtenido. Esto no quiere decir, sin embargo, que no sea posible mejorarlo y llegar, en un futuro próximo a la estandarización de un bioensayo tan preciso como el E-SCREEN pero con una disminución sensible de su tiempo de ejecución.

Pesticidas organoclorados y cáncer de mama

Los estudios epidemiológicos orientados hacia la búsqueda de una asociación entre la exposición a disruptores endocrinos y el riesgo de padecimiento de cáncer de mama son, hasta el momento, poco numerosos, si es que hemos de buscar una palabra única para definir la situación actual. La mayor crítica que puede formularse a tales estudios epidemiológicos es que, en su mayoría, se han limitado a estudiar la exposición humana a uno o unos pocos compuestos organoclorados. Esta aproximación es claramente insuficiente si se considera la gran variedad de sustancias químicas presentes en el medio ambiente que entran dentro de la clasificación química de organoclorados (cuyo número se amplía de forma considerable si se tiene en cuenta el conjunto de los disruptores endocrinos dotados de poder estrogénico). Por

esta razón, creemos que los estudios diseñados para investigar la relación existente entre la exposición a un único compuesto químico (pesticida organoclorado), y el riesgo de padecimiento de cáncer de mama que han concluido negativamente deberían limitar dicha conclusión, de forma exclusiva y precisa, al compuesto ensayado en lugar de extender la conclusión al conjunto de todos los pesticidas organoclorados y a los xenoestrógenos.

Lo cierto es que desde mediados de los años ochenta, la atención de los investigadores se ha dirigido hacia determinados compuestos químicos, bien por la frecuencia de su empleo, bien por la cantidad utilizada o bien por la generalización de su empleo. Este lugar lo ocupan, sin lugar a dudas, el DDT, sus derivados y metabolitos y el grupo genérico de los PCBs.

En principio, se pueden aducir tres razones de orden científico para justificar la atención tan pormenorizada prestada a estos dos grupos de organoclorados:

1. Se trata de compuestos bioacumulables en tejido graso, detectados en la leche humana y, por lo tanto, presentes "in situ" en el tejido mamario.
2. Algunos de ellos tienen actividad hormonal estrogénica, es decir entran en el grupo genérico de disruptores endocrinos.
3. Los productos de su metabolismo constituyen entidades químicas altamente reactivas, algunas de las cuales tiene afinidad por el ADN intranuclear, por lo que pueden ser considerados carcinógenos potenciales.

Estas razones explican, por sí solas, que los estudios centrados en la medida de la exposición humana a organoclorados se hayan limitado a estos compuestos químicos (destacando particularmente en la literatura las medidas en sangre y grasa mamaria de DDT/DDE), pero no pueden justificar que las conclusiones obtenidas se hayan generalizado para el conjunto genérico de organoclorados (Olea y cols., 1995; Olea y cols., 1999). De hecho, han sido estas generalizaciones las que más han

movido la opinión pública, y condicionado el trabajo de científicos y de investigadores clínicos que, poco a poco, han ido tomando unas posiciones más o menos enfrentadas a dicha tesis (Ahlborg y cols., 1995; Ashby y cols., 1997).

Muchos de los trabajos referidos se han limitado, en efecto, a la medida de la exposición interna, cuantificando los niveles circulantes en sangre de DDT/DDE en pacientes afectas de cáncer de mama y en pacientes apareadas en cuanto a edad y otras variables significativas utilizadas como grupo control. De este conjunto de trabajos, tan sólo el presentado por Wolff en la serie de cáncer de mama de Manhattan encontró una asociación significativa entre los niveles de DDE y el riesgo de padecimiento de cáncer de mama (Wolff y cols., 1993). Estudios posteriores realizados por Krieger, Hunter y Helzlsoure (Krieger y cols., 1994; Hunter y cols., 1997; Helzlsoure y cols., 1999) no han podido confirmar estos resultados y parecen indicar, de forma convincente, que la concentración de DDT y sus derivados en sangre circulante, medida con anterioridad al desarrollo de la enfermedad tumoral o en el momento del diagnóstico clínico, no es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad tumoral maligna. En realidad, en más de una ocasión, se ha encontrado una asociación inversa, aparentemente paradójica, en virtud de la cual las enfermas afectas de cáncer mamario presentan los niveles más bajos de DDT y PCBs (Hunter y cols., 1997; van't Veer y cols., 1998; Helzlsoure y cols., 1999).

No obstante su importancia, la lectura de estos hallazgos ha sido hecha de forma algo simplista. De una parte, porque no se ha recalcado suficientemente la alta exposición existente entre la población general (se caracteriza por una alta frecuencia de individuos expuestos y tasas de residuos de pesticidas asimismo elevados). En segundo lugar, porque se han extendido las conclusiones al resto de los organoclorados ignorando la existencia de otros compuestos químicos con igual valor en cuanto a exposición, concentraciones y efecto biológico y sin haber investigado las interacciones de tales compuestos entre sí y con las hormonas

ováricas.

El análisis de los datos de acumulación, especialmente DDT/DDE en el tejido adiposo puede ofrecer alguna información adicional a la hipótesis medio ambiental del cáncer de mama. Efectivamente los resultados de los estudios epidemiológicos basados en la utilización del tejido graso como fuente de medida parecen ser algo más convincentes en la demostración de la citada hipótesis. Por ejemplo, el DDE parece estar un 50% más elevado en el tejido graso mamario de las enfermas afectas de cáncer y el riesgo relativo para las pacientes con concentraciones mayores del compuesto es asimismo mayor (Falck y cols., 1992). El riesgo se incrementa, por otra parte, cuando se determinan los niveles de DDE en pacientes con tumores positivos para el receptor estrogénico (Dewailly y cols., 1994; Pujol y cols., 1994; Dewailly y cols., 1997).

No ha sido objetivo del presente trabajo definir los factores de riesgo en la serie de pacientes analizada ni valorar el peso de la carga estrogénica entre los factores de predisposición tumoral. Nuestro objetivo ha sido desarrollar, y estandarizar una metodología para estimar carga estrogénica que pueda aplicarse de forma rutinaria en los estudios epidemiológicos como marcador de exposición. No obstante, en la investigación realizada hemos abordado la problemática de la exposición a pesticidas organoclorados tratando de recoger la mayoría de las recomendaciones enunciadas en los análisis de la bibliografía publicada (Woodruff y cols., 1994; Ahlborgh y cols., 1995; Longnecker y cols., 1997). Por esta razón:

1. Se ha extendido la medida de los residuos de organoclorados a una serie de 16 compuestos de interés por su clasificación como xenoestrógenos.

2. Se ha utilizado el tejido graso tomado en el acto operatorio para la identificación y cuantificación de los organoclorados acumulados, bajo la premisa de que este compartimento orgánico puede informar sobre la exposición histórica de un

individuo.

En principio, en el trabajo se han abordado aspectos metodológicos. Como los compuestos organoclorados son moléculas de fácil determinación por cromatografía de gases, se ha utilizado esta técnica, que incluye un detector de captura de electrones. Para una mayor resolución en la separación de los componentes de las mezclas problema se ha utilizado una columna capilar de 30 m de longitud. Las condiciones de análisis cromatográfico descritas en el apartado correspondiente, son originales y se han desarrollado y validado específicamente por nuestro grupo de trabajo para el análisis de los productos que se han considerado de interés.

Se ha prestado especial interés al estudio de la reproducibilidad de la técnica. Para ello se ha inyectado repetidamente una muestra preparada a una concentración situada en un punto medio de la curva de calibrado para cada compuesto químico. La amplitud de las desviaciones estándar obtenidas demuestran el acierto de la metodología desarrollada.

En segundo lugar y con objeto de que el análisis cromatográfico sea cuantitativo se ha seguido el método del patrón interno. Para ello se ha seleccionado un compuesto químico cuyas características analíticas permiten un comportamiento similar al de las moléculas a analizar, con un tiempo de retención situado en un punto intermedio del cromatograma realizado con las sustancias problema, con una elevada calidad analítica y un grado de pureza superior al 99%.

Entre los distintos patrones ensayados el más adecuado la p,p'-diclorobenzofenona, un compuesto similar a las moléculas objeto del estudio que no se puede considerar un pesticida organoclorado y no presenta efecto estrogénico como es el caso de las moléculas que nos ocupan (Brotons, 1994). La reproducibilidad de los resultados obtenido para el patrón interno fue excelente, habiéndose encontrado un buen ajuste en la curva de calibrado ($r = 0,988$) para un

rango de concentraciones comprendidas entre 0,03 y 1,5 $\mu\text{g/ml}$.

En tercer lugar, la determinación de los límites de detección y cuantificación de los compuestos a estudiar se ha establecido de acuerdo con MacDougall (1980) y Long y Wineffordner (1983), situándose el límite de detección en torno a 1 ng/ml para las sustancias patrón y el límite de cuantificación queda comprendido entre 1 y 25 ng/ml.

Por último, para la realización de las curvas de calibrado y el cálculo del factor de respuesta se utilizó la técnica del patrón interno de acuerdo con la metodología descrita precedentemente. Los valores del ajuste lineal de los datos experimentales han puesto de manifiesto la precisión del método desarrollado.

Los pesticidas organoclorados y los metabolitos que se seleccionaron para el estudio en este trabajo fueron lindano, aldrín, dieldrín, endrín, mirex, DDT y metabolitos y endosulfán y metabolitos, lo que hace un total de 16 compuestos, un número a todas luces considerable de pesticidas. Todos ellos eluyeron en tiempos de retención comprendidos entre 7,9 y 15,6 minutos, estableciéndose un tiempo total de 30 minutos para el análisis completo, lo que significa un tiempo de cromatografía óptimo para su aplicación continuada.

Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes y cuantificados los niveles de pesticidas, se procedió a la expresión de los resultados en función del contenido en grasa de las muestras de tejido adiposo. Es cierto que esto supone un trabajo adicional, pero hemos querido referir el contenido de pesticidas a la cantidad de grasa en lugar de al peso (0,2 g) de las muestras de tejido. La existencia de muestras de diferente origen, grasa mamaria y grasa abdominal, supone admitir muestras de tejido con diferente contenido en fracción grasa, debido a la diferente composición proporcional de los distintos tejidos del organismo (Woodruff y cols., 1994).

Afortunadamente para el desarrollo del presente estudio trabajos previos han demostrado que, en lo que a residuo de pesticidas se refiere, el contenido de pesticidas organoclorados en grasa humana es idéntico e independiente del sitio de extracción de la muestra (Kohlmeier y Kohlmeier, 1995). De hecho, los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento han medido tanto grasa mamaria como grasa abdominal o glútea (van't Veer y cols., 1997; Dewailly y cols., 1997).

Los pesticidas identificados en las 200 muestras analizadas en el curso de la investigación han presentado concentraciones muy variables que van desde no detectados a niveles superiores a 1000 ng/g lípido. La distribución de los distintos pesticidas en las muestras fue totalmente aleatoria.

La persistencia del o,p'-DDT y del p,p'-DDT se ha estimado en torno a los siete años en seres vivos y se han sugerido tiempos aún mayores para el metabolito pp'-DDE (Lognecker y cols., 1997), por lo que no sólo los productos de exposición sino también los metabolitos deben ser considerados en todo tipo de estudios en los que se evalúe el peso de los organoclorados.

En el 100% de las muestras analizadas se confirmó la presencia de p,p'-DDE, con un valor medio para los casos de $420,5 \pm 311,8$ ng/g de grasa. El 13% de las muestras presentaron valores superiores a 800 ng/g de grasa, el 28 % valores comprendidos entre 400 y 800 ng/g y el 59 % restante concentraciones inferiores a 400 ng/g pero por encima de los límites de detección del método analítico utilizado. Para los controles, el valor medio de p,p'-DDE se situó en $410,4 \pm 313,4$ ng/g de grasa. La distribución de las concentraciones fue las siguientes: un 11% presentó valores superiores a 800 ng/g, 31 % ofrecieron valores comprendidos entre 400 y 800 ng/g de grasa y 58% valores de DDE inferiores a 400 ng/g de grasa. La presencia constante del metabolito p,p'-DDE en la grasa corporal ha sido confirmada por otros autores (Stellman y cols., 1997.; Krauthacker y cols., 1998).

En nuestro trabajo, el o,p'-DDT tuvo mayor presencia en el número de muestras de casos que de controles siendo el porcentaje de muestras positivas mayor el encontrado para el p,p'-DDT, hecho en consonancia con observaciones previas (Woodruff y cols., 1994; Ahlborg y cols., 1995). En el estudio de los controles se apreciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar frecuencia de aparición de o,p'-DDT y p,p'-DDT. Sin embargo, esta diferencia no fue tan clara al comparar los resultados encontrados para los casos. Por su parte, el metabolito o,p'-DDD apareció en un 35% de los casos y un 40% de los controles.

Según diversos investigadores (Dong y cols., 1999; Ahlborg y cols., 1995) es interesante la relación que pueda establecerse entre las concentraciones de DDT y su metabolito DDE. En este sentido, valores bajos del cociente DDT/DDE indican una exposición crónica y antigua al pesticida, probablemente relacionada con la cadena alimentaria, aunque no pueden descartarse otras fuentes de exposición igualmente importantes como la manipulación y empleo de estos pesticidas en la lucha directa contra los insectos, ya que nuestro trabajo incluye un grupo de población adulta y hasta los años 70 no se prohibió el uso indiscriminado de estos compuestos.

Por otra parte, la mezcla comercial del DDT habitualmente empleada presenta cantidades variables de estos derivados de los cuales el p,p'-DDT supone hasta un 77% del total, y el metabolito p,p'-DDE hasta un 4%. En definitiva, bien sea por el metabolismo del DDT, bien por la participación de sus isómeros y metabolitos en la mezcla comercial, lo cierto es que la frecuencia de DDE en tejido adiposo es alta. De acuerdo con nuestros resultados y con los estudios publicados hasta el momento, existe una tendencia a la disminución de la relación DDT/DDE con la edad, lo que indica una exposición crónica al pesticida.

Algunos trabajos epidemiológicos han explorado el riesgo de cáncer de mama ligado a la exposición a otros compuestos organoclorados distintos de DDT y sus metabolitos. A este respecto, el residuo elevado de β -hexaclorobenceno (Mussalo-

Rauhamaa, y cols., 1990; Hoyer y cols., 1998) se ha asociado con dicho riesgo, al igual que ha ocurrido con los niveles de clorodibenzo-p-dioxina (Safe y cols., 1991; Hardelly cols., 1996). Más recientemente, esta asociación ha demostrado poseer una alta significación estadística cuando los organoclorados considerados son el dieldrín (Hoyer y cols., 1998) y el mirex (Moysich y cols., 1997) y ajusta con una serie concreta de variables entre las que destacan la nuliparidad y el no haber lactado.

Junto a estos pesticidas hemos incluido en nuestro estudio algunos otros compuestos de gran interés por el uso actual y la popularización de su empleo. Tal es el caso del ciclodieno endosulfán, compuesto de estrogenicidad reconocida en diferentes modelos (Soto y cols., 1995; Andersen y cols., 1999).

No es correcto referirse al pesticida endosulfán de forma genérica debido a que en su composición participan una mezcla de isómeros y metabolitos en proporción variable. La mezcla comercial está formada por los isómeros I y II con un 70% del primero frente a un 30% del segundo. El endosulfán I es más persistente que el endosulfán II. La persistencia media del primero puede ascender hasta los 800 días frente a 60 días sólo del isómero II, posiblemente por una degradación aeróbica del endosulfán II a endosulfán I (Doong y Lee, 1999). Su metabolismo en seres superiores implica su transformación hacia formas más hidrosolubles, siendo el endosulfán sulfato el metabolito principal, aunque una segunda vía de interés es su transformación en endosulfán-éter, metabolito en equilibrio con endosulfán-diol. Lo cierto es que debido a su alta lipofilia todos los compuestos anteriores se almacenan en tejido adiposo, excretándose algunos de ellos en la fracción grasa de la leche de los mamíferos y su presencia se ha constatado en la orina de individuos expuestos (Craan y Haines, 1998; Atuma y cols., 1998).

En consonancia con la información publicada por otros autores, nuestros datos demuestran mayor frecuencia del isómero I en las muestras analizadas que del isómero II. Así el endosulfán I se encontró en 17% de los casos y 32% de los

controles, mientras que el endosulfán II apareció en el 12% de los casos y 19% de los controles. Los metabolitos buscados arrojan variaciones similares en la frecuencia de aparición, de tal forma que es ligeramente superior la frecuencia en los controles, si bien la concentración es superior en los casos.

La interconversión de los demás pesticidas en sus metabolitos puede explicar, la presencia de uno u otro derivado en las muestras analizadas, como es el caso de aldrín y dieldrín o los derivados del lindano. La presencia de dieldrín fue mayor, por otra parte, en los casos que en los controles. Sólomente en cinco muestras de casos y en cinco muestras de controles se ha detectado la presencia de mirex.

La comparación entre las medias observadas en los casos y controles, para un intervalo de confianza del 95% ha permitido establecer diferencias significativas, siendo más elevados, en las muestras procedentes de enfermas afectas de cáncer de mama los valores medios de los siguientes pesticidas: aldrín, p,p'-DDT, endosulfán-lactona, endosulfán-diol, endosulfán I y endosulfán-sulfato. Igualmente estuvieron más elevados pero sin alcanzar significación estadística los valores encontrados en los casos para endosulfán-éter, p,p'-DDE, metoxicloro y mirex. Por el contrario, fueron más elevados y con significación estadística los valores medios encontrados en los controles para los siguientes productos: lindano, dieldrín, endrín, endosulfán II y o,p'-DDT. El análisis de la frecuencia de aparición de los pesticidas en las distintas muestras ha permitido estimar que los pesticidas estudiados a excepción del o,p'-DDT y dieldrín se encuentran con mayor frecuencia en controles que en casos.

El número de pesticidas ensayados en otros trabajos en tejido adiposo, suero y leche es bastante limitado. Habitualmente, se determinan el DDT y sus metabolitos junto con algunos PCBs. En ocasiones se ha reseñado lindano, dieldrín, mirex o endosulfán. Pero en ninguna ocasión se ha encontrado en la bibliografía para estudios sobre medios biológicos humanos una batería de pesticidas tan amplia como la

analizada en este trabajo. Lo cierto es que, independientemente del pesticida analizado, los valores obtenidos por nosotros se encuentran en el mismo rango de concentración que los hallados por los autores consultados (Tite y cols., 1982; Okond'Ahoka, 1984; Guy y cols., 1986; Frank y cols., 1988; Williams y cols., 1991; Dewailly y cols., 1994; López-Carrillo y cols., 1996; vant'Veer y cols., 1997; Weistrand y cols., 1997; Gütes y cols., 1998).

Las observaciones anteriores no dejan de ser inquietantes, toda vez que nuestros resultados confirman la alta exposición de la población de estudio a sustancias químicas medio ambientales con efecto hormonal. Si bien en más de un caso cabe el recurso fácil de admitir que la exposición actual a determinados pesticidas es significativamente menor a la ocurrida en tiempos pasados, es necesario recordar (nuestro trabajo lo pone de manifiesto) que la exposición interna a algunos pesticidas de uso actual, que no están restringidos y cuyo empleo, en términos, de volumen y extensión, alcanza las más altas cotas en la clasificación comercial, es ciertamente preocupante.

En resumen, seis de siete estudios de tipo caso-control realizados en pacientes con cáncer de mama han encontrado niveles similares o ligeramente inferiores de DDE en los casos al compararlos con los provenientes de controles apareados (Helzlsouer y cols., 1999). Por otra parte, en cuatro de seis estudios se ha encontrado que el residuo de PCBs estaba significativamente más elevado en los casos que en los controles. Mayor riesgo de cáncer de mama se ha asociado con los niveles de dieldrín (Hoyer y cols., 1998), clorodibenzo-p-dioxina (Hardell y cols., 1996), β -hexaclorobenzeno (Hoyer y cols., 1998) y mirex (Moysich y cols., 1997).

Tomados en conjunto todos los datos experimentales acumulados, parece legítimo pensar que la hipótesis de la influencia de los organoclorados con actividad hormonal estrogénica en el desarrollo del cáncer de mama, si bien no confirmada no

debe ser descartada. Para su verificación o refutación han de ser explorados, a nuestro juicio los siguientes aspectos:

1) De una parte, se trata de ampliar el número de compuestos evaluados en los estudios caso-control y estudiar el efecto acumulativo de los diferentes organoclorados bioacumulados en el tejido graso.

2) Por otra parte se debería investigar hasta que punto el tejido adiposo se comporta o no como un reservorio de liberación loco-regional o sistémica de compuestos con actividad hormonal que pueden actuar en momentos críticos del desarrollo del tumor mamario.

En cualquier caso, parece probado que no hay un beneficio real ligado a la medida individualizada de compuestos como DDT/DDE y algunos pocos PCBs en muestras de enfermas afectas de tumores mamarios, y que el progreso, en este campo, debe orientarse tanto hacia la extensión de los estudios de nuevos compuestos químicos como hacia la investigación de los efectos de combinaciones de diferentes xenoestrógenos, en lugar de la estimación de la concentración interna de compuestos aislados.

En resumen, el presente trabajo avanza algo más en la hipótesis que liga xenoestrógenos y cáncer de mama puesto que se ha obtenido la evidencia científica suficiente para: 1) afirmar la alta exposición medio ambiental existente a organoclorados, 2) demostrar la estrogenicidad de estos compuestos y 3) posibilitar la medida de la actividad estrogénica del conjunto de compuestos bioacumulados.

En nuestra opinión, resulta necesario, por último, insistir en una cuestión reiteradamente mencionada en este trabajo: del mismo modo que es insuficiente, para estimar la exposición a organoclorados limitarse a la medida del residuo de DDE en el interior del organismo expuesto, creemos que se comete un error si se reduce la medida de la exposición a xenoestrógenos al campo de los organoclorados. Una y

otra noción nacen de la propia inquietud que nos ha producido la profundización en el conocimiento de los disruptores hormonales. No debe ser una sorpresa, hoy día, para nadie saber que cerca de quinientas moléculas de muy diferente estructura química, propiedades y usos se han catalogado como disruptores endocrinos. La DGXI de la Unión Europea en una reunión en Mayo de 1999 hizo su primer censo de sustancias químicas, contaminantes medio ambientales con actividad hormonal *in vivo* e *in vitro*. Esto quiere decir que la investigación sobre la hipótesis medio ambiental del cáncer de mama exige aún mucho mas trabajo experimental y que es tan sólo con un mente abierta y el desarrollo de protocolos rigurosos como se podrá abordar un problema tan importante.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La metodología mixta químico-biológica desarrollada en el presente estudio ha resultado ser adecuada para la extracción de los xenobióticos estrogénicos contenidos en tejido adiposo, separarlos de los estrógenos ováricos y determinar su actividad en un ensayo específico de medida de la estrogénicidad. De hecho, el 86 % de las 200 muestras de tejido adiposo procesadas presentaron una respuesta cuantificable en el test de estrogénicidad.

2. Todos los pesticidas organoclorados estudiados a excepción del mirex han sido clasificados bajo el epígrafe de xenoestrógenos, puesto que ensayados mediante el test de estrogénicidad E-SCREEN indujeron una respuesta proliferativa positiva. El o,p'-DDT se comportó como agonista total, mientras que el resto de los pesticidas estudiados se comportaron como agonistas parciales con eficacia proliferativa situada entre 25% y el 75%.

3. Utilizando un grupo de xenoestrógenos bien caracterizado, los bisfenoles, se han evaluado las propiedades y características de cuatro ensayos de estrogénicidad: test de proliferación E-SCREEN, expresión de la proteína pS2, expresión del ARNm de pS2 e inducción del enzima luciferasa en células transfectadas, basados todos ellos en el empleo de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. De tales ensayos, el test E-SCREEN ha mostrado condiciones óptimas para ser utilizado como biomarcador de actividad estrogénica, dado que los compuestos químicos ensayados desencadenaron la proliferación celular a concentraciones muy bajas. La amplitud de la respuesta observada en el ensayo E-SCREEN ha permitido, además, distinguir y

CONCLUSIONES

similares para casos y controles. No obstante, la frecuencia de positividad en el ensayo ha permitido establecer diferencias significativas para el valor de la carga estrogénica de la fracción alfa que ha resultado ser superior en los casos respecto a los controles. A nuestro juicio, la utilización de este marcador de exposición/efecto constituye un instrumento sumamente útil en estudios epidemiológicos de cáncer de mama.

7. Aunque la hipótesis de relación entre la exposición a compuestos organoclorados y desarrollo ulterior de cáncer de mama no haya podido ser verificada en el presente estudio, la multitud de sustancias químicas, contaminantes medio ambientales, catalogados como disruptores endocrinos por su actividad hormonal, a los que se encuentran expuestos, hoy día, los seres humanos y la incidencia creciente, en la sociedad occidental, de cancer mamario obligan a proseguir las investigaciones encaminadas a tal fin.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Adami H, Bergström R, Möhner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M, Gurevicius R, Stengrevics A. Testicular cancer in nine Northern European countries. *Int J Cancer* 59:33-38 (1994).

Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C y cols. Effect of dietary components including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens, and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem* 27:1135-1144 (1987).

Adlercreutz H. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect* 103:103-112 (1995).

Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29:95-120 (1997).

Ahlborg UG, Lipworth L, Titus-Ernstoff L y cols. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol* 25:463-531 (1995).

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S y cols. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein Kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595 (1987).

Akins J, Waldrep K, Bernet JT. The estimation of total serum lipids by a completely enzymatic "summation" method. *Clin Chim Acta* 184:219-226 (1989).

Alm H, Torner H, Tiemann U, Kanitz W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. *Reprod Toxicol* 12:559-563 (1998).

Allen E, Doisy EA. An ovarian hormone: preliminary report on its localizations, extraction and partial purification, and action in test animals. *J Am Med Assoc* 81:819-821 (1923).

Allen E, Smith GM, Gardner WU. Accentuation of the growth effect of theelin on genital tissue of the ovariectomized mouse by direct mitoses with colchicine. *Am J Ana* 61:321-325 (1936).

Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF y cols. Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environ Health Perspect* 107:89-108 (1999).

Archibeque-Engle SL, Tessari JD, Winn DT, Keefe TJ, Nett TM, Zheng T. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J Toxicol Environ Health* 52:285-93 (1997).

Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJ, McLachlan JA. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272:1489-1492 (1996).

Ashby J, Hourthoff E, Kennedy SJ, y cols. The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 105:164-169 (1997).

Astwood, EB. Time relationships in the growth and water exchange of the uterus following estrogenic stimulation. *Anat Rec* 70:5 (1938).

Atuma SS, Hansson L, Johnsson H, Slorach S, de Wit CA, Lindstrom G. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and dioxins in human milk from Swedish mothers. *Food Addit Contam* 15:142-50 (1998).

Auger J, Kunstmann JM, Czyglick F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332:281-285 (1995).

Barreiro R, Ruiz JM, Quintela M. Respuesta a la contaminación por TBT en individuos trasplantados de *Nucella lapillus* (L.) desde zonas poco contaminadas a los puertos del Ferrol y A Coruña. *Cuad Invest Biol* 20:279-282 (1998).

Berkowitz GS, Lapinsky RH, Goldbold JH, Dolgin SE, Holzman IR. Maternal and neonatal factors for cryptorchidism. *Epidemiol* 6:126-131 (1995).

Bitman J, Cecil HC. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J Agric Food Chem* 18:1108 (1970).

Bitman J, Cecil HC, Harris SJ, Feil VJ. Estrogenic activity of o,p'-DDT metabolites and related compounds. *J Agric Food Chem* 26:149 (1978).

Blackwood A, Wolff M, Rundle A y cols. Organochlorine compounds (DDE and PCB) in plasma and breast cyst fluid of women with benign breast disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 579-583 (1998).

Bradlow HL, Davis DL, Lin G, y cols. Effects of pesticides on the ratio of 16 α /2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ Health*

BIBLIOGRAFÍA

Perspect 103:147-150 (1995).

Borrás M, Hardy L, Lempereur F y cols. Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. *J Steroid Biochem Molec Biol* 48:325-336 (1994).

Boyle P. Epidemiology of breast cancer. *Bailliere's Clinic Oncol* 2:1-57 (1988).

Bradbury RB, White DE. Estrogens and related substances in plants. *Vitamins and Hormones* 12:207-233 (1954).

Brotons Oliver JA. Análisis químico y biológico (E-SCREEN) de contaminantes con actividad estrogénica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1994).

Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M y cols. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ Health Perspect* 103:608-612 (1995).

Brown JF y Lawton R. Polychlorine biphenyls (PCBs) partitioning between adipose and serum. *Bull Environ Contam Toxicol* 33:277-280 (1984).

Brown NM y Lamartiniere CA. Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. *Environ Health Perspect* 103:708-713 (1995).

Brown HE, Salamanca S, Stewart G, Uphose L. Chlordecone (kepone) on the night of proestrus inhibits female sexual-behavior in Cdf-344 rats. *Toxicol and Appl Pharmacol* 10:97-106 (1991).

Bulger W H., Muccitelli, RM, Kupfer, D. Studies on the in vivo and in vitro estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic monooxygenase in methoxychlor activation. *Biochem Pharmacol* 27:2417-2423 (1978).

Burse VW, Head SL, Korver MP, McClure PC, Donahue JF, Needham LL. Determination of selected organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in humans serum. *J Anal Toxicol* 14: 137-142 (1990).

Burse VW, Korver MP, Phillips DL, McClure PC, Caudill SP, Miller DT. Possible approaches to establishing interlaboratory comparability of measurements

of polychlorinated biphenyls in human serum. *Anal Chim Acta*. 251:281-289 (1991).

Campbell DM, Webb JA, Hargreave TB. Cryptorchidism in Scotland. *Br Med J* 295:1237-1238 (1987).

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek N. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit Med J* 305:609-913 (1992).

Carson R. "Silent Spring". Houghton Mifflin Company (1962).

Capilla JA. Estudio bioquímico del glucógeno y lípidos hepáticos, en el desarrollo embrionario y postnatal del allus domesticus. Acción del ACTH. Tesis doctoral. Universidad de Granada (1973).

Cassidy A, Bingham S y Setchell K. Biological effects of isoflavones present in soy in premenopausal women: implications for the prevention of breast cancer. *A J Clin Nutr* 60:333-340 (1994).

Castillo M, Barceló D. Analysis of effluents to determine endocrine-disrupting chemicals. *TRAC* 16: 574-583 (1997).

Celius T, Walther BT. Differential sensitivity of zonation and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to DDT pesticides. *J Exp Zool* 281:346-53 (1998).

Clark LB, Rosen RT, Harman TG, Louis JB, Suffet IH, Lippincott RL y Rosen JD. Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic acid derivatives in drinking water by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry. *J Environ Anal Chem* 47:167-180 (1992).

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378-384 (1993).

Colborn T, Smolen M, Rolland R. Taking a lead from wildlife. *Neurotoxicol Teratol* 18:235-237 (1996).

Colton T, Greenberg R, Noller K, Ressegue L, van Bennekom C, Heeren T, Zhang Y. Breast cancer in mothers prescribed diethylstilbestrol in pregnancy. *JAMA* 269:2069-2100 (1993).

BIBLIOGRAFÍA

Cooper RL, Chadwick RW, Rehnberg GL, Goldman JM, Booth KC, Hein JF, Mcelroy WK. Effect of lindane on hormonal control of reproductive function in the female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 99:384-394 (1989).

Craan AG, Haines DA. Twenty-five years of surveillance for contaminants in human breast milk. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:702-710 (1998).

Cummings AM y Metcalf JL. Mechanisms of the stimulation of rat uterine peroxidase activity by methoxychlor. *Reprod Toxicol* 8:477-486 (1994).

Cummings AM y Metcalf JL. Methoxychlor regulates rat uterine estrogen induced protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 130:154-160 (1995).

Cummings AM. Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Crit Rev Toxicol* 27:367-79 (1997).

Davis DL, Bradlov HL, Woff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical Hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 101:372-277 (1993).

De Waard F, Cornelis JP, Aoki K, Yoshida M. Breast cancer incidence according to weight and height in two cities in the Netherlands and in Aichi Prefecture, Japan. *Cancer* 40:1269-1276 (1977).

Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Luebke RW, Lauer LD. The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse: alterations in tumor susceptibility and host resistance parameters. *J Reticuloendothel Soc* 28:571-583 (1980).

Dees C, Foster JS, Ahamed S, Wimalasena J. Dietary estrogens stimulate human breast cells to enter the cell cycle. *Environ Health Perspect* 105:633-636 (1997).

Dees C, Askari M, Foster JS, Ahamed S, Wimalasena J. DDT mimicks estradiol stimulation of breast cancer cells to enter the cell cycle. *Mol Carcinog* 18:107-114 (1997).

Demiperce E, Duchesne MJ, Badia E, Gagne D, Pons M. MVLN cells: a bioluminescent MCF-7-derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *J Steroid Biochem Molec Biol* 46: 355-364 (1993).

Depue RH. Maternal and gestational factors affecting the risk of cryptorchidism and inguinal hernia. *Int J Epidemiol* 13:311-318 (1984).

Dewailly E, Ayotte P, Dodin S. Could the rising levels of estrogen receptor in breast cancer be due to estrogenic pollutants?. *J Natl Cancer Inst* 89:888 (1997).

Dewailly E, Dodin S, Verreault R, Ayotte P, Sauve L, Morin J. High organochlorine body burden in women with estrogen receptor positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 86:232-234 (1994).

Dick IP, Blain PG, Williams FM. The percutaneous absorption and skin distribution of lindane in man II. In vitro studies *Hum Exp Toxicol* 16:652-657 (1997).

Dodds EC, Lawson W. "Synthetic Estrogenic Agents without the phenantrene nucleus". *Nature* 13:996 (1936).

Dodds E, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. Oestrogen activity of certain synthetic compounds. *Nature* 141:247-251 (1983).

Dong R, Lee Ch. Dietary intake and residues of organochlorine pesticides in foods from Hsinchu, Taiwan. *J AOAC Inter* 82:677-682 (1999).

Duarte-Davidson R, Burnett V, Waterhouse KS, Jones KC. A congener specific method for the analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in human milk. *Chemosphere* 23:119-131 (1991).

Ecobichon DJ, MacKenzie DO. The uterotropic activity of commercial and isomerically-pure chlorobiphenyls in the rat. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 9:85-95 (1974).

Editorial. Male reproductive health and environmental estrogens. *Lancet* 345:933-935 (1995).

Ejobi F, Kanja LW, Kyule MN, Nyeko J, Opuda-Asibo J. Some factors related to sum-DDT levels in Ugandan mothers' breast milk. *Public Health* 112:425-427 (1997).

Etgen AM. 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)2,2,2-trichloroethane: a probe for studying estrogen and progestin receptor mediation of female sexual behavior and neuroendocrine responses. *Endocrinol* 111:1498 (1982).

Falck F, Ricci A, Wolff M, Godbold J, Deckers J. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47:143-146 (1992).

BIBLIOGRAFÍA

Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Grane FA, Fong HHS. Potential value of plants as sources of new antifertility agents. *J Pharmaceut Sci* 64:535-598 (1975).

Feldman D. Editorial: Estrogen from plastic —Are we being exposed?. *Endocrinol* 138:1777-1779 (1997).

Fernández MF, Pedraza V, Olea N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer J* 11:11-17 (1998).

Fisch H, Goluboff ET. Geographic variations in sperm counts: a potential cause of bias in studies of semen quality. *Fertil Steril* 65:1044-1046 (1996).

Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, Valotaire Y. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J Mol Endocrinol* 15:143-151 (1995).

Fox SD, Roman JM, Issaq HJ, Nims RW. Metabolic conversion of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDD) to 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) in the male F344/NCr Rat. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:104-108 (1998).

Frank R, Rasper J, Smout MS, Braun HE. Organochlorine Residues in Adipose Tissues, Blood and Milk from Ontario Residents, 1976-1985. *Canadian Journal of Public Health* 79:150-158 (1988).

Gagne D, Balaguer P, Demiperce E, Trousse F, Nicolas JC, Pons M. Stable transfectant cells to study steroid receptor biological activity. *J Biochem* 9: 201-209 (1994).

Garabrant D, Held J, Langholz B, Peters J, Mack T. DDT and related compounds and risks of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 84:764-771 (1992).

García Rodríguez J, García Martín M, Noguera Ocaña M, Luna del Castillo JD, Olea N, Lardelli Claret P. Exposure to xenoestrogens and chrysochloridism: Geographic evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 104:1090-1095 (1996).

Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL, Burt GR. The use of the dog-whelk, *Nucella Lapillus*, as an indicator of tributyltin contamination. *JMBA* 67:507-523 (1987).

Giwercman A, Skakkebaek NE. The human testis-an organ in risk. *Int J Androl* 15:373-375 (1992).

Greenberg ER, Barrett JA, Lanzall LL, Stevens M, Rosseguie L, Burnside S, Neff RK, Young RH, Colton T. Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N Engl J Med* 312 1059-1060 (1984).

Grocock CA, Charlton HM, Pike MC. Role of the fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogens during pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 83: 295-300 (1998).

Guillette L, Gross T, Gross D, Ronney A, Percival H. Gonadal Steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or Control Lakes. *Environ Health Perspect* 103:31-36 (1995).

Gupta PK, Gupta RC. Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan. *A Review Toxicol* 13:115-130 (1979).

Güttes S, Failing K, Neumann K, Kleinstein J, Georgii S, Brunn H. Chlororganic pesticides and polychlorinated biphenyls in breast and malignant breast disease. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 140-147 (1998).

Guy L, Williams DT. Determination of Halogenated Contaminants in Human Adipose Tissue. *J Assoc Off Anal Chem* 69:451-458 (1986).

Hall DL, Payne LA, Putnam JM, Huet-Hudson YM. Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. *Reprod Toxicol* 11:703-708 (1997).

Hammond B, Katzenellebogen B.S, Krauthammer N, McConnell J. Estrogenic activity of the insecticide chlordecone and interaction with uterine estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci* 76:6641-6645 (1979).

Hardell L, Lindstrom G, Liljegren G, Dahl P, Magnuson A. Increased concentrations of octachlorodibenzo-p-dioxin in cases with breast cancer- results from a case-control study. *Eur J Cancer Prevention* 5:351-357 (1996).

Heath RG, Spann JW, Kreitzer JF. Marked DDE impairment of mallard reproduction in controlled studies. *Nature* 224:47-48 (1969).

Hein JF, McElroy WK. Effect of lindane of hormonal control of reproductive

BIBLIOGRAFÍA

function in the female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 99:384-394 (1989).

Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Huang HY y cols. Serum concentrations of organochlorine compounds and the subsequent development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Prev* 8:525-32 (1999).

Herbst A, Ulfelder H, Poskanzer D. Adenocarcinoma of de vagina. *N Engl J Med* 284:878-881 (1971).

Hertz R. The estrogen problem-retrospect and prospect . En: *Estrogens in the Environment II-Influences on development* (JA McLachlan, ed). New York: Elsevier/Horth Holland, 1985; 1-11.

Hickey JJ, Anderson DW. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science* 62:271-273 (1968).

Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer : role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinol* 103:1742-1751 (1978).

Hoyer AP, Grandjean P, Jorgensen T, Brock JW, Hartving HB. Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 352:1816-1820 (1998).

Hunter DJ, Hankinson SE, Laden F, y cols. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 337:1253-1258 (1997).

IARC. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol VII, N°143*, IARC, Lyon, France (1997).

Irvine DS. Falling sperm quality. *Br Med J* 309:476 (1994).

Jausons-Loffreda N, Gelmini N, Pazzagli N, y cols. Chimeric receptor genes as a tool for measuring biological activities of steroid hormones. *J Biol Chem* 49: 31-38 (1994).

Jin Lu, Borrás M, Lacroix Marc, Legros N, Leclercq G. Antiestrogenic activity of two 11 β -estradiol derivaties on MCF-7 breast cancer cells. *Steroids* 60: 512-518 (1995).

Jin L, Tran DQ, Ide CF, McLachlan JA, Arnold SF. Several synthetic chemicals inhibit progesterone receptor-mediated transactivation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 233:139-146 (1997).

Jobling S, Sumpter J. Detergent Components in Sewage Effluent are Weakly Oestrogenic to Fish: An in vitro Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicol* 27:361-372 (1993).

Jobling S, Reynolds T, White R, Parker M.G, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 103:582-587 (1995).

John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Study Group. Cryptorchidism: an apparent substantial increase since 1960. *Br Med J* 293:1401-1404 (1986).

Johnson DC, Sen M, Dey SK. Differential effects of dichloro diphenyl-trichloroethane analogs, chlordecone, and 3,3-7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on establishment of pregnancy in the hypophysectomized rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 199:42 (1992).

Johnson DC, Kogo H, Sen M, Dey SK. Multiple estrogenic action of o,p'-DDT: initiation and maintenance of pregnancy in the rat. *Toxicol* 53:79-87 (1988).

Jones KC, Bennett BG. Human exposure to environmental polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: an exposure commitment assessment for 2,3,7,8-TCDD. *Sci Total Environ* 78:99 (1989).

Kahn P, Gochfeld M, Nygren M y cols. Dioxins and dibenzofurans in blood and adipose of Agent Orange exposed Vietnam veterans and matched controls. *J Am Med Assoc* 259:1661-1667 (1988).

Kaldas RS, Hughes CL Jr. Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod Toxicol* 3:81-89 (1989).

Kalland T. Decreased and disproportionate T-cell population in adult mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Cell Immunol* 51:55-63 (1980).

Kalland T, Forsberg JG. Natural killer cell activity and tumor susceptibility in female mice treated neonatally with diethylstilbestrol. *Cancer Res* 41:5134-5140 (1981).

BIBLIOGRAFIA

Kalland T. Immunotoxicity of Diethylstilbestron in man. *Immunotoxicol Immunopharmacol* 40:407-413 (1985).

Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Earl Gray L, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375:581-585 (1995).

Kellie AE. The pharmacology of the estrogens. *Annu Rev Pharmacol* 11:97-112 (1971).

Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obst Gynecol* 87:897-904 (1996).

Kohlmeir L, Kohlmeir M. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ Health Perspect* 103:99-106 (1995).

Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA, McKinney JD. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol* 33:120 (1988).

Krauthacker B. Levels of organochlorine pesticides and PCBs in human milk and serum collected from lactating mothers in the Northern Adriatic area of Yugoslavia. *Bull Environ Contam Toxicol* 46:797-802 (1991).

Krauthacker B, Reiner E, Votava-Raic A, Tjesic-Drinkovic D, Batinic D. Organochlorine pesticides and PCBs in human milk collected from mothers nursing hospitalized children. *Chemosphere* 37:27-32 (1998).

Krieger N, Wolff M, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N. Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black and Asian women. *J Natl Cancer Inst* 86:589-599 (1994).

Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol* 132:2279-2286 (1993).

Kutz FW, Wood PH, Bottimore DP. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Rev Environ Contam Toxicol* 120:1 (1991).

Lamai SL, Warner GF, Walker CH. Effects of dieldrin on life stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Ecotoxicol Environ Saf* 42:22-29 (1999).

- La Vecchia C. Oral contraceptives and breast cancer. *The breast* 276:81 (1992).
- Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett* 130:209-216 (1998).
- Leclercq G, Heuson JC. Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochem Biophys Acta* 560:427-455 (1979).
- Lewis DFV, Parker MG, King RJB. Molecular modelling of the human estrogen receptor and ligand interactions based on site-directed mutagenesis and amino acid sequence homology. *J Steroid Biochem Molec Biol* 52:55-65 (1995).
- Lippman ME, Bolan . Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature* 256:592-593 (1975).
- Lippman ME, Huff KK, Jakesz R y cols. Estrogens regulate production of specific growth factors in hormone-dependent human breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 464:11-16 (1986).
- Lippman ME, Dickson RB, Gelmann EP, Rosen N, Knabee C, Bates S, Bronzert D, Huff K, Kasid A. Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J Cell Biochem* 35:1-16 (1987).
- Lobaccaro C, Pons JF, Duchesne MJ, Auzou G y cols. Steroidal affinity labels of the estrogen receptor 3. Estradiol 11 beta-n-alkyl derivatives bearing a terminal electrophilic group: antiestrogenic and cytotoxic properties. *J Med Chem* 40:2217-2227 (1997).
- Long GL, Winefordner JD. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 55:712-724 (1983).
- Longnecker MP, Rogan WJ, Lucier G. The human health effects of DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (Polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu Rev Public Health* 18:211-244 (1997).
- López-Carrillo L, Blair A, López-Cervantes M, y cols. Dichlorodiphenyltrichloroethane serum levels and breast cancer risk: a case-control study from México. *Cancer Res* 57:3728-3732 (1997).

BIBLIOGRAFIA

Lottering ML, Haag M., Seegers J. Effects of 17 β -estradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells. *Cancer Res* 52:5926-5932 (1992).

Luo XW, Foo SC, Ong HY. Serum DDT and DDE levels in Singapore general population. *Sci Total Environ* 208:97-104 (1997).

Luster MI, Hayes HT, Korach K, Tucker AN, Dean JH, Greenlee WF, Boorman. Estrogen immunosupresion is regulated through estrogenic responses in the thymus. *J Immunol* 133:110-116 (1984).

Luster MI, Boorman GA, Korach KS, Dieter MP, Hong L. Mechanisms of estrogen-induced myelotoxicity: Evidence of thymic regulation. *Int J Immunopharmac* 6:287-297 (1984).

Luster MI, PfeiferP, Tucker AN. The immunotoxicity of natural and enviromental estrogens. *Immunotoxicol Immunopharmacol* 50:315-326 (1985).

Luster MI, Rosenthal GJ. The immunosuppressive influence of indkustrial and environmental xenobiotics. *Trends Pharmacolo Sci* 7:408-412 (1986).

Macdougall D, Amore FJ, Cox GV, Crosby DG. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem* 52:2242-2249 (1980).

MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a reiew. *J Nat Cancer Inst* 50:21-42 (1973).

Maier-Bode H. Properties, effect residues and analytics of the insecticide endosulfan. *Residue Rev* 22:1-44 (1968).

Marshal E. Search for a killer: focus shifts from fat to hormones. *Science* 259: 618-621 (1993).

Miksicek RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:44-50 (1995).

Miller WR y Sharpe RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related cancer* 5:69-96 (1998).

Moysich KB, Ambrosone CB, Vena J y cols. Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* :181-188 (1998).

Murphy LC, Sutherland RL. Differential effects of tamoxifen and analogs with nonbasic side chains on cell proliferation in vitro. *Endocrinol* 116:1071-1078 (1985).

Murad F, Haynes R. Estrógenos y progestágenos. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (Goodman A, Goodman L, Rall T, Murad F, eds.) México: Médica Panamericana, 1986; 1340-1365.

Mussalo-Rauhamaa H, Hasanen E, Pysalo H, Antervo K, Kauppila R, Pantzar P. Occurrence of β -hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer* 66:2125-2128 (1990).

Needham L, Burse V, Head S y cols. Adipose tissue/serum partitioning of chlorinated hydrocarbon pesticides in humans. *Chemosphere* 20:975-980 (1990).

Netsaretnam K, Corcoran D, Dils RR, Darbre P. 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Molec Endocrinol* 10:923-936 (1996).

Nieto Serrano Rafael. La oncoproteína p53 en cáncer de mama valor pronóstico Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1998).

Nimrod AC, Benson WH. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 27:335-364 (1996).

Noller KL, Blair PB, O'Brien PC, Melton LJ, Offord JR, Kaufman RH, Colton T. Increased occurrence of autoimmune disease among women exposed in utero to diethylstilbestrol. *Fertil Steril* 49:1080-1082 (1988).

Okond'Ahoka O, Lavour E, Le Sech J, Phu Lich N, Le Moan G. Etude de l'impregnation humaine par les pesticides organo-halogenes au Zaïre. *Ann Fals Exp Chim* 77:531-540 (1984).

Olaya-Contreras P, Rodriguez-Villamil J, Posso-Valencia HJ, Cortez JE. Organochlorine exposure and breast cancer risk in Colombian women. *Cad Saude Publica* 14 :25-32 (1998).

Olea N, Molina MJ, Garcia-Martin M, y cols. Modern agricultural practices: The human price. *Comments Toxicol* 5:455-474 (1995).

Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35 (1993).

Pons M, Gagne D, Nicolas JC, Methali M. A new cellular model of response to estrogens to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. *Biotechniques* 9:450-459 (1990).

Pulgar Encinas R. Composites y selladores dentales: Análisis cromatográfico y demostración de actividad estrogénica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1996).

Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pérez P, Olea N. Determination of bisphenol-A and oligomers in dental epoxy resins by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* (In press).

Pujol P, Hilsenbeck SG, Elledge RM. Rising levels of estrogen-receptor in breast cancer over 2 decades. *Cancer* 74:1601-1606 (1994).

Ramamoorthy K, Wang F, Chen I-C y cols. Potency of combined estrogenic pesticides. *Science* 275:405-406 (1997).

Reid EE, Wilson E. The relation of estrogenic activity to structure in some 4,4'-dihydroxy diphenylmethanes. *J Am Chem Soc* 66:967-968 (1944).

Ren L, Lattier D, Lech JJ. Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new cDNA probe for vitellogenesis, pSG5gl.1. *Bull Environ Contam Toxicol* 52:287-294 (1996).

Rhainds M, Levallois P, Dewailly E, Ayotte P. Lead, mercury, and organochlorine compound levels in cord blood in Quebec, Canada. *Arch Environ Health* 54:40-47 (1999).

Rivas A, Olea N, Olea-Serrano MF. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *TRAC* 16:613-619 (1997).

Routledge EJ, Sumter JP. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with oestrogenic activity. *J Biol Chem* 272:3280-3288 (1997).

BIBLIOGRAFÍA

Olea N, Pulgar R, Pérez P, y cols. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104:298-305 (1996).

Olea N, Olea-Serrano MF. Oestrogens and the environment. *Eur J Cancer Prevention*. 5:491-496 (1996).

Olea N, Pulgar R, Perez P y cols. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspec.* 104:233-240 (1996).

Olea N, Rivas A, Olea-Serrano MF, Molina MJ. Exposición humana a disruptores en el medio agrícola En: *Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos* (Morell I, Candela L, eds). Publicaciones de la Universidad Jaime I, Castellón de la plana, 1998;355-372.

Olea N, Olea-Serrano F, Lardelli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol Ind Health* 15:151-158 (1999).

Ousterhout J, Struck RF, Nelson JA. Estrogenic activities of methoxychlor metabolites. *B Pharmacol* 30:2869-2871 (1981).

Palmund I, Apfel R, Buitendijk S, Cabau A, Forsberg J. Effects of Diethylstilbestrol (DES) Medication During Pregnancy: Report From a Symposium at the 10th International Congress of ISPOG. *J Psychoso Obst Gynecol* 14:71-89 (1993).

Paumgarten FJ, Delgado IF, Oliveira ES, Alleluia IB, Barretto HH, Kussumi TA. Levels of organochlorine pesticides in the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 14:33-39 (1998).

Pazos P, Perez P, Rivas A, Nieto R, Botella B, Crespo J, Olea-Serrano F, Fernandez MF, Exposito J, Olea N, Pedraza V. Development of a marker of estrogenic exposure in breast cancer patients. *Adv Exp Med Biol* 444:29-40 (1998).

Pérez Gómez P. Identificación y caracterización de productos químicos con actividad estrogénica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1996).

Perez P, Pulgar P, Olea-Serrano F y cols. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 106:167-174 (1998).

BIBLIOGRAFIA

Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some Alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 153 :12-19 (1998).

Saady JJ, Poklis A. Determination of chlorinated hydrocarbon pesticides by solid-phase extraction and capillary GC with electron capture detection. *J Anal Toxicol* 14:301-304 (1990).

Safe S, Astroff B, Harris MT, Zacharewsky T, Dickerson R, Romkes M, Biegel L. 2,3,7,8-Tetra-chlorodibenzo-p-dioxin(TCDDD) and related compounds as antiestrogens: characterization and mechanism of action. *Pharmacol Toxicol* 69:400-409 (1991).

Saleh M, Kamel A, Ragab A, El-Baroty G, El-Sebae AK. Regional distribution of organochlorine insecticide residues in human milk from Egypt. *J Environ Sci Health B* 31:241-255 (1996).

Saxena MC, Siddiqui MKJ, Bhargava AK, Murti CRK, Kutty D. Placental transfer of pesticides in human. *Arch Toxicol* 48:127-134 (1981).

Schade G, Heinzow B. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *Sci Total Environ* 215:31-39 (1998).

Schutze N, Vollmer G, Tiemann I, Geiger M, Knuppen R. Catecholestrogens are MCF-7 cell estrogen agonists. *J Steroid Biochem Molec Biol* 46:781-789 (1993).

Setchell KDR Naturally occurring non-steroidal estrogens of dietary origin. In *Estrogen in the Environment* (J McLachlan ed). Amsterdam: Elsevier, 1985; 73-106.

Setchell KDR: Non-steroidal estrogens of dietary origin: possible roles in health and disease, metabolism and physiological effects. *Proc Nutr Soc N Zeal* 20:1-21 (1995).

Shannon L, Tessari J, Winn D, Keefe T, Nett T, Zheng T. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J Toxicol Environ Health* 52:285-293 (1997).

Sharpe RM, Skakkebaek N. Are oestrogens involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract?. *Lancet* 341:392-1395 (1993).

Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect* 103:1136-1143 (1995).

Shekhar PV, Werdell J, Basrur VS. Environmental estrogen stimulation of growth and estrogen receptor function in preneoplastic and cancerous human breast cell lines. *J Natl Cancer Inst* 89:1774-1782 (1997).

Short P, Colborn T. Pesticide use in the U.S. and policy implications: A focus on herbicides. *Toxicol Ind Health* 15:240-275 (1999).

Siberthorn E, Glauert H, Robertson L. Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. *Crit Rev Toxicol* 20:440-496 (1990).

Sim M, McNeil J. Monitoring chemical exposure using breast milk: A methodological review. *Am J Epidemiol* 136:1-11 (1992).

Singer. PL Occupational oligospermia (Letter) *JAMA* 140:1249 (1949).

Singh AK, Spassova D, White T. Quantitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polynitrohydrocarbons in spiked samples of soil, water and plasma by selected-ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 706:231-244 (1998).

Skakkebaek NE, Keiding N. Changes in semen and the testis. *Br Med J* 309:1316-1317 (1994).

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112 (1990).

Sloth Weidner I, Moller H, Kold Jensen T, Skakkebaek N. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 106:793-796 (1998).

Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158:327-39 (1998).

BIBLIOGRAFÍA

Sonnenschein C, Soto AM, Fernández MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-López MD. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem* 41:1888-1895 (1995).

Soto A, Sonnenschein C. The role of estrogen on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem* 23:87-94 (1985).

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* 92:167-173 (1991).

Soto A, Lin T.M, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN). In: *Chemically induced alterations in sexual and functional development; the wildlife/human connection*. (Colborn T, Clement C, eds). Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, 1992; 295-309.

Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102:380-383 (1994).

Soto A, Chung K, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102:380-383 (1994).

Soto A, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea F. The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An update on Estrogenic Environmental Pollutants *Environ Health Perspect* 103:113-122 (1995).

Soto AM, Fernández MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C. Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 105:647-663 (1997).

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M.J. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1400-1413 (1973).

Spitz MR, Sieder JG, Pollack ES, Lynch HK, Newell GR. Incidence and descriptive features of testicular cancer among United States whites, blacks and hispanics, 1973-1982. *Cancer* 58:1785-1790 (1986)

Steinberg K, Thacker SB, Smith J, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD, Berkelman RL. A meta-analysis of the effects of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *J. Am. Med Assoc* 265:1985-1990 (1991).

Stellman SD, Djordjevic MV, Muscat JE, Gong L, Bernstein D, Citron ML, White A, Kemeny M, Busch E, Nafziger AN. Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:489-496 (1998).

Stresser DM, Kupfer D. Human cytochrome P450-catalyzed conversion of the proestrogenic pesticide methoxychlor into an estrogen. Role of CYP2C19 and CYP1A2 in O-demethylation. *Drug Metab Dispos* 26:868-874 (1998).

Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103:173-178 (1995).

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 105:1228-1232 (1997).

Szafran H, Smielak-Korombel W. The role of estrogens in hormonal regulation of lipid metabolism in women. *Przegl Lek* 55:266-70 (1998).

Takasugi N, Bern H. Tissue Changes in Mice with Persistent Vaginal Cornification Induced by Early Postnatal Treatment with Estrogen. *J Natl Cancer Inst* 33:855-65 (1964).

Taylor JR, Selhorst JB, Houff SA, Martinez AJ. Chlordecone intoxication in man. Clinical observations. *Neurol* 28:626-635 (1978).

Tite M, Wassermann M y cols. Teneurs en insecticides organochlorés et diphényles polychlorés chez la population générale du Zaïre. *J Toxicol Med* 4:259-263 (1982).

Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquote A, Bannerjee S, Koenig KL, Shore RE. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87:190-197 (1995).

Toppari J, Larsen JC, Christiansen P y cols. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104:741-803 (1996).

BIBLIOGRAFÍA

Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 5:635-648 (1972).

Unger M, Kiaer H, Blichert-Toft M, Olsen J, Clausen J. Organochlorine compounds in human breast fat from decreased with and without breast cancer and in a biopsy material from newly diagnosed patients undergoing breast surgery. *Environ Res* 34:24-28 (1984).

Valenzuela Sanchez B. Determinación del efecto estrogénico de plaguicidas organoclorados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1996).

Van Waelegheem K, De Clercq N, Vermeulen Lschoonjans F, Comhaire F. Deterioration of sperm quality young healthy belgian men. *Hum Reprod* 11:325-329 (1996).

van't Veer P, Lobbezoo IE, Martín-Moreno JM y cols. DDT (dicophane) and postmenopausal breast cancer in Europe: case-control study. *BMJ* 315:81-85 (1997).

Verna SP, Goldin BR, Lin PS. The inhibition of estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspec* 106:807-812 (1998).

Vermeulen A y Verdonck L. Sex hormone concentrations in postmenopausal women. Relation to obesity, fat mass, age and years postmenopause. *Clinical Endocrinol* 9:59-66 (1978).

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea MF, Ruiz de Almodóvar JM, Pedraza V. The E-SCREEN assay: Comparison among different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspec* 103:844-850 (1995).

Vom Saal FS, Nagel SC, Palanza P, Boechler M, Parmigiani S, Welshons WV. Estrogenics pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicol Lett* 77:343-350 (1995).

Vonier PM, Crain DA, McLachlan JA, Guillette LJ, Arnold SF. Interactions of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect* 104:1318-1322 (1996).

Voogt P, Beer K, van der Wielen F. Determination of alkylphenol

ethoxylates in industrial and environmental samples. *TRAC* 16:584-595 (1997).

Vorherr H, Messer RH, Vorherr UF, Jordan SW, Kornfeld M. Teratogenesis and carcinogenesis in rat offspring after transplacental and transmammary exposure to diethylstilbestrol. *Biochem Pharmacol* 28:1865-1877 (1979).

Wassermann M, Nogueira D, Tomatis L y cols. Organochlorine compounds in neoplastic and adjacent apparently normal breast tissue. *Bull Environ Contam Toxicol* 15:478-484 (1976).

Weistrand C, Norén Koidu. Methylsulfonyl metabolites of PCBS and DDE in human tissues. *Environ Health Perspect* 105:644-649 (1997).

Welch R, Levin W, Conney A. Estrogenic action of DDT and its analogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 101:310-318 (1969).

White E. Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delaying childbearing. *Am J Pub Health* 77:495-497 (1987).

White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol* 135:175-181 (1994).

WHO. Congenital malformations worldwide: A report from the International Clearinghouse for Birth Defects monitoring systems. Oxford: Elsevier (1991).

WHO. The World Health Report, Geneva: WHO. (1997).

Wilkinson TJ, Colls BM, Schluter PJ. Increased incidence of germ cell testicular cancer in New Zealand Maoris. *Br J Cancer* 65:769-771 (1992).

Williams J, Eckols K, Uphouse L. Estradiol and chlordecone interactions with the estradiol receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 98:413 (1989).

Williams DT, Lebel GL. Coplanar polychlorinated biphenyl residues in human adipose tissue samples from ontario municipalities. *Chemosphere* 22:1019-1028 (1991).

Willet LB, Odonnell AF, Durst HI, Kurz MM. Mechanisms of movement of organochlorine pesticides from soils to cows via forages. *J dairy Sci* 76:1635-1644 (1993).

BIBLIOGRAFÍA

Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect* 105:102-107 (1997).

Witiak DT, Duane M. Colesterol, adrenocorticoides y hormonas sexuales. En: *Principios de Química Farmacéutica*, (Foye ed). Barcelona: Reverte, 1991; 519-586.

Wolff M.S, Rivera M, Baker DB. Detection limits of organochlorine pesticides and related compound in blood serum. *Bull Environ Contam. Toxicol* 47: 499-503 (1991).

Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:648-652 (1993).

Wolff MS, Toniolo PG. Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer. *Environ Health Perspect* 103:141-145 (1995).

Woodruff T, Wolff MS, Davis DL, Hayward D. Organochlorine exposure estimation in the study of cancer etiology. *Environ Res* 65:132-144 (1994).

Woodward A, Percival H, Jennings M, Moore C. Low Clutch Viability of American Alligators of Lake Apopka. *Florida Science* 56:52-63 (1993).

Yokotsuka T. Soy sauce biochemistry. *Adv Food Res* 30:195-329 (1986).

Zacharewski T, Berhane K, Gillesby B, Burnison K. Detection of estrogen and dioxin-like activity in pulp and paper mill black liquor effluent using in vitro recombinant receptor/reporter gene assays. *Environ Sci Tech* 29:2140-2146 (1995).

Zava DT, Blen M, Duwe G. Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ Health Perspect* 105:637-645 (1997).

ABREVIATURAS EMPLEADAS

- A₁: Área del producto
A₀: Área del patrón interno
BADGE: Diglicidil éter de Bisfenol A
BFA: Bisfenol A
BisGMA: Dimetacrilato del diglicidil éter de Bisfenol A
BisDMA: Metacrilato de Bisfenol A
CDHuS: Suero humano tratado con carbón dextrano
CG/DCE: Cromatografía de gases/ Detector de captura de electrones
CV: Coeficiente de variación
Desv estándar (σ): Desviación estándar
DES: Dietilestilbestrol
DME: Medio de cultivo Dulbecco mínimo esencial
DME-RF: Medio de cultivo Dulbecco mínimo esencial sin rojo fenol
D.O.: Densidad óptica
E₂: Estradiol-17 β
EDCs: Disruptores endocrinos
Eeq: Equivalente estradiol
EEM: Error estándar
Endo-éter: Endosulfán-éter
Endo-lactona: Endosulfán-lactona
Endo-diol: Endosulfán-diol
Endo I: Endosulfán I
Endo II: Endosulfán II
Endo-sulfato: Endosulfán-sulfato
EPR: Eficacia proliferativa relativa
ER: Error relativo
ERE: Elemento de respuesta estrogénica
F: Factor de respuesta
FBS: Suero bovino fetal

Fig: Figura

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HuS: Suero Humano

IC: Intervalo de confianza

Min: Minuto

MM1: 4,4'-etilidendifenol

MM2: 1,1-bis(4-hidroxifenil)propano

MM3: 2,2-bis(4-hidroxifenil)butano

MM4: 3,3-bis(4-hidroxifenil)pentano

MM5: 4,4-bis(4-hidroxifenil)heptano

MM6: 2,2-bis(4-o-metilhidroxifenil)propano

MM7: 2,2-bis(4-hidroxifenil)1,1,1,3,3,3-hexafluoropropano

MM8: 4-hidroxifenilcetona

MM9: 2,2-bis(4-hidroxifenil)propanol.

OR: Odds ratio

PI: Patrón interno

PPR: Potencia proliferativa relativa

RBA: Relative binding affinity

RE: Receptor estrogénico

RU: RU 58668

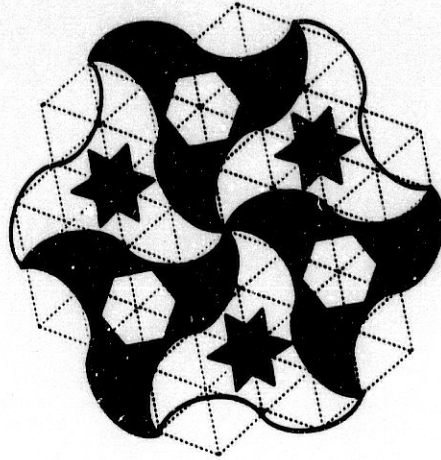
SRB: Sulforrodamina

TR: Tiempo de retención

UV: Detector ultravioleta

X: Media

ANEXO I



Xenobióticos de carácter estrogénico

CUESTIONARIO

Identificación

Fecha de realización de la encuesta

NO RELLENAR.

Tipo

Hora de inicio de la encuesta _____

(Todos los datos que se recogen en esta encuesta son confidenciales y sólo serán utilizados para la realización del Estudio)

HOJA DE NO RESPUESTA

Dirigido a los **CASOS y CONTROLES** que por diversos motivos no han deseado participar en el estudio.

¿Ha sido previamente informada del estudio? 1 2
Si No

Nombre _____

1er Apellido _____

2º Apellido _____

Fecha de Nacimiento

Municipio de Residencia _____

Nº de años que lleva viviendo

Dirección _____

Teléfono _____

Estado civil

Soltera 1 Casada 2 Viuda, separada 3 Otros 4 NS/NC 0

Nivel de escolaridad alcanzado

No sabe leer/escribir 1 Sabe leer/escribir 2 Grdo. Esc./Est. Prim. 3
 Bachiller Elemental 4 Bachiller Superios/FP 5 Titulado Medio 6
 Titulado Superior 7 NS/NC 0

Ocupación actual _____

Motivo de no participación

No quiere 1 Defunción durante la intervencion 2 Otros 3 NS/NC 0

 ¿Ha sido previamente informada del estudio? 1 2
(en caso negativo o duda, informarle del mismo) Si No

CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS

1 Dirección: _____

2 Teléfono: _____

3 Nombre _____

4 1º. Apellido _____

5 2º Apellido _____

6 ¿Me puede decir la fecha de nacimiento?

7 ¿Cuál fué su municipio de nacimiento? _____

8 ¿Cuántos años ha vivido en...?

9 Este municipio está en el ámbito: Rural 1 Urbano 2

10 Según acaba de decirme su municipio de residencia actual es: _____

11 ¿Cuántos años lleva viviendo en este municipio?

12 Este municipio está en el ámbito: Rural 1 Urbano 2

13 ¿Ha vivido en algún otro municipio? 1 2
(si más de uno, elegir aquel en el que más años ha vivido) Si No

Especificar aquel en el que más años ha vivido, en el caso de haberlo hecho en más de uno:

13
 (14-27)
 (28-44)
 (45-62)
 68
 73
 74 75
 (76-115)
 (116-124)
 125
 126
 127 128
 129
 13

 (14-52)
 (53-61)
 (62-75)
 (76-93)
 (94-111)
 117
 122
 123 124
 125
 130
 131 132
 133
 134

- 14 ¿Cuántos años ha vivido en este municipio?
- 15 Este municipio está en el ámbito: Rural Urbano
- 16 ¿Cuál es su estado civil?
 Soltera Casada Viuda, separada Otros NS/NC
- 17 ¿Cuál es el nivel de escolaridad que ha alcanzado? (elegir estudios terminados)
 No sabe leer/escribir Sabe leer/escribir Graduado escolar
 Bachiller elemental Bachiller superior/FP Titulado Medio
 Titulado Superiores NS/NC
- 18 ¿Cuál es su actividad actual?
 Activa econ. (trabaja) Desempleada/parada Pensionista
 Jubilada Estudiante Ama de casa
 Otros NS/NC
- 19 ¿Cuál es su ocupación actual?

¿Ha desempeñado a lo largo de su vida, alguna de estas ocupaciones?

- 20 Agricultura Si No NS/NC
- 21 En caso afirmativo, bajo plástico: Si No

A todos los que en la pregunta n° 20 han contestado SI

- 22 ¿Ha aplicado de forma continuada insecticidas? Si No NS/NC
- 23 En caso afirmativo, en la pregunta 22, ¿qué n° de años?
 (si es menos de un año anotar 00)

¿Ha desempeñado a lo largo de su vida, alguna de estas ocupaciones?

- 24 En industria nuclear: Si No NS/NC
- 25 En caso afirmativo, pregunta 24, n° de años:
 (si es menos de un año anotar 00)
- 26 En el campo sanitario: (radiología, odontología) Si No NS/NC
- 27 En caso afirmativo, pregunta 26, n° de años
 (si es menos de un año anotar 00)
- 28 Peluquería, esteticien: Si No NS/NC
- 29 En caso afirmativo, pregunta 28, n° de años
 (si es menos de un año anotar 00)
- 30 En industria textil, sección tintes: Si No NS/NC
- 31 En caso afirmativo, pregunta 30, n° de años
 (si es menos de un año anotar 00)

HISTORIA REPRODUCTIVA

- 32 ¿Recuerda a que edad tuvo la primera regla?
 (NS/NC = 00)
- 33 ¿Tiene o ha tenido en los dos últimos meses la regla? Si No
- 34 Solo si 33 es si. ¿Cuándo tuvo la última regla?
 (el día que le bajó la regla NS/NC = 000000)
- 35 ¿Ha tenido alguna regla en los últimos 12 meses? Si No
- 36 En caso afirmativo, ¿Cuántas?

- 135 136
- 137
- 138
- 139
- 140
- 141 142
- 143
- 144
- 145
- 146 147
- 148
- 149 150
- 151
- 152 153
- 154
- 155 156
- 157
- 158 159
- 160 161
- 162
- 163 168
- 169
- 170 171

- 37 En caso negativo, ¿qué edad tenía cuando dejó de tener la regla?
(NS/NC = 00)
- 38 ¿Cómo considera que ha sido su regla entre los 20-40 años?
Irregular (a veces corta, a veces larga) 1 Regular (cada 21 días o menos) 2
Regular (cada 22-29 días) 3 Regular (cada 30 días o más) 4 NS/NC 0
- 39 ¿Ha estado embarazada alguna vez? 1 2 0
Si No NS/NC
- 40 ¿Ha tenido algún hijo nacido vivo? 1 2
Si No
- 41 En caso afirmativo, ¿cuántos hijos nacidos vivos ha tenido?
- 42 ¿A qué edad tuvo el primero?
- 43 ¿A qué edad tuvo el último?
- Sólo para las que han tenido hijos nacidos vivos**
- 44 ¿Ha dado a alguno de sus hijos lactancia materna? 1 2
Si No
- 45 ¿Número total de meses que ha dado lactancia materna:
(sumar número de meses que haya dado a cada hijo)
- 46 ¿Ha tenido algún hijo muerto? 1 2
Si No
- 47 En caso afirmativo ¿Cuántos hijos nacidos muertos ha tenido?
- 48 ¿A qué edad los tuvo?
(Si hay más de dos, anotar el primero y el último)
- 49 ¿Ha tenido algún aborto espontáneo o interrupción del embarazo? 1 2
Si No
- 50 En caso afirmativo, ¿Cuántos abortos ha tenido?
- 51 ¿A qué edad los tuvo?
(Si hay más de dos, anotar el primero y el último)

INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS

- 52 ¿Le han quitado la matriz? 1 2 0
Si No NS/NC
- 53 En caso afirmativo, ¿a qué edad?
- 54 ¿Le han quitado uno o ambos ovarios? 1 2 0
Si No NS/NC
- 55 En caso afirmativo, ¿a qué edad?

ANTICONCEPTIVOS Y TERAPIA HORMONAL

- 56 ¿Ha utilizado anticonceptivos orales? 1 2 0
Si No NS/NC
- 57 En el caso de haber utilizado, ¿a qué edad comenzó a utilizarlos?
- 58 ¿Durante cuánto tiempo (en años) los ha utilizado?
(Si ha sido por periodos, sumar todos ellos)
- 59 ¿Ha utilizado algún otro tipo de anticonceptivo hormonal no oral?
 1 2 0
Si No NS/NC
- 60 En caso afirmativo, ¿cuál ha utilizado?
(si dos o más, elegir el más frecuente) _____
- 61 ¿Durante cuántos años ha utilizado ese mismo?

172 173

174
175
176
177 178
179 180
181 182

183
184 185
186
187 188
189 190
191 192
193
194 195
196 197
198 199

200
201 202
203
204 205

206
207 208
209 210

211
212
213 214

TRATAMIENTO SUSTITUTIVO CON HORMONAS

Sólo a las mujeres que en la pregunta n° 35 (mujeres que no tienen regla), han respondido NO

62 ¿Ha tomado y/o toma hormonas (estrógenos y/o progesterona) para el tratamiento de la menopausia? 1 Sí 2 No 0 NS/NC

215

63 ¿A qué edad comenzó a tomarlas?

216 217

64 ¿Durante cuánto tiempo los ha tomado? (en meses)

218 219

65 ¿Qué tipo de hormonas toma?
Vía oral 1 Vía intramuscular 2 Cremas 3 NS/NC 0

220

221

Nombre _____

ASPECTOS RELACIONADOS CON LA NUTRICIÓN

66 ¿Podría decirnos cuánto mide (en cm.)?

222 224

67 ¿Podría decirnos cuánto pesa (en kg.)?

225 227

68 ¿Cómo considera su peso actual, comparándolo con el de hace 25 años?

Más bajo 1 Un poco más bajo 2 Parecido 3
Un poco más alto 4 Más alto 5 NS/NC 0

228

69 ¿Con qué frecuencia come pescado y marisco, incluyendo pescado congelado?

Nunca 1 Menos de 1 vez por semana 2 Una vez por semana 3
Dos veces por semana 4 Más de 2 veces por semana 5 NS/NC 0

229

70 ¿Qué tipo de pescado consume más frecuentemente?

Pescado azul (sardinas, jurel, salmonete, boquerón...) 1
Pescado blanco (pescadilla,...) 2
Indistintamente 3
NS/NC 0

230

71 ¿Con qué frecuencia consume leche y productos lácteos (no queso)?

Nunca 1
Dos veces por semana o menos 2
Más de dos veces por semana, pero no todos los días 3
Todos los días 4
NS/NC 0

231

72 ¿Qué contenido de grasa tiene?

Bajo (desnatada) 1 Medio (semidesnatada) 2
Alto (entera) 3 NS/NC 0

232

73 ¿Con qué frecuencia come queso?

Nunca 1 Dos veces por semana o menos 2
Más de dos veces por semana 3 Todos los días 4 NS/NC 0

233

74 ¿Qué tipo de queso consume más frecuentemente?

Fresco 1 Curado o semicurado 2
Indistintamente 3 NS/NC 0

234

75 ¿Con qué frecuencia come carne?

Nunca 1 Menos de una vez por semana 2 Una vez por semana 3
Dos veces por semana 4 Más de dos veces por semana 5 NS/NC 0

235

76 ¿Qué tipo de carne consume más frecuentemente?

Cerdo 1 Vacuno/ovino/pollo/conejo 2
Indistintamente 3 NS/NC 0

236

77 ¿Con qué grasa cocina habitualmente?

Aceite de oliva 1 Otros aceites vegetales 2
Indistintamente 3 Grasa animal 4 NS/NC 0

237

78 ¿Con qué frecuencia come verduras?

Nunca 1 Menos de una vez por semana 2 Una vez por semana 3
Dos veces por semana 4 Más de dos veces por semana 5 NS/NC 0

238

79 ¿Con qué frecuencia come ensaladas?

Nunca 1 Menos de una vez por semana 2 Una vez por semana 3
Dos veces por semana 4 Más de dos veces por semana 5 NS/NC 0

239

80 ¿Con qué frecuencia come frutas?

Nunca 1 Menos de una vez por semana 2 Una vez por semana 3
Dos veces por semana 4 Más de dos veces por semana 5 NS/NC 0

240

81 ¿Con qué frecuencia come huevos? (fritos, en tortilla, cocidos,...)

Nunca 1 Menos de una vez por semana 2 Una vez por semana 3
Dos veces por semana 4 Más de dos veces por semana 5 NS/NC 0

241

82 ¿Qué desayuna Vd. habitualmente?

242

83 ¿Ha variado su dieta considerablemente en los últimos 12 meses? 1 2 0
SI No NS/NC

243

En caso afirmativo, indicar en qué medida:

244

CONSUMO DE FARMACOS

84 ¿Ha consumido medicamentos (aparte de los declarados),
vitaminas o minerales en los 7 días anteriores al ingreso? 1 2 0
SI No NS/NC

245

85 En caso afirmativo, indicar cuáles, (máximo 3)

246

247

248

HABITOS DE VIDA

Consumo de Tabaco

86 ¿Fuma Vd. habitualmente?

Sí, fumo de forma habitual 1
No fumo, pero antes lo hacía de forma habitual 2
No fumo ni he fumado antes (pasar a la siguiente sección) 3
NS/NC 0

249

87 ¿A qué edad aproximada comenzó a fumar de forma habitual?

250 251

Solo a los Ex-fumadores

88 ¿A qué edad dejó Vd. de fumar?

252 253

A los fumadores habituales y ex-fumadores

89 ¿Cuántos cigarrillos fuma/fumaba diariamente?

254 255

Consumo de bebidas que contienen Alcohol

90 En la actualidad ¿consume Vd. habitualmente (al menos una vez por semana) bebidas
que contienen alcohol, como vino, cerveza, etc.?

Nunca 1 Ocasional (celebraciones) 2 Bebedor habitual 3
Antes bebía, ahora no 4 NS/NC 0

256

91 Sólo a las mujeres que en la pregunta 90 han respondido 3 ó 4
¿A qué edad comenzó a beber?

257 258

92 Sólo a las mujeres que en la pregunta 90 han respondido "antes bebía".
A qué edad dejó de beber

259 260

93 A aquellas que en la pregunta n°90 han contestado 3 ó 4

¿Cuántos vasos de vino consume?

Lunes a El fin
Viernes de semana

261 262

¿Cuántas cervezas consume?

263 264

¿Cuántas copas (coñac, ginebra, anís,...) consume?

265 266

¿Consumes Vd. alguna otra bebida que contenga alcohol?
En caso afirmativo, ¿cuántos vasos/copas?

267 268

¿Cuáles? _____

269 270

HISTORIA FAMILIAR

94 ¿Me podría decir cuántas hermanas ha tenido?

271 272

95 ¿Alguien de su familia ha sido diagnosticada de un tumor benigno de mama?

1 Sí 2 No 0 NS/NC

273

96 ¿Alguien de la familia ha sido diagnosticada de cáncer de mama?

1 Sí 2 No 0 NS/NC

274

97 En caso afirmativo, ¿quién y cuándo fué diagnosticada?

275

Madre 1 ¿Cuántos años tenía
Hermana 1 2 cuando se le diagnosticó?
Hermana 2 3

276 277

278

279 280

Hora de finalización de la encuesta: _____

OBSERVACIONES _____

Información que deberá recogerse de las HISTORIAS CLÍNICAS

Identificación

281 284

1er Apellido _____

2º Apellido _____

285

Nombre _____

Servicio donde está ingresada

Cirugía General 1 Cirugía Digestiva 2 Cirugía Vascular 3
Cirugía Mama 4 Traumatología 5 Otros 6

286

Nº de Historia

287 292

Diagnóstico principal

293 295

En todos los CASOS deberá además recogerse:

Tipo Histológico _____

296

Estado del tumor I II III IV V
(No consta)

297

Medicamentos consumidos durante la hospitalización

298

299

300

Observaciones :

Información que deberá recogerse de las HISTORIAS CLÍNICAS

Identificación

281

284

285

1er Apellido _____

2º Apellido _____

Nombre _____

Servicio donde está ingresada

- Cirugía General
- Cirugía Digestiva
- Cirugía Vascular
- Cirugía Mama
- Traumatología
- Otros

286

Nº de Historia

287

292

Diagnóstico principal

293

295

En todos los CASOS deberá además recogerse:

Tipo Histológico _____

296

Estadío del tumor

- I
- II
- III
- IV
- V (no consta)

297

Medicamentos consumidos durante la hospitalización

298

299

300