



DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

“Estudio de las relaciones entre pesticidas organoclorados, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes no enzimáticos presentes en leche humana”

Antonio E. Jerez Calero
Granada, 1 de Septiembre de 2003

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Antonio E. Jerez Calero
D.L.: GR 4513-2011
ISBN: 978-84-694-6020-7

INDICE GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL

CERTIFICACIONES

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

RESUMEN

INDICE

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

Certificaciones



**CRISTINA CAMPOY FOLGOSO,
PROFESORA TITULAR DE PEDIATRIA.
FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA QUE:

ANTONIO E. JEREZ CALERO, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, ha realizado el Programa de Doctorado de Pediatría y Puericultura correspondiente a los estudios universitarios de tercer ciclo, y el Proyecto de Investigación para la confección de su Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Estudio de las relaciones entre pesticidas organoclorados, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes no enzimáticos presentes en leche humana”, bajo mi tutela y dirección, para optar al grado de DOCTOR EN MEDICINA por esta Universidad. Completado el Programa de Doctorado y finalizado el Proyecto de Investigación, estoy conforme en que se lleve a cabo la presentación, lectura y defensa de este trabajo de investigación ante el Tribunal que le sea asignado.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente certificado en Granada a 1 de Septiembre de 2003.

Fdo. Cristina Campoy Folgoso
Prof. Titular de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Granada



**M^a FATIMA OLEA SERRANO,
CATEDRÁTICA DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA QUE:

ANTONIO E. JEREZ CALERO, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, ha realizado el Programa de Doctorado de Pediatría y Puericultura correspondiente a los estudios universitarios de tercer ciclo, y el Proyecto de Investigación para la confección de su Memoria de Tesis Doctoral titulada: *“Estudio de las relaciones entre pesticidas organoclorados, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes no enzimáticos presentes en leche humana”*, bajo mi tutela y dirección, para optar al grado de DOCTOR EN MEDICINA por esta Universidad. Completado el Programa de Doctorado y finalizado el Proyecto de Investigación, estoy conforme en que se lleve a cabo la presentación, lectura y defensa de este trabajo de investigación ante el Tribunal que le sea asignado.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente certificado en Granada a 1 de Septiembre de 2003.

Fdo. M^a Fátima Olea Serrano
Catedrática de Nutrición y Bromatología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada



**MARGARITA JIMÉNEZ TORRES,
DOCTORA EN FARMACIA E INVESTIGADORA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA QUE:

ANTONIO E. JEREZ CALERO, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, ha realizado el Programa de Doctorado de Pediatría y Puericultura correspondiente a los estudios universitarios de tercer ciclo, y el Proyecto de Investigación para la confección de su Memoria de Tesis Doctoral titulada: *“Estudio de las relaciones entre pesticidas organoclorados, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes no enzimáticos presentes en leche humana”*, bajo mi tutela y dirección, para optar al grado de DOCTOR EN MEDICINA por esta Universidad. Completado el Programa de Doctorado y finalizado el Proyecto de Investigación, estoy conforme en que se lleve a cabo la presentación, lectura y defensa de este trabajo de investigación ante el Tribunal que le sea asignado.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente certificado en Granada a 1 de Septiembre de 2003.

Fdo. Margarita Jiménez Torres
Dra. en Farmacia
Investigadora del Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Granada



**JUAN ANTONIO MOLINA FONT
CATEDRÁTICO DE PEDIATRÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA QUE:

ANTONIO E. JEREZ CALERO, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, ha realizado el Programa de Doctorado de Pediatría y Puericultura correspondiente a los estudios universitarios de tercer ciclo, y el Proyecto de Investigación para la confección de su Memoria de Tesis Doctoral titulada: *“Estudio de las relaciones entre pesticidas organoclorados, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes no enzimáticos presentes en leche humana”*, bajo mi tutela y dirección, para optar al grado de DOCTOR EN MEDICINA por esta Universidad. Completado el Programa de Doctorado y finalizado el Proyecto de Investigación, estoy conforme en que se lleve a cabo la presentación, lectura y defensa de este trabajo de investigación ante el Tribunal que le sea asignado.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente certificado en Granada a 1 de Septiembre de 2003.

Fdo. Profesor Juan Antonio Molina Font
Director del Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

Esta Tesis ha sido realizada con fondos de los Proyectos:

- “Búsqueda de una nueva fórmula adaptada para el recién nacido”. Fundación Empresa-Universidad de Granada. Fundación Boch y Gimpera y Laboratorios Ordesa, S.L. Proyecto CDTI, nº 293/96, realizado durante los años 1996 a 1998.
- “Determinación de la carga estrogénica en cáncer de mama mediante ensayos biológicos E-Screen/modificado y MVLN-luciferasa. Identificación y cuantificación de los xenobióticos estrogénicos contenidos en sangre y en tejido adiposo”, nº 00/0543 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). En la actualidad se encuentra en curso de realización.
- “Increasing incidence of human male reproductive health disorders in relation to environment effects on growth and sex steroid-induced alterations in programmed development”. Proyecto QRLT-1999-01422 del 5th Framework EU. Quality of Life and Management of Living Resources. En la actualidad se encuentra en curso de realización.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Esta Memoria de Tesis Doctoral que a continuación se presenta, forma parte de un amplio proyecto de investigación que se lleva a cabo en el Departamento de Pediatría de la Universidad de Granada, desde hace varios años. Si se considera un mérito poderla presentar, debería ser un mérito compartirlo con el equipo multidisciplinario que participa en dicho proyecto de investigación.

Al Profesor D. Juan Antonio Molina Font, Catedrático de Pediatría y Director de Departamento de Pediatría de la Universidad de Granada, por haberme dado todas las facilidades, tanto de infraestructura como de personal para llevar a cabo este proyecto.

Al Profesor D. Rogelio Bayés García Profesor Titular de Pediatría de la Universidad de Granada y Jefe de Servicio de Recién Nacidos del Hospital Clínico “San Cecilio” de Granada. Su constante apoyo y perseverancia, su inagotable capacidad de trabajo y dedicación han sido un ejemplo para mí.

A la Profesora Dña. Cristina Campoy Folgoso, que desde el principio al fin ha estado acompañándome. Su constante estímulo y sus consejos han sido determinantes para llevar a buen fin este proyecto, permitiéndome la superación de las dificultades que una investigación plantea.

A la Profesora Dña. Fátima Olea Serrano, Catedrática de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Su valía como investigadora ha sido fundamental en la transmisión de los conocimientos, así como de la ilusión y la perseverancia, incluso en los momentos en los que la ardua tarea se torna casi imposible.

A Dña. Marganita Jiménez Torres, Doctora en Farmacia e investigadora del Departamento de Pediatría de la Universidad de

Granada, por su inagotable simpatía y comprensión. Sus interesantes aportaciones han sido de valor inestimable en la elaboración de este trabajo.

A la Profesora Dña. M^a Teresa Miranda, Profesora de Estadística de la Facultad de Medicina, por su simpatía y disponibilidad desinteresadas en todo momento. A ella le debo la legibilidad y la demostración fidedigna de muchos de los datos de esta Tesis.

A todas las madres que han formado la casuística de esta tesis, aunque recogidas en forma de datos objetivos y fríos, constituyen el mejor pilar para mejorar la humanidad generación tras generación.

A Ana Belén, mi querida esposa, por embarcarse conmigo en el viaje que ha supuesto la realización de esta Tesis Doctoral; por su apoyo y paciencia infinitas, ha resultado indispensable para arribar a buen puerto.

A mis padres Ezequiel y M^a Angustias, que me dieron la vida, por su confianza y protección constantes en los momentos más difíciles; a ellos les debo todo.

A mis hermanos, gracias por su estímulo y comprensión sinceros.

A mi hijo, testigo mudo todavía en el claustro materno, que le proporciona a este padre primerizo un ánimo difícil de explicar con palabras. Él vendrá a colmar un poco más mis expectativas vitales más optimistas.

Índice de Abreviaturas

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A

AA: Ácido Araquidónico
Adl: Adolescentes
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
Adul: Adultos
AG: Ácidos Grasos
AGE: Ácidos Grasos Esenciales
AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados
AGPI-CL: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
AL: Ácido Linoleico
ALA: Ácido Alfa-Linolénico
Apo E: Apolipoproteína E
ARAT: Acil CoA-Retinol Aciltransferasa

C

CA: California
CEE: Comunidad Económica Europea
CG/DCE: Cromatografía de Gases con Detector de Captura de Electrones
CG/EM: Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas
Cho: colesterol
COP: Contaminantes Orgánicos Persistentes
CRABP (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein): Proteína Citoplásmica transportadora de Ácido Retinoico
CRBP (Cytoplasmic Retinol Binding Protein): Proteína Citoplasmática Transportadora de Retinol

D

DDD: Dicloro-Difenil-Dicloroetano
DDE: Dicloro-Difenil-Dicloroetileno
DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DES: Dietilestilbestrol
DGE : Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHA: Ácido Docosahexaenoico
DNA: Ácido Desoxirribonucleico.
DRV panel: Panel on Dietary Reference Values

E

EBP: Proteínas Transportadoras del Epidídimo
EDCs: Endocrine Disrupting Chemicals
EPA: Ácido eicosapentanoico

F

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA: Food and Drugs Administration

H

HDL(High Density Lipoprotein): Lipoproteínas de Alta Densidad

HCH: Hexaclorociclohexano

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

I

IDA: Ingestión Diaria máxima Admisible

IRBP: Proteína Transportadora de Retinol Inter-fotorreceptor

IU: Unidades Internacionales

L

L.D.:límite de detección

LDL (Low Density Lipoprotein): Lipoproteína de baja densidad

LMR: Límite Máximo de Residuos

LRAT: Lecitin-Retinol Aciltransferasa

M

min: minuto

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

N

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)

O

OMS: Organización Mundial para la Salud

P

PAN: Pesticides Action Network

PCBs: Polychlorinated biphenyls (Bifenilos Policlorados)

PGI₂: Prostaglandina I₂

PL: fosfolípidos

POP: Pollution Organics Persistants (Contaminantes Orgánicos Persistentes)

ppm: partes por millón

R

R¹: Radical 1

RARE : Retinoic Acid Responsive Elements

RBP (Retinol Binding Protein): Proteína Transportadora de Retinol

R.D.: Real Decreto

RDA: Dosis Diaria Recomendada

RE: Equivalentes de Retinol

RNA: Ácido ribonucleico

RPE: Epitelio Pigmentado de la Retina

rpm: revoluciones por minuto

S

s: segundos

SCF: Scientific Committee for Food

SEM: Error Estándar de la Media

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

T

TCDD: Tetra-cloro-dioxina

TDI: Ingesta Diaria Tolerable

TEQ: Tóxico-Equivalente

U

UE: Unión Europea

UI: Unidades Internacionales

USA: Estados Unidos de América

V

VLDL(Very Low Density Lipoprotein): Lipoproteínas de muy baja densidad

v/v: volumen/volumen

W

WHO (World Health Organization): Organizacioón Mundial de la Salud

Resumen

RESUMEN

Introducción:

Los recién nacidos y lactantes alimentados al pecho están expuestos a los pesticidas organoclorados (PO) presentes en la leche materna. Las concentraciones de los PO van aumentando conforme se avanza en la cadena alimenticia, de tal forma que la leche humana contiene unos niveles más elevados que la leche de vaca. Se sospecha que tanto la dieta como el contenido final de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena (AGPI-CL) y las vitaminas liposolubles A y E en la leche materna podrían tener alguna influencia sobre la presencia en ella de los PO.

Objetivo:

Este trabajo de investigación pretende demostrar, una vez más, la contaminación de la leche materna en mujeres lactantes del sur de España y, consiguientemente, la del recién nacido lactado al pecho por los PO. Se trata de establecer la posible relación entre los PO, por una parte, y los AGPI-CL y las vitaminas A y E, por otra, en su eliminación a través de la leche calostroal (C), de transición (T) y madura (M).

Material y Métodos:

Para conocer los hábitos alimentarios de las mujeres se realizó una encuesta dietética tipo “recuerdo de 24 horas”, que se hizo coincidir con cada una de las tres etapas de lactancia (C, T y M). La evaluación de las encuestas se realizó mediante un programa informático que transforma los alimentos en sus correspondientes nutrientes.

Se recogieron asimismo un total de 64 muestras de leche materna procedente de mujeres voluntarias sanas del sur de España, de edades comprendidas entre 17 y 35 años; 25 muestras de C, 24 de T y 15 de M. Los PO fueron medidos por cromatografía de gas-líquido (HPLC) y detector de captura de electrones, confirmándose los resultados mediante cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM). Los AGPI se obtuvieron por el método de Lepàge (HPLC). Para la determinación de vitaminas A y E en leche humana se utilizó un método de HPLC en fase reversa con un detector ultravioleta.

Resultados:

Existe una larga lista de pesticidas organoclorados presentes en la leche humana, como el lindano, aldrín, dieldrin, mirex, clordano, endosulfán (y sus metabolitos), DDT (y sus metabolitos) y metoxicloro. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de todos estos disruptores endocrinos desde C hasta M, excepto para endosulfán lactona y metoxicloro, que aumentan. Se han objetivado correlaciones entre algunos PO y AGPI en leche materna (v.g. endosulfán lactona y ácido linolénico: $r=0.378$, $p=0.006$; endosulfán diol y ácido araquidónico: $r=0.621$, $p=0.003$), así como ciertos PO y los lípidos de la dieta (v.g. metoxicloro y grasa total de la dieta: $r=0.655$, $p=0.001$; endosulfán lactona y ácidos grasos monoinsaturados de la dieta: $r=0.326$, $p=0.018$).

El contenido de ácido linolénico en la leche materna se va incrementando desde C hasta M, mientras que los ácidos araquidónico y docosahexaenoico disminuyen conforme avanza la lactancia. Al establecer la comparación entre las vitaminas liposolubles en las distintas épocas de la lactancia, se demuestra que, tanto la vitamina A como la E, son excretadas en C en una alta concentración frente a épocas ulteriores.

Conclusiones:

Los niños lactantes alimentados al pecho están expuestos a PO a través de la leche de sus madres. Los PO son liberados a la leche materna junto a los AGPI, los cuales son parte estructural de las membranas celulares. Unos pesticidas muestran más afinidad en su liberación con los AGPI de cadena larga de la serie n-3 y otros, por el contrario, se liberan de forma preferente unidos a los AGPI-CL de la serie n-6. Estos resultados sugieren la necesidad de nuevos estudios que clarifiquen la relación de PO y AGPI-CL en el humano, y ayudarán a entender mejor el metabolismo de los xenobióticos dentro del organismo.

Índice

ÍNDICE DE LA TESIS DOCTORAL

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
<u>PARTE I: PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN LECHE HUMANA</u>	1
1.GENERALIDADES	1
2. <i>EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS MOLÉCULAS ORGANOCOLORADAS</i>	2
2.1. TOXICIDAD AGUDA	3
2.2. TOXICIDAD CRÓNICA	4
3. <i>ACTIVIDAD HORMONAL ESTROGÉNICA DE LOS PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS</i>	4
4. <i>LAS MOLÉCULAS ORGANOCOLORADAS ESTUDIADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO</i>	6
4.1. HCH, LINDANO	6
4.2. DERIVADOS CICLODIÉNICOS	6
4.2.1. Derivados del dimetanaftaleno	7
4.2.2. Derivados del biciclohepteno	7
4.2.3. Derivados del indano	8
4.3. DERIVADOS DE PENTACLOROCICLODECANO	8
4.4. DDT	9
4.5. METOXICLORO	9
4.6. HCB	9
5. MOLÉCULAS ORGANOCOLORADAS EN MEDIO AMBIENTE Y VIDA SALVAJE	10
6. MOLÉCULAS ORGANOCOLORADAS EN MEDIOS BIOLÓGICOS	11
6.1. LECHE HUMANA	11
6.2. SUERO Y TEJIDO ADIPOSO	14
7. LA ALIMENTACIÓN COMO FUENTE DE CONTAMINACIÓN HUMANA	15

8. EFECTOS DE LOS XENOBIÓTICOS EN LAS MEMBRANAS CELULARES.....	18
9. PROGRAMA DE CONTROL DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.....	21
<u>PARTE II: ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LECHE HUMANA</u>	25
.	
<u>PARTE III. INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE.</u>	30
1. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA LECHE HUMANA.....	30
2. INFLUENCIA DE LA DIETA MATERNA SOBRE LA COMPOSICIÓN EN HIDRATOS DE CARBONO Y MICRONUTRIENTES DE LA LECHE HUMANA.	33
2.1. HIDRATOS DE CARBONO.	33
2.2. VITAMINAS.	33
2.3. MINERALES.	34
2.4. OTROS MICRONUTRIENTES.....	35
<u>PARTE IV: ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS</u>	36
1. VITAMINA E.....	36
1.1. DEFINICIÓN.....	36
1.2. ESTRUCTURA.....	37
1.3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS.....	38
1.3.1. Acción antioxidante.....	38
1.3.2. Otras funciones.....	40
1.4. INGESTA DIETÉTICA DE VITAMINA E.....	41
1.5. METABOLISMO LA VITAMINA E.....	44

1.5.1. Absorción.....	45
1.5.2. Transporte.....	45
1.5.3. Distribución.....	46
1.5.4. Excreción.....	47
1.6. DEFICIENCIA DE VITAMINA E.....	47
2. VITAMINA A.....	48
2.1. DEFINICION.....	48
2.2. ESTRUCTURA.....	49
2.3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS.....	50
2.3.1. Diferenciación celular.....	50
2.3.2. Efectos hormonales.....	51
2.3.3. Actuación en la visión.....	51
2.4. INGESTA DIETÉTICA DE VITAMINA A.....	52
2.4.1. Recomendaciones oficiales para la ingesta dietética de vitamina A (RDA).....	52
2.4.2. Determinación del estado nutricional de vitamina A.....	54
2.5. METABOLISMO DE LA VITAMINA A.....	56
2.5.1. Absorción.....	56
2.5.2. Almacenamiento.....	57
2.5.3. Movilización : Proteína transportadora de retinol...	57
2.5.4. Captación celular del retinol.....	59
2.5.5. Reciclaje y homeostasis del retinol plasmático.....	60
2.5.6. Metabolismo intracelular del retinol.....	60
2.6. DEFICIENCIA DE VITAMINA A.....	62
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	64

MATERIAL Y METODOS.....	69
1. CASUÍSTICA.....	70
2. RECOGIDA DE MUESTRAS.....	70
3. MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN NUTRICIONAL.....	71
3.1. INFORMACIÓN PERSONAL Y DE HÁBITOS DE VIDA.....	71
3.2. ENCUESTA ALIMENTARIA.....	72
3.3. PROGRAMA INFORMÁTICO Y TABLAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS.....	73
4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	73
4.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EN LECHE MATERNA....	73
4.2. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LECHE HUMANA.....	76
4.3. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS A Y E EN LECHE HUMANA (GONZÁLEZ-CORBELLÁ, 1994)....	78
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	80
RESULTADOS.....	82
DISCUSIÓN.....	122
CONCLUSIONES.....	146
BIBLIOGRAFIA.....	149

Introducción

INTRODUCCION

PARTE I: PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN LECHE HUMANA

A lo largo del siglo XX, el hombre ha adquirido poder suficiente para alterar la naturaleza del mundo que lo rodea. En los últimos años este poder se ha incrementado, produciéndose secundariamente la contaminación del medio ambiente con los vertidos de materiales peligrosos y letales a los ríos, mares, aire y tierra. Se calcula que son unos 500 productos nuevos a los que se tiene que adaptar cada año el ser humano y los animales.

Cuando Müller (Premio Nobel en Medicina) (Müller, 1948) descubrió las propiedades insecticidas del DDT inició una revolución en el campo de los pesticidas desencadenando la incorporación de productos derivados de síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades, reducida hasta entonces a los productos clásicos y a unos pocos, muy escasos, derivados de la Química Orgánica. El DDT fue el primer eslabón de una cadena compuesta por síntesis orgánicas de derivados clorados de gran importancia como pesticidas (Barberá, 1989).

Un gran número de estas sustancias químicas presentes en el medio ambiente puede alterar la homeostasis hormonal de los seres vivos.

1. GENERALIDADES

Se utiliza el término de disruptores hormonales (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) para definir el conjunto heterogéneo de sustancias químicas que interaccionan con el sistema endocrino. Lo integran una serie de productos químicos sintetizados por el hombre o bien componentes naturales de los alimentos. La variedad estructural de los EDCs hace imposible predecir *a priori* si una molécula estará dotada de capacidad hormonal. Se han descrito hasta el momento más de diez grupos de sustancias pertenecientes a diferentes familias químicas que se comportan *in vivo* como los estrógenos naturales. Son los plaguicidas organoclorados; entre otros, el DDT, dieldrín, clordecona, endosulfán y toxafeno, algunos bifenilos policlorados o PCBs, agentes tensoactivos y plastificantes como el octil y nonilfenol, algunos ftalatos de uso habitual

en la industria alimentaria, y los monómeros del plástico policarbonato, metacrilato y las resinas epoxi. No obstante, es importante resaltar que en nuestro medio, la exposición de una gran parte de la población a niveles medios-bajos de estos xenobióticos es una realidad.

Recientemente, se ha encontrado una relación dosis-dependiente entre los niveles de PCB en cordón umbilical y un bajo rendimiento en el Test Infantil de Inteligencia de Fagan (FTII) a las edades de 6 y 12 meses (Darvil, 2000).

Los alimentos pueden incluirse dentro del marco general de exposición medioambiental si se considera que los alimentos forman parte del entorno del ser vivo. Para el consumo de alimentos tratados con pesticidas es conocida la necesidad de cumplir los "plazos de seguridad", es decir, el período de tiempo que debe transcurrir desde la aplicación hasta la recolección o aprovechamiento o bien hasta la entrada a recintos tratados. En principio, así se debería garantizar la inocuidad del alimento como vehículo de un tóxico externo a él. En los últimos 10-20 años han disminuido apreciablemente en los alimentos los niveles de contaminación por productos organoclorados. Actualmente en nuestro país se dispone de normas legales que restringen la utilización de determinados productos. Aún se conoce poco acerca de los efectos que se pudiesen producir tras la ingesta continuada de alimentos contaminados, pues depende principalmente de la idiosincrasia de cada persona (National Research Council, 1993; Martínez, 1997).

2. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS MOLÉCULAS ORGANOCOLORADAS

En la actualidad el uso de productos químicos de síntesis ocupa un lugar preferente. La utilización de éstos en las actividades agrícolas ha supuesto un alto desarrollo en la producción agraria. Con el uso de los fertilizantes, herbicidas y pesticidas se ha logrado incrementar significativamente el rendimiento de las cosechas a la vez que se ha elevado la calidad y el nivel nutricional de los alimentos. Además, los pesticidas también se utilizan en programas de salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vectores u hospedadores intermediarios. Las consecuencias del empleo de plaguicidas en salud y en agricultura son muy variados: frente al beneficio que supone la destrucción sistemática de parásitos que afectan a la salud de las plantas

y a la salud humana, se debe considerar el efecto que estos compuestos químicos "biocidas" tienen sobre las especies animales y el propio hombre (Olea, 1995).

El término pesticida deriva de la palabra inglesa *pest* que designa a todo animal o planta (virus, bacterias, setas, hierbas, gusanos, moluscos, insectos, roedores, pájaros y mamíferos) susceptible de perjudicar al hombre y a su medio ambiente. Según la FAO/OMS se denomina pesticida a toda sustancia o mezcla de sustancias utilizada en agricultura para prevenir o controlar cualquier especie, de plantas o animal, perjudicial para otras plantas, animales o el propio hombre; incluye también a otras sustancias o mezclas de ellas utilizadas como regulador de crecimiento de las plantas, defoliantes y desecantes. Este término no se aplica a los antibióticos, ni a los fertilizantes, ni a otros productos químicos administrados a los animales con objetivos diferentes, como son el estimular su crecimiento y el comportamiento reproductivo.

Se define como "**residuo de pesticidas**" el resto del mismo y de los eventuales metabolitos que se encuentren en los alimentos destinados al hombre o al ganado (R.D. 162/1991). Hay que tener en cuenta las impurezas que pueden acompañar al principio activo y que en ocasiones, presentan mayor toxicidad que el primero, por ejemplo, los residuos de DDT que acompañan al acaricida dicofol, o bien los isómeros hexaclorociclohexanos que acompañan al lindano (Coscolla, 1993).

Se podrían citar tres razones científicas que justifican la atención ante estos grupos de pesticidas organoclorados: 1) la acumulación de estos compuestos en el tejido adiposo y en la leche materna, 2) el conocimiento sobre la actividad hormonal estrogénica que presentan algunos de ellos, actuando como disruptores endocrinos y 3) los metabolitos pueden actuar como potenciales carcinógenos al poseer una alta afinidad por el ADN intracelular (Jobling, 1995; Paulozzi, 1997; Skakkebeak, 1998).

2.1.TOXICIDAD AGUDA.

Este tipo de intoxicaciones es relativamente frecuente en agricultores (Chugh, 1998; Martín-Rubí, 1999). Los síntomas ocasionados por los pesticidas se pueden resumir en:

a) *P. organoclorados*: Alteraciones digestivas (vómitos y diarreas) y neurológicas (cefaleas, vértigos, convulsiones, coma); b) *P. Organofosforados/carbamatos*: Efectos anticolinesterásicos, alteraciones digestivas (náuseas, vómitos y diarreas), respiratorias (tos, ahogos y asfixia), cardiovasculares (taquicardia, hiper/hipotensión) y neuromusculares (contracciones, calambres, movimientos involuntarios y parálisis); c) *Otros*: Proliferación de células fibroblásticas, accidentes hemorrágicos, ictericia, diarrea, ahogo, asfixia, alteraciones neurológicas, tetania, edema pulmonar, alteraciones renales y hepáticas (Derache, 1990).

2.2. TOXICIDAD CRÓNICA.

Esta toxicidad ocurre si el contaminante queda impregnando en el organismo, según su afinidad por determinados tejidos diana u órganos. Puede ocurrir cuando se produce una manipulación continuada de estas sustancias y posterior absorción a dosis subagudas (Cantor, 1991; Cocco, 1998). Se producen alteraciones respiratorias (de vías, bronquitis, asma, etc.), digestivas (náuseas, vómitos, anorexia y diarreas), hepática, renales, dermatológicas (congestión, rubor, erupciones, irritaciones, alergias), cardiovasculares (arritmia, taquicardia, hiper/ hipotensión), neurológicas periféricas (fatiga muscular, ansiedad, insomnio, irritabilidad, parálisis central con cefaleas, depresión y alucinaciones), genito-uritarias (riesgo fetal con el traspaso placentario e infertilidad) y alteraciones del sistema hematopoyético. Por ejemplo, los ensayos de experimentación en laboratorio con roedores alertan sobre la toxicidad de los pesticidas organoclorados a largo plazo, habiéndose detectado cambios en glándulas endocrinas, en hígado, en el desarrollo embrionario y en cerebro (Akhtar, 1996; Sulik, 1997; Popov, 1998; Eriksson, 1997; Erikson y Tals, 2000).

3. ACTIVIDAD HORMONAL ESTROGÉNICA DE LOS PESTICIDAS ORGANOCORADOS

Una gran cantidad de productos químicos utilizados actualmente en la agricultura tienen capacidad para unirse a receptores estrogénicos intracelulares, DDT o metabolitos, metoxicloro, compuestos bifenólicos o bien clordecona, los cuales mimetizan los estrógenos endógenos (hormonas) y exógenos, como el DES (dietilestilbestrol), tanto en modelo de animales de experimentación como en cultivos celulares (Hu,

2002). En este sentido la clordecona fue la primera molécula a la que se encontró efecto estrogénico en trabajadores de fábricas productoras de este pesticida (Cohn, 1978). Un estudio reciente asocia el aumento del estrés oxidativo con los pesticidas organoclorados y, lo que es más importante, a éstos con el cáncer de mama (Iscan, 2002)

Para poder comprender la importancia que poseen los compuestos organoclorados se han de tener claros una serie de conceptos que nos permitirán entender el efecto que éstos producen sobre los organismos vivos, más concretamente sobre el organismo humano.

- **Disruptor endocrino:** conjunto heterogéneo de sustancias con variabilidad estructural que interaccionan con el sistema endocrino. Pueden ser de origen natural (alimentario) y de síntesis. Grupo que incluye a los xenoestrógenos.

- **Estrógeno:** sustancia farmacológica, esteroidea o no, que posee la capacidad de inducir el estado *estro*, independientemente de su estructura.

- **Xenoestrógeno o xenobiótico estrogénico:** compuesto químico de actividad estrogénica capaz de mimetizar a los estrógenos naturales.

Los estrógenos endógenos, *estrona* (E_1), *17 β -estradiol* (E_2) y *estriol* (E_3), son hormonas cuya acción es regular el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación de los órganos sexuales secundarios en la mujer; su función biológica fundamental es el control de la reproducción mediante la regulación del ciclo ovárico, el desarrollo de la glándula mamaria y control de la lactancia.

Estudios epidemiológicos buscan poner de manifiesto la relación causa-efecto. Así el editorial de The Lancet en abril 1995 recoge los informes de un grupo de trabajo reunido en Copenhague en enero de ese año y coordinado por Neil Skakkebaek (Lancet, 1995); estos estudios analizan los efectos estrogénicos que sustancias como DDT, aldrín, dieldrín, PCBs, dioxinas, alquilfenoles o fitoestrógenos ejercen sobre las mujeres; Sin embargo, recientemente, se ha observado con mayor frecuencia la relación entre la exposición a xenoestrógenos y la aparición de alteraciones en los niños varones. Los estudios epidemiológicos realizados sobre los hijos e hijas de mujeres a las que para prevenir abortos espontáneos se les administró DES, entre los años 1948 y 1971,

han demostrado disfunciones en los órganos reproductores, embarazos anormales, reducción de la fertilidad, alteraciones del sistema inmune, etc. (Herbst, 1990; Sharp, 1990; Bern, 1992). Aunque los nietos/as de hijos/as expuestos al DES parecen no presentar anomalías, algunos de ellos han sido el producto de cortas gestaciones y con bajos pesos al nacer (Mittendorf, 1995).

4. LAS MOLÉCULAS ORGANOCLORADAS ESTUDIADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO

4.1. HCH, LINDANO

El hexaclorociclohexano (HCH) sigue en historia y popularidad al DDT. Es utilizado tanto para humanos (champú contra piojos, insecticida) como en veterinaria (para ectoparásitos). El HCH se obtiene por un proceso de cloración del benceno. Es una mezcla de isómeros que difieren entre sí por las posiciones en el espacio de los átomos de cloro e hidrógeno, isomerías que se designan con las letras: alfa, beta, gamma, delta y épsilon y condicionan la actividad insecticida del HCH. Sólo el isómero gamma presenta una acción relevante y es lo que constituye el Lindano.

El Lindano se ha utilizado en ganadería, contra plagas de pulgones o de orugas, empleándose solo o mezclado con derivados fosfóricos, como insecticida doméstico y del suelo, sin que comunique sabor desagradable u olor a moho en los cultivos establecidos en suelo tratado, contra plagas etc. Entre su aplicación y recolección de frutos o plantas destinados al consumo humano o del ganado el período de seguridad se sitúa en 15 días. A dosis bajas produce *irritabilidad* y *agresión*. Numerosos estudios señalan la capacidad de provocar toxicidad y muerte debido a que es un potente agente convulsivante, en seres vivos, por su acción directa sobre el sistema nervioso central

4.2. DERIVADOS CICLODIÉNICOS

Bajo esta denominación existen tres grupos de insecticidas caracterizados por una estructura química similar formada por un anillo

cíclico con doble enlace y puente metilénico, el cual puede estar unido o no a otro anillo u otros grupos.

Existen tres series en función de su constitución química (Matsumura, 1985): 1) *Derivados de dimetanonaftaleno*: Aldrín, Dieldrín, Isodrín y Endrín; 2) *Derivados de biciclohepteno*: Telodrín, Endosulfán, Ciclodán, Bromodán; 3) *Derivados del indano*: Clordano y Heptacloro.

4.2.1. Derivados del dimetanonaftaleno

Son insecticidas muy homogéneos entre sí y se dividen en dos categorías distintas: a) formada por los "predecesores" (isómeros entre sí) y b) los sus epóxidos que se forman al abrirse un doble enlace y captar un átomo de oxígeno. A excepción del Endrín, el principal empleo de estos productos ha sido el tratamiento de suelo.

El Aldrín se utilizó bastante en mezcla con fertilizantes, aplicado al suelo pasa a Dieldrín, acusándose una larga persistencia en el terreno. Dieldrín se ha empleado mucho en tratamientos de suelo contra hormigas, y se usó igualmente como insecticida en ganadería y para proteger a los cereales.

El Endrín ha sido aplicado la mayoría de las veces de forma directa sobre plantas. En España su uso se limitó al algodón, también, en forma de gránulos, contra barrenadores del maíz y contra plagas. Pero debido a su elevada toxicidad, por persistir tanto en el suelo como en animales y sistemas biológicos, su aplicación se ha reducido e incluso anulado.

4.2.2. Derivados del biciclohepteno.

Poseen la misma estructura del anillo bicíclico hexagonal no saturado que los anteriores y se obtienen a través de síntesis diénica.

El Telodrín ha dejado de producirse; el bromodán ha encontrado aplicación sólo en ganadería y el endosulfán es el único que ha alcanzado un extenso uso agrícola.

El Endosulfán posee dos isómeros de conformación α y β definida por el tipo de anillo flexible de siete elementos. La clasificación de ambos ha sido considerada por su simetría (Forman, 1965). Es un insecticida organoclorado de amplio espectro usado en variedad de cereales, frutas, vegetales y algodón. Presenta efectos sinérgicos con pesticidas organoclorados en el medio ambiente (Arnold, 1996). La toxicidad oral aguda del endosulfán técnico es parecida a la del Lindano y los residuos en plantas son moderadamente persistentes. El metabolismo del endosulfán se produce por oxidación y da lugar al endosulfán diol, lactona, éter, sulfato (de toxicidad media) y otros productos. Según el organismo que lo metabolice dará lugar a mayor o menor concentración de unos u otros metabolitos. Posee capacidad estrogénica demostrada (Soto, 1994; Botella Orts, 2000).

4.2.3. Derivados del indano

El Clordano técnico es un líquido viscoso, de color ámbar oscuro y olor similar al cedro. Contiene aproximadamente un 60% de clordano puro junto con restos de hexa, hepta y nonacloro y derivados dicitlopentadiénicos.

El clordano posee dos isómeros estructurales, cis y trans-clordano. La toxicidad para ambos es diferente, el isómero cis es diez veces menos tóxico que el trans (Matsumura, 1985). La dosis letal del clordano para la mayoría de las especies es de 200-300 mg/Kg de peso corporal (Barberá, 1989).

4.3. DERIVADOS DE PENTAFLOROCICLODECANO

La clordecona o kepona, el mirex y kelevan presentan un alto grado de cloración y gran dificultad de metabolización y eliminación (son lipófilos y se acumulan en grasa), y junto con la kepona se acumulan en los organismos. El mirex es el que presenta mayores problemas, por ello su uso ha sido enormemente restringido debido a riesgos de carcinogenicidad en ratas y ratones (Gerhart, 1985), contaminación de aguas, escasa degradación en suelos, etc. Entre las aplicaciones del kelevan destaca la gran efectividad que tienen contra la hormiga del fuego, de único uso actualmente, y otras hormigas, cucarachas, gusanos del suelo, etc.

4.4. DDT

Su vida media es de 20 años. Al ingerirse se acumula en los tejidos grasos. El metabolismo del DDT cambia en función de los animales de que se trate. En los vertebrados, como ratas, monos y otros, está presente su metabolito de oxidación DDA en orina y heces. En el hombre el DDT es lentamente transformado a DDE (inactivo como pesticida) por deshidrogenación. El DDE se almacena y es un compuesto incluso más resistente y estable. Se ha encontrado en numerosas muestras de tejido adiposo y leche humana, por lo que es un buen indicador biológico de exposición crónica a DDT (Sanz-Gallardo, 1999).

Otra vía de degradación se produce por la acción de porfirinas, *Aerobacter* y a microorganismos del rumen (Plimmer, 1968; Fries, 1969) formándose el derivado dicloro o DDD, el cual actúa como insecticida. De modo que el metabolito DDD se puede encontrar tanto en animales como en aguas de lagos. La teoría de su mecanismo de acción se centra en la capacidad de interferir o inhibir el enzima ATP-asa que regula los iones calcio de la membrana celular, por lo que se impide así el rápido retorno de la membrana nerviosa a su estado de equilibrio (Shibamoto, 1993). Este mecanismo de acción es extensivo a todos los pesticidas organoclorados. Produce excitación desordenada, temblores, convulsiones, parálisis y síndrome de neurotoxicidad tanto en especies vertebradas como invertebradas. Posee actividad estrogénica y capacidad para aumentar el riesgo de cáncer de mama (Bustos, 1988; Wasseman, 1976).

4.5. METOXICLORO

El metoxicloro es el más conocido y empleado de los análogos del DDT (Matsumura, 1985). El espectro de acción es similar al DDT, pero de modo más suave. Esto es debido a que los mamíferos y organismos del suelo poseen enzimas capaces de catalizar la reacción de demetilación de los átomos de oxígeno del grupo metoxi, dando lugar a un compuesto más polar que puede ser conjugado y excretado. Es de gran utilidad para eliminar plagas en jardines.

4.6. HCB

Es un fungicida empleado en la formulación de productos destinados al tratamiento de semilla contra enfermedades fúngicas que

dañan los cultivos de cereales durante la germinación de las semillas y primeras fases de su crecimiento y desarrollo, pero por problemas toxicológicos este uso ha sido cancelado en muchos países. Experimentos con ratas demuestran que al alimentarlas con HCB durante semanas pueden llegar a acumularse en los tejidos, especialmente en el sistema linforreticular. También se puede considerar como metabolito de otros pesticidas organoclorados, pues en el proceso de metabolización de estas moléculas puede originarse el HCB. Esto implica que se encuentre en mayor cantidad. Los productos técnicos del mercado pueden ir acompañados del pentacloronitrobenceno (PCNB) (Concon, 1988; Barberá, 1989).

5. MOLÉCULAS ORGANOCORADAS EN MEDIO AMBIENTE Y VIDA SALVAJE.

La contaminación y/o persistencia de los compuestos organoclorados se presenta en el suelo, posteriormente son ingeridos por los animales más pequeños y pasarán a los de mayor tamaño a través de la depredación, siguiendo así la cadena trófica (Willett, 1993).

La presencia de moléculas como PCBs y pesticidas organoclorados en el análisis de muestras de sedimentos de ríos y lagos, plancton y peces está claramente demostrada, habiéndose encontrando HCH, clordano, heptacloro, aldrín, dieldrín, endrín, endosulfán, mirex, metoxicloro y DDT, siendo los más abundantes DDT, DDE y PCBs (Hargrave, 1989; Barkue, 1990, Guitar, 1996; Ueno, 2003; Yuan, 2003)

Debido a la toxicidad crónica de los pesticidas organoclorados, se han realizado gran número de estudios observando los efectos en la reproducción de distintas especies: osos (Lie, 2003), ovejas (Beard, 1999), aves (v.g. águilas) (Clark, 1998; Kenntner, 2003; Walker, 2003), tortugas marinas (Podreka, 1998), nutrias y visones (Harding, 1999), focas (Tanabe, 2003), calamares (Ueno, 2003) o anfibios (Fonovich, 2000). También se han realizado estudios sobre los procesos de feminización de los machos (Bull, 1988; Sumpter, 1995) o masculinización de las hembras (Barreiro, 1998).

En ratas de laboratorio, la clordecona puede inducir una disminución de la grasa corporal (Klingesmith, 1982) y el Policlorocanfano (PCC) aumenta la actividad de enzimas microsomales

hepáticas, produciendo acúmulo intrahepático de grasa o esteatosis (Poul, 1981).

6. MOLÉCULAS ORGANOCLORADAS EN MEDIOS BIOLÓGICOS

En el análisis de leche, sangre y tejido adiposo, se ha podido hallar PCBs, dioxinas, DDT y HCH en mujeres de Japón, Suecia, EE.UU. y Rumania (Jensen, 1987; Patterson, 1994; Atuma, 1998; Hura, 1999; Bates, 2002; Jaga, 2003).

Las concentraciones en leche humana o en sangre dependen de 1) la acumulación crónica de moléculas organocloradas, 2) la baja degradación metabólica y 3) baja excreción. Como resultado se confirma la elevada vida media de todos estos compuestos (Rita, 1987; Westin, 1990; Soto, 1991; Wolff, 1992, 1993; Sharpe, 1993; Krishnan, 1993; Asplund, 1994; Patandin, 1999).

6.1. LECHE HUMANA

No debe sorprendernos que la leche humana posea unas concentraciones más altas de plaguicidas que la leche de vaca, pues éstos tienden a concentrarse más cuando se toman muestras cada vez más altas de la cadena alimentaria; por tanto, los animales carnívoros almacenan más DDT que los herbívoros (Woodwell, 1967a; Woodwell, 1967b). Para calcular la probabilidad de contaminación de la leche materna es necesario conocer la solubilidad del contaminante. En la transmisión de estas moléculas a través de la leche materna es importante considerar tanto la intensidad de la contaminación como la duración de la lactancia (Gladen, 1988; AAP, 1994; Rogan, 1996). Se transmiten tanto el total de los congéneros de PCBs, DDT, PCDD/PCDFs como otros compuestos clorados (Newsome, 1999). No hay información concluyente sobre efectos perjudiciales en lactantes alimentados al pecho en las áreas en donde el empleo de DDT ha sido intenso, aunque ello no excluye la posibilidad de consecuencias a largo plazo (Jiménez, 2000).

Los ensayos realizados en ratas están ofreciendo datos interesantes sobre la relación entre estos xenobióticos y los lípidos corporales. Chen et al. han comprobado que la administración por vía

oral de una mezcla de dioxinas, furanos y PCBs a un grupo de ratas gestantes fue capaz de modificar sustancialmente su contenido lipídico y el de sus crías. La placenta vio significativamente disminuida su cantidad de grasa en los animales tratados, al igual que el suero y el tejido hepático. Ni éste ni la placenta experimentaron variaciones en su peso respecto a los controles. Este descenso en el contenido de grasa podría achacarse, según trabajos previos, a alteraciones enzimáticas (Lakshman, 1989). Han sido descritos en ensayos similares cambios histológicos y funcionales, como la vacuolización celular y el descenso de proteínas marcadoras en tejido placentario (Ishimura, 2000). El contenido lipídico fetal no experimentó cambios, mientras que, por el contrario, los recién nacidos tenían unas concentraciones entre dos y tres veces mayores que el grupo control; fenómeno que se explica por la alta exposición a pesticidas después del nacimiento a través de la lactancia (Chen, 2002).

La leche de mujer es un medio de excreción de compuestos tales como el DDT y su principal metabolito DDE, HCB, HCH, dieldrín y heptacloro epóxido. Las concentraciones de éstos en leche materna se han relacionado con posibles efectos neurotóxicos, teratogénicos e inmunológicos con el consiguiente riesgo para los lactantes (Rogan, 1992; Rogan, 1986; Krauthacker, 1998). Desde los años sesenta las concentraciones de DDT en la leche humana han sido generalmente muy superiores a 50 µg/L. (Quinby, 1965; Egan, 1965; Curley., 1969; Kroger, 1972).

Tras el análisis de leche de mujeres de Noruega y Nueva York se detectaron niveles significativos para el PCB, el HCH, PCBs y DDE que estuvieron presentes en todas las muestras analizadas y los contenidos son más elevados en mujeres primíparas que en múltíparas. Además, los residuos encontrados fueron menores en las mujeres noruegas que en mujeres de otros países europeos (Skaare, 1990; Hong, 1992). Se ha encontrado en leche de mujeres españolas en una concentración de 1 ppm, aproximadamente igual a los valores de la mayoría de los países industrializados (Albert, 1981; Conde, 1989).

Por otra parte, un estudio llevado a cabo en mujeres españolas sugiere que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la leche humana está relacionado con la cantidad de xenobióticos contenidos en

ella. Este estudio mostraba una correlación positiva entre endosulfan lactona/ DHA y ALA en leche madura. (Jiménez, 2001).

La carne y los productos lácteos pueden contribuir a la contaminación con dieldrín y PCBs, el pescado a la contaminación con PCB 118 y el fumar con DDT y dieldrín, lo que puede ser debido el empleo de pesticidas en las plantaciones de tabaco (Dagnelie, 1992).

También se ha demostrado que el contenido de estas sustancias en la leche humana aumenta con la edad, lo que puede deberse por otra parte a la persistencia y bioacumulación de estos productos en el tejido graso (Bates,1994). Así, se han determinado los niveles de residuos de DDT en muestras de leche humana tomadas 25 días después del parto en mujeres de zonas rurales de Venezuela, donde el DDT se había empleado masivamente en agricultura y contra la malaria. Se encontraron niveles de DDT significativamente mayores entre las mujeres que dieron a luz con mayor edad.

Otro estudio realizado tras el análisis de muestras de sangre, tejido adiposo y leche humana de mujeres mejicanas, confirma como fuente importante de DDT los alimentos como carne, leche y mantequilla. Los niveles encontrados se pueden tomar como bioindicadores para valorar la exposición de madres lactantes al DDT (Brunetto, 1996; López-Carrillo, 1996; Ejobi, 1998). En países del hemisferio norte como Canadá, Alemania y Finlandia se plantea el mismo problema, ya que la leche de mujeres procedentes de estos países presenta igual contaminación por pesticidas organoclorados, dibenzo-p-dioxinas (PCDDs)/dibenzofuranos (PCDFs) y PCBs que los países del hemisferio sur. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la contaminación está disminuyendo en países desarrollados respecto a los que se encuentran en vías de desarrollo, precisamente por el mayor control político existente en aquellos (Bates, 2002; Wong, 2002; Jaga, 2003)

A pesar de la evidencia a lo largo de los años, el problema se mantiene. No en vano, las muestras de leche humana analizadas demuestran la existencia de pesticidas organoclorados, PCBs y dioxina por todo el mundo desde zonas rurales hasta zonas urbanas, desde zonas industrializadas a zonas totalmente subdesarrolladas (Craan, 1998; Jiménez 2000; Burke, 2003; Polder, 2003). Según diversos investigadores es interesante establecer la relación entre las

concentraciones de DDT y su metabolito DDE, de tal modo que valores bajos en el cociente DDT/DDE indican una exposición crónica y antigua al pesticida (Ahlborg, 1995; Botella Orts, 2000). Habitualmente un alto contenido en pesticidas se relaciona con bajo peso en el recién nacido (Dewally, 1996; Schade, 1998; Raum, 1998; Vartiainen, 1998; Brouwer, 1998). Muestras de leche de madres cuyos hijos fueron hospitalizados por distintos trastornos (enfermedades respiratorias, anemias, malformaciones congénitas, etc) presentaron mayores niveles de DDE y PCBs, en aquellos que presentaban una alteración neurológica más importante (Krauthacker, 1998).

6.2. SUERO Y TEJIDO ADIPOSO

En muestras de tejido adiposo procedentes de mujeres trabajadoras de una fábrica japonesa expuestas a PCBs, se han encontrado PCBs y metil sulfitos. Se identificaron 55 PCBs diferentes en muestras de tejido adiposo y suero humano y encontraron niveles de 1,57 a 432 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y de 0,5-6,1 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectivamente para los diferentes PCBs. Se analizaron las muestras de tejido adiposo y leche humana correspondiente a residentes de cinco municipios de Ontario en la zona de los Grandes Lagos, y se puso de manifiesto la presencia de PCBs, aunque los niveles fueron mayores para mujeres que para hombres. Este mismo estudio se realizó en Japón y en este caso las concentraciones eran mayores en hombres que en mujeres (Yoshida, 1977; Luotamo, 1991; Williams, 1991). Estos resultados han sido corroborados en otros países (Krauthacker, 1993; Bajaj, 1993). Muchos de estos pesticidas organoclorados han sido evidenciados recientemente en tejido adiposo mamario procedente de mujeres de Polonia y los resultados concuerdan con los obtenidos en otros países europeos con parecidas políticas ambientales en este sentido (Strucinski, 2002)

En nuestro país, las conclusiones del trabajo realizado por Molina Carrasco (1994) pusieron de manifiesto la presencia de endosulfán en el tejido graso de la población infantil con valores considerables; fue significativo que la mayor parte de las muestras analizadas presentaban concentraciones apreciables de compuestos organoclorados como aldrín, dieldrín, DDT, DDE y lindano.

7. LA ALIMENTACIÓN COMO FUENTE DE CONTAMINACIÓN HUMANA

Las fuentes de contaminación son diversas y en algunos casos distintas para los diferentes contaminantes. No es de extrañar que los alimentos habitualmente consumidos por el hombre estén contaminados. La exposición a residuos de productos químicos contenidos en alimentos presupone un riesgo, que aún no ha sido totalmente establecido, para la salud de los animales y del hombre (Culliney, 1992; Abelson, 1994).

Se sabe que la leche humana es nutricionalmente adecuada para el desarrollo correcto del lactante y defensa frente a infecciones bacterianas. Aunque la lactancia materna es el método que suministra unos mayores beneficios para el recién nacido, en determinadas circunstancias puede no ser tan beneficiosa para la salud del bebé. Como señaló Knowles (Knowles, 1965), la mayoría de los agentes recibidos por la mujer lactante se encontrarán en su leche. De modo que la distribución a través de la membrana de una droga, de un plaguicida o metales, estará influida por su coeficiente de partición lípido/agua, por su pKa o grado de ionización y los mecanismos de transporte mal comprendidos. Los trabajos experimentales demuestran cómo los lactantes están expuestos a los contaminantes medioambientales a través del transporte placentario y continúan estándolo a través de su alimentación (Matsuda, 1978a; 1978b; Yakushiji, 1984; Patandin, 1997) y que a lo largo de la vida, el consumo de aguas contaminadas o productos animales provocan una ingesta continuada de bajos niveles de éstas y otras muchas sustancias potencialmente tóxicas. La clase social, los hábitos tabáquicos y las tradiciones alimentarias son fuente importante de sustancias tóxicas; otros, como los medicamentos y sus metabolitos, drogas, virus, nicotina, cafeína, alcohol, etc. y sustancias policloradas como PCBs y DDT pueden producir efectos adversos sobre la salud del lactante (Golding, 1997; Shepherd, 1998; Deutch, 2003). Se sabe que el consumo frecuente de alcohol, cafeína, nicotina y marihuana afecta negativamente a la producción, volumen, composición y eyección de la leche humana así como efectos adversos directos sobre el bebé (Liston, 1998).

En 1991 y 1997, en sendas reuniones de expertos que tuvieron lugar en Windspread (Racine, Wisconsin) se redactaron dos manifiestos; en ellos se denuncia la preocupación entre los científicos sobre los efectos nocivos que tiene la exposición crónica a bajos niveles de

productos químicos empleados en la agricultura y en el procesamiento de alimentos (Colborn, 1992; Colborn, 1998).

Se estima que en EE.UU. ocurren anualmente cerca de 80 millones de nuevos casos de enfermedad relacionada con los alimentos (Glosser, 1994). El número de muertes/año se estima en 9000. La contaminación de los alimentos puede ser producida por metales pesados, nitratos, procedentes del agua o abonos, insecticidas, herbicidas y contaminantes ambientales, PCBs y dioxinas (Berry, 1992; National Research Council, 1993; Trotter, 1993; Whitmore, 1994; Martínez, 1997; Cole, 2002; Skibniewska, 2003).

Una reunión conjunta de la FAO/OMS (FAO/OMS, 1971) sugirió 5 µg de DDT por kilogramo de peso corporal como la ingestión diaria máxima admisible (IDA) para seres humanos y se fijó el límite residual para el DDT total en la leche de vaca en 0,05 ppm (50 µg/L).

El ser humano se expone a la ingestión continua de pequeñas dosis de tóxicos por su dieta diaria. De modo que los pesticidas y sus metabolitos se encuentran en los líquidos biológicos (suero, orina y leche) y en el tejido adiposo. Debido a la ignorancia de algunos o a la negligencia de otros se pueden encontrar grandes cantidades de residuos de pesticidas en los productos alimentarios (OMS, 1963, 1991; Dillon, 1995; Nakata, 2003).

Los alimentos estimados como fuente de moléculas organocloradas han sido 1) los alimentos ricos en grasa, 2) los vegetales, primer alimento en contacto directo con los pesticidas organoclorados. Se están utilizando para los cultivos tempranos, varias fórmulas comerciales en las que se encuentran como principios activos moléculas organocloradas tales como endosulfán, lindano, vinclozolina, etc. (Stresser, 1998); y 3) en la bibliografía se ha encontrado con alta frecuencia la relación entre pesticidas contenidos en leche materna y consumo de pescado por las madres (Vartiainen, 1998; Nakagawa, 1999; Sarcinelli, 2003).

Los alimentos grasos y el pescado son generalmente la fuente de transmisión de PCBs y DDE en los países industrializados (Cole, 2002). Aunque las concentraciones hayan descendido más de la mitad en las dos últimas décadas, los residuos en productos de consumo diario son

cercanos o superan los límites máximos de residuos establecidos por la FAO/OMS.

El único punto de referencia existente entre los pesticidas organoclorados y otros componentes controlados por FAO/OMS aparece en 1990, cuando la OMS propuso una ingesta diaria tolerable (TDI) de 10 pg TCDD/Kg/día. Pero si consideramos que la vida media de eliminación PCDD/Fs es de 7,5 años y que la fracción absorbida de la dosis ingerida para los humanos equivale a 0,5 se estima que el ser humano ingiere entre 14-37 pg TEQ/Kg/día. Así que aplicando un factor de incertidumbre de 10 se establece la TDI. En revisiones posteriores y ante nuevos datos toxicológicos la OMS ha establecido un margen de TDI entre 1-4 pg TEQ/Kg/día (OMS, 1999).

Se constata que los niños pequeños pueden sufrir una exposición mayor a PCDD/Fs y compuestos similares debido a la lactancia materna. La ingesta diaria por Kg de peso es 50 veces mayor en el lactante que en el adulto. *Los seis primeros meses de lactancia materna suponen un acúmulo de PCDD/Fs y PCBs equivalente a 25 años de vida del individuo expuesto a una alimentación con niveles de contaminantes organoclorados dentro de los límites actualmente permitidos.* Por tanto, queda claro que, *el recién nacido y el niño lactado al pecho heredan una carga de moléculas organocloradas que se transmitirán de generación en generación.* El efecto tóxico potencial provocado por el largo período de latencia y la naturaleza no claramente establecida de los procesos patológicos es objeto de estudio por numerosos investigadores. Se ha demostrado que las concentraciones de pesticidas organoclorados, encontrados en la leche de madres lactantes de todo el mundo, siguen superando el límite TEQ establecido por la OMS para otras moléculas organocloradas (Craan, 1998; Nunes, 1998; Torres-Arreola, 1999; Noren, 2000).

Todos los grupos de alimentos que se puedan considerar: vegetales, alimentos de origen animal (carne, pescado y derivados lácteos), aguas de bebida, etc. presentan niveles importantes de contaminantes con pesticidas organoclorados. Hay un gran número de trabajos que avalan esta afirmación (Albert, 1990; Kaphalia, 1990; Conchello, 1992; Winters, 1996; Kannan, 1997; Goralczyk, 1999; Spirc, 1998; Hura, 1999; Kalra, 1999; Nakata, 2003; Sarcinelli, 2003).

En la actualidad hay más control y restricción en el empleo de algunos pesticidas organoclorados en agricultura. Esto debería traducirse en menores niveles de exposición que en el pasado, como realmente ocurre en países donde los programas sanitarios y medioambientales son más exhaustivos. En México, por ejemplo, han decrecido los niveles de DDT en las mantequillas desde 1999 por este motivo (Waliszewski, 2003). Sin embargo, quizás por la elevada persistencia de estas moléculas y el uso indiscriminado que se hace de ellas, el grado de impregnación en los seres vivos sigue siendo excesivo, hasta el punto que la transmisión de estos productos en la cadena trófica es un riesgo tal como se muestra en estos resultados por la exposición del lactante a través de la leche. Además, cabe suponer que los pesticidas acumulados en el tejido adiposo de la madre pueden llegar al feto a través del torrente sanguíneo. Por tanto, ante estos hechos, el *principio de precaución* debe de ser tenido en cuenta, debido al amplio uso de estas moléculas organocloradas, cuya exposición prolongada determina su persistencia y, en muchos casos, su efecto disruptor endocrino.

8. EFECTOS DE LOS XENOBIÓTICOS EN LAS MEMBRANAS CELULARES

En un estudio realizado en células renales de ratas se demostró que el HCH induce la liberación del Acido Araquidónico procedente del fosfatidil inositol. Esta acción podría ser llevada a cabo por los isómeros gamma y delta, siendo éste último el más relevante en este aspecto (Puente-Fraga, 1995). Ensayos posteriores realizados por Tithof et al. han demostrado que la liberación de ácido araquidónico mediada por la fosfolipasa A2 independiente del calcio juega un papel esencial en la formación del ion superóxido (O_2^-) en neutrófilos expuestos a varios agentes fisiológicos y farmacológicos. Estos autores concluyen que una de las isoformas de la fosfolipasa A2 es activada tanto por dieldrín como por lindano, provocando la producción de O_2^- y la liberación de ácido araquidónico desde la membrana de los neutrófilos (Tithof, 1996, 1998, 2000). Otros autores han corroborado este fenómeno de activación enzimática en neutrófilos mediada por otros pesticidas organoclorados, tales como p,p' DDT y clordano (Olivero, 2002). Se postula que éste mecanismo está implicado en la toxicidad y carcinogenicidad de estas sustancias.

Los ensayos realizados en ratas gestantes están ofreciendo datos interesantes sobre la relación entre estos xenobióticos y los lípidos corporales. Quedan demostradas las alteraciones enzimáticas que se derivan de su exposición, como, por ejemplo, en la acetil-coenzima A (CoA) carboxilasa, la sintetasa de ácidos grasos y la hidroximetilglutaril (HMG) CoA reductasa (Lakshman, 1989).

Los efectos de los xenobióticos lipofílicos se han estudiado asimismo en la membrana celular del *Bacillus stearotherophilus*. El DDT es capaz de disminuir, en los cultivos, el crecimiento y capacidad de adaptación de este microorganismo, debido a las alteraciones en la función y propiedades físicas de la bicapa lipídica. Se relaciona, sobre todo con un aumento de la concentración relativa de fosfoglicolípidos, aumento de fosfatidiletanolamina y disminución paralela de fosfatidilglicerol (Donato, 1997). Algunos autores consideran a los componentes lipídicos de la membrana del *Bacillus stearotherophilus* como criterio sensible para detectar efectos nocivos de los xenobióticos a bajas dosis (Donato, 2000).

Las modificaciones sobre la membrana celular inducidas por los componentes organoclorados incluyen a todo tipo de células. En eritrocitos, por ejemplo, se ha observado que la exposición a HCH origina alteraciones en la fluidez de la membrana, aumento de la fragilidad osmótica y defectos en el funcionamiento de la Na-K ATPasa y acetilcolinesterasa (Bhalla, 1998). El dieldrin, por su parte, se ha visto involucrado claramente en fenómenos similares de desestructuración de la bicapa lipídica y bloqueo de canales de cloro y sodio (Suwalsky, 2002). Se han observado, en ratas gestantes expuestas en su dieta a dioxinas, cambios histológicos y funcionales sobre tejido placentario consistentes en vacuolización celular y descenso de proteínas celulares marcadoras (Ishimura, 2000).

Si la alteración acontece a nivel de los canales de comunicación intercelular (*gap junction*), el problema se acentúa, porque interfiere con los mecanismos de coordinación de las células dentro de los tejidos (hígado, pulmón, piel, corazón o cerebro). Esto se ha demostrado con algunos pesticidas organoclorados, entre ellos el dieldrin y el endosulfán (Matesic, 2001). En estudios recientes *in vivo* sobre timocitos de rata, se ha demostrado que el dieldrin es capaz de inducir apoptosis celular (Hallege, 2002)..

Se han descrito problemas de fertilidad en relación con la exposición a lindano, dieldrin y metoxicloro así como la alteración del metabolismo de los fosfolípidos de membrana de los ovocitos de anfibios (Fonovich, 2000; Picard, 2003).

Los fenómenos de peroxidación lipídica son fundamentales para entender determinados daños celulares inducidos por insecticidas clorados (Bencze y Wildbrett, 1975; García-Fernández, 2002). Recientemente, Wang et al. han demostrado en ratas que el lindano provoca la liberación de ácido araquidónico desde las células del miometrio. Este estudio se realizó *in vitro* sobre cultivos de células miometriales de rata a los que se sometió a exposición en tiempo y concentraciones crecientes de lindano. Evidenciaron una liberación de ácido araquidónico procedente de la fosfatidilcolina y fosfatidilinositol de las membranas celulares, en un fenómeno independiente del calcio tanto intra como extracelular. La mayor parte de ese ácido araquidónico liberado fue recuperado en forma libre (85%) y sólo un 5% en forma de eicosanoides. El *ácido linoleico* también fue cuantificado pero *no* se produjo una liberación significativa de éste bajo la exposición al pesticida. Eso indica que el lindano es capaz de activar a una fosfolipasa A2 independiente del calcio *específica del ácido araquidónico* y que, por tanto, su liberación no se debe a la citotoxicidad ni a otras acciones inespecíficas en la membrana celular (Wang, 2001).

Un compuesto químico, la bromoenol lactona (BEL) se considera como un inhibidor selectivo de la fosfolipasa A2 calcio-independiente; de forma que se añadió al cultivo celular expuesto a lindano para así bloquear la liberación de ácido araquidónico. Sin embargo, esa inhibición no se produjo y las concentraciones del citado ácido graso libre siguieron su curso independientemente de BEL. Por tanto, este hallazgo implicaría la posibilidad de una *nueva y previamente no identificada isoforma de fosfolipasa* expresada por las células miometriales, que es independiente del calcio, insensible a BEL y estimulada por el lindano para liberar, específicamente, ácido araquidónico (Wang, 2001).

Estudios posteriores, también *in vitro*, han comprobado la reversibilidad del estrés oxidativo inducido por lindano y metoxicloro, gracias a la administración concomitante de vitamina E (Krieger, 2001; Latchoumycandane, 2002).

9. PROGRAMA DE CONTROL DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

La Comisión Europea ha pretendido desarrollar un sistema para poder estimar la exposición efectiva a los plaguicidas a través de la alimentación, conociendo las infracciones del contenido máximo de residuo autorizado (LMR). Esto lo realizarán las autoridades designadas por los Estados miembros que actúan conforme a las Directivas 89/397/CEE y 93/99/CEE, relativas al control oficial de productos alimenticios.

El Informe de la Comisión al Consejo de la U.E. realizado en Bruselas el 1-03-2000, sobre la aplicación del artículo 7 de la Directiva 86/362/CEE establece unos *contenidos máximos* para los residuos de plaguicidas en los cereales. El artículo 4 de la Directiva 90/642/CEE se refiere a la fijación de contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas.

Desde 1996, la Comisión ha adoptado, y por tanto publicado en el Diario Oficial, las Recomendaciones en materia de control. En éstas se definen las combinaciones de productos/plaguicidas (en gama suficiente de productos que permita conocer la ingesta efectiva de los plaguicidas) que se controlarán durante el año considerado, aunque abarcan períodos de cinco años. Así la transcripción literal indica las siguientes: *96/199/CE (para 1996), 96/738/CE (para 1997), 97/822/CE (para 1998), 1999/333/CE (para 1999, incluyendo por primera vez los procedimientos de control de calidad y de toxicidad aguda tras la ingesta de determinados plaguicidas) y para el año 2000.*

Sin embargo, el número de muestras analizadas y el control de los residuos de plaguicidas es diferente para cada Estado miembro, pues depende de los productos disponibles en el mercado y de la capacidad analítica. Los resultados obtenidos se remiten a la Comisión y ésta al Comité Fitosanitario Permanente (Directiva 1999/65/CE). Actualmente se han publicado dos informes sobre control de residuos de plaguicidas en la Unión Europea (para 1996 y 1997), en donde se afirma que en el 60% de las muestras analizadas no se detectaron residuos, menos del 4% de las muestras contenían residuos de plaguicidas superiores a los LMR y entre el 0,3 y 0,5% de las muestras contenía residuos de plaguicidas en

niveles superiores a los LMR. Respecto a la IDA, sólo hubo un caso que sobrepasaba esa ingesta (OMS, 1997). Sin embargo, recogen que no existen riesgos agudos o crónicos para la salud, por lo que es innecesario adoptar medidas a escala comunitaria.

Debido a la futura ampliación de la CEE, los laboratorios de países de Europa central y oriental comienzan a participar en las pruebas de aptitud periódicas y en el cálculo de la ingesta efectiva de los consumidores al término del ciclo control de cinco años.

La Oficina Alimentaria y Veterinaria de la Comisión realiza inspecciones para comprobar las condiciones en que se desarrollan los controles y el cumplimiento de lo dispuesto en el apartado 4 del artículo 4 de la Directiva 86/362/CEE del Consejo y en el apartado 4 del artículo 3 de la Directiva 90/642/CEE del Consejo, así como el control sobre la comercialización de productos fitosanitarios (Directiva 91/414/CEE del Consejo).

Las conclusiones que se alcanzan en el presente informe se refieren a la aplicación de los distintos artículos de las Directivas recogidas en dicho programa, que ha permitido evaluar, por primera vez, la exposición de los consumidores a residuos de plaguicidas contenidos en frutas y hortalizas. Se ha comprobado que los niveles de éstos no suponen un riesgo para la salud de los consumidores, aunque no se confía en exceso y la Comisión, junto con los Estados miembros, debe continuar vigilando los niveles de residuos de pesticidas en los alimentos. También deben controlarse los niveles de residuos de contaminantes, aditivos, medicamentos veterinarios, etc. De modo que serán necesarios programas integrados de control comunitarios para todas estas sustancias.

En diciembre del año 1999, el Parlamento Europeo aprobó la estrategia comunitaria en materia de disruptores endocrinos [COM (1999) 706]. Una de sus acciones clave a corto plazo consistía en el establecimiento de una lista prioritaria de sustancias con capacidad para alterar el sistema endocrino de seres humanos y animales. Durante el año 2000, la Dirección General de Medio Ambiente de la Comisión Europea encarga la realización de esta lista a *BKH Consulting Engineers*, que encuentra un total de 553 sustancias, divididas en tres categorías (*sustancias químicas, plaguicidas y otras sustancias*) y 9 hormonas (*naturales o sintéticas*). Posteriormente, el Comité Científico de

Toxicidad, Ecotoxicidad y Medio Ambiente de la Comisión las clasifica, en base a la información disponible sobre ellas, en:

- 1) Sustancias de las que se tiene pruebas que confirman su capacidad – efectiva o potencial- para causar alteraciones endocrinas, que no son objeto de reglamentación ni se hallan en el ámbito de la aplicación de la legislación comunitaria.
- 2) Sustancias de las que se tiene pruebas que confirman su capacidad – efectiva o potencial- para causar alteraciones endocrinas, que ya son objeto de reglamentación o bien se hallan en el ámbito de aplicación de la legislación comunitaria vigente. Entre ellas se encuentran pesticidas como clordano, oxiclordano, lindano, mirex, fotomirex, DDT, pp´DDT, hexaclorobenceno, algunos PCB, aldrín, dieldrín, endosulfán alfa y beta.
- 3) Sustancias sin datos suficientes que confirmen su capacidad para causar alteraciones endocrinas. Destaca la inclusión en este apartado del op´DDD, op´DDE, op´DDT, pp´DDD, pp´DDE, metoxicloro
- 4) Sustancias sobre las que se tienen conocimientos escasos o nulos.
- 5) Sustancias que, a la luz de los datos disponibles, no provocan alteraciones endocrinas.

El 30 de marzo del año 2000, el Consejo de Medio Ambiente aprobó sus Conclusiones relativas a la Comunicación de la Comisión, en las que hacía hincapié tanto en el *principio de precaución* como en la necesidad de establecer estrategias de gestión de riesgos.

Una vez aprobada, en septiembre del año 2000, la Directiva marco de la política de aguas (2000/60/CE), la Comisión adoptó, en enero de 2001, una Propuesta modificada de Decisión del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas [COM(2001) 17]. De las 32 sustancias prioritarias que se mencionan en esa lista, 11 habían sido catalogadas por el informe BKH como de probada acción disruptora endocrina.

En el seminario europeo sobre alteradores endocrinos celebrado en Suecia en el año 2001, se reunieron personalidades de la OCDE, la OMS y la Agencia Europea del Medio Ambiente, bajo el patrocinio del Ministerio de Medio Ambiente y la Inspección Nacional de Sustancias

Químicas (KEMI) de aquel país. Se establecieron los principales aspectos de seguimiento, investigación y desarrollo, así como los métodos/estrategias de ensayo y cooperación internacional.

Ese mismo año 2001, la Comisión Europea aprobó su *Libro Blanco* relativo a la estrategia futura en materia de productos químicos y al estudio de sus efectos a dosis bajas, a largo plazo o exposición a mezclas de estos disruptores endocrinos. Tres meses más tarde, fue publicada *una convocatoria específica de propuestas de investigación* relacionadas con las repercusiones de dichas sustancias para la salud y el medio ambiente.

Limitaciones del programa de control.

Este programa de control posee sus limitaciones pues no hay ninguna disposición sobre el control de residuos de plaguicidas en alimentos de origen animal:

- 1) Los productos de procedencia animal se controlan por la Directiva 96/23/CE y por la que se derogan la Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. La Directiva 96/23/CE es relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, para garantizar la observancia de la normativa comunitaria. También prevé la presentación de informes anuales a la Comisión.
- 2) La fijación de los LMR de plaguicidas en productos alimenticios de origen animal corresponde a la Comisión (Directiva 86/363/CEE del Consejo). Pesticidas que se pueden utilizar como medicamentos veterinarios (Reglamento 2377/90/CEE del Consejo). Puede ocurrir que los residuos para una misma sustancia y para un mismo producto alimenticio son diferentes para ambos casos, por lo que se pretende hacer una legislación comunitaria más transparente y fácil de aplicar.
- 3) La Directiva 97/41/CE del Consejo aplica los LMR a los piensos. Modifica las Directivas 76/85/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE.
- 4) No hay requisitos mínimos para los contenidos de residuos de plaguicidas en los productos alimenticios y agrícolas, así mismo las actividades de control varían de unos Estados miembros a otros.

5) El porcentaje de superación de los LMR comunitarios puede deberse a cómo se establecen esos LMR o a la posibilidad de que se usen plaguicidas no autorizados, en cualquier caso constituye un motivo de inquietud, sobre todo a nivel de frutas tropicales.

6) Limitaciones de la Comisión para realizar las inspecciones.

7) Para estimar la exposición efectiva a residuos de plaguicidas son precisos datos sobre los regímenes alimentarios reales de la población y subgrupos de población y a la exposición a plaguicidas por otras vías cuyo control no prevén los artículos (v.g. agua).

PARTE II: ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LECHE HUMANA

Los Ácidos Grasos poliinsaturados (AGPI) son aquellos que contienen dos o más dobles enlaces. Cada uno de ellos introduce una flexión en la cadena hidrocarbonada, de forma que introducen cambios en la capacidad de reacción de los ácidos grasos, su forma física y su comportamiento. Los dobles enlaces pueden estar en posición *cis* o *trans*, aunque la mayoría de los ácidos grasos que existen en la naturaleza son isómeros *cis*.

Los ácidos grasos *trans* pueden alterar la formación de ácidos grasos de cadena larga, así como los productos finales de la desaturación-elongación de los ácidos grasos ácido linoleico (AL) y ácido α -linolénico (ALA). Si el consumo materno de ácidos grasos *trans* es muy alto, puede ocasionarse una deficiencia relativa de AGPI-CL en el neonato (Rosenthal, 1984).

Los valores de ácidos grasos "trans" en sangre de cordón son similares a los valores plasmáticos maternos en el momento del parto (Koletzko, 1990). Estos datos demuestran que existe una transferencia de ácidos grasos "trans" a través de la placenta humana (Koletzko, 1992). Por esta razón, no se debe aconsejar a las futuras mamás el consumo de grandes cantidades de grasas hidrogenadas y evitar el empleo de fórmulas adaptadas que contengan una alta proporción de isómeros "trans" (Koletzko, 1989). Por otra parte, se ha evidenciado un descenso en los niveles plasmáticos y en los eritrocitos de DHA cuando las

fórmulas lácteas para recién nacidos son suplementados con los ácidos grasos esenciales AL y ALA (Ramirez, 1998). En Europa está restringiendo el uso de aceites que contengan ácidos grasos "trans" por el potencial riesgo de efectos secundarios sobre el metabolismo de las lipoproteínas, aterogenesis y sobre el metabolismo de los ácidos grasos esenciales, mientras son permitidos en USA (Koletzko, 1991, 1992^a, 1994).

En el Congreso Mundial de Nutrición, celebrado en Montreal, la Dra. Innis ha presentado un trabajo en el que demuestra que la calidad de la grasa que ingiere la madre que lacta, incluyendo las altas cantidades de ácidos grasos en posición "trans", van a tener un importante impacto sobre el desarrollo de la grasa plasmática y tisular del recién nacido (Innis, 1997). Un trabajo presentado a este Congreso, concluye que el grado de hidrogenación de la grasa dietética y el contenido de formas "trans" de los ácidos grasos puede cambiar la composición de los ácidos grasos de los microsomas, pudiendo interferir en los mecanismos enzimáticos relacionados con el metabolismo de xenobióticos (Morgado, 1997).

Las importantes y diversas funciones de los AGPI durante el periodo perinatal y del lactante, hacen de ellos un campo de estudio apasionante y de notable relevancia para la investigación. Hoy día, y después de una última década de intenso estudio, falta mucho por decir y descubrir de estos nutrientes esenciales.

Los AGPI son los componentes fundamentales de los lípidos estructurales de las membranas celulares, mitocondrias y núcleos y tienen un papel vital para las propiedades de la mayoría de las membranas. Las principales funciones se pueden resumir en: a) mantener la integridad de la membrana (Hansen, 1985); b) mantener niveles óptimos de desaturación en los lípidos tisulares (Bailey, 1973); c) mantener la barrera acuosa epidérmica; d) intervenir en la inmunidad; e) actuar como precursores de los eicosanoides [ácidos docosahexaenoico (DHA=22:6,n-3), araquidónico (AA=20:4, n-6) y eicosapentanoico (EPA=20:5, n-3)]; f) contribuir a la regulación del metabolismo del colesterol; g) intervenir específicamente en el crecimiento y en el desarrollo cerebral retiniano (Ballabriga, 1995), tejidos extremadamente ricos en AGPI-CL, y principalmente en DHA y AA. El cerebro es el órgano con un mayor contenido graso, después del tejido adiposo, con un 50% del mismo en forma de lípidos de las membranas celulares (Sastry, 1985). Se ha demostrado en un estudio sobre el cortex cerebral

de la rata, que el incremento de la proporción dietética de AL contribuye a mantener una mejor integridad estructural y funcional de la membrana de los sinaptosomas (Srinivaran, 1997).

Los AGPI linoleico (AL) (18:2 n-6) y α -linolénico (ALA) (18:3 n-3) se consideran nutrientes esenciales, cuya inclusión en la dieta previene diversos síntomas específicos de su déficit (White, 1973; Neuringer, 1986; Makrides, 1995). Estos ácidos grasos esenciales llegan al feto a través de la placenta, y al recién nacido mediante la leche materna. El papel de la placenta es clave para el feto, pues ésta transforma los ácidos grasos esenciales de cada familia en sus metabolitos más elongados o bien, si provienen como tales de la madre, son transferidos directamente al feto; así ocurre un fenómeno de "*biomagnificación*" con los AGPI-CL que provienen de los fosfolípidos del hígado materno, y a través de la placenta llegan al hígado y, posteriormente, al cerebro fetales (Crawford, 1983; Sanjurjo, 1994). A diferencia de los niños pretérmino, los niños a término reciben cantidades crecientes de AGPI-CL a través de la placenta y cordón umbilical, durante las últimas semanas de la gestación (Friedman, 1978), y también pueden contar con sistemas enzimáticos más maduros. Incluso se ha demostrado que existe una correlación entre la ingesta de ácidos grasos n-3 y los niveles alcanzados en la madre y en el feto (Sanjurjo, 1994).

Se han llevado a cabo múltiples ensayos en los que se ha suplementado la dieta de las mujeres lactantes con aceite de pescado, rico en AGPI-CL n-3 (Helland, 1998) o DHA (Makrides, 1996), en los que se demuestra un aumento dosis dependiente de ácido eicosapentaenoico (EPA) y DHA en leche materna, sin alteración de los niveles de AA (Helland, 1998) o con leve descenso (Makrides, 1996). Si no sólo se suplementa con DHA, sino también con AA y EPA, se consigue que el nivel de AA en leche materna se incremente. En el mismo estudio se añadió a la dieta materna una dosis diaria de 300 mg de AA durante 1 semana observándose, por un lado el descenso de AGPI-CL n-3 y, por otro, que el AA no se incrementaba en la leche materna (Smit, 2000). Este fenómeno podría explicarse por la ya conocida competitividad entre AA, por un lado, y EPA y DHA, por otro (Innis, 1991). En el caso de mujeres mal alimentadas, el nivel de AA en su leche materna es muy bajo, como ocurre en las estudiadas en el norte de Pakistán (Smit, 2000).

Hace unas décadas se desconocía la significación biológica y funcional de los bajos niveles de DHA en plasma y en los eritrocitos de los niños alimentados con fórmula respecto los que recibían lactancia natural (Putnam, 1982; Carlson, 1987; Makrides, 1994). Había, por tanto, incertidumbre de la capacidad de elongación y desaturación del AL en órganos en desarrollo y de la necesidad de aportes suplementarios de este AGPI-CL (Ponder, 1992).

Se ha observado experimentalmente que la actividad enzimática δ -6-desaturasa de las células cerebrales, el escalón limitante de la velocidad en la síntesis de AGPI-CL disminuye cuando la mielinización alcanza el máximo, a la vez que aumenta en el hígado (Bourre, 1990). Estudios de la composición de ácidos grasos del cerebro han demostrado que los niños alimentados al pecho materno tienen niveles de DHA más elevados que los alimentados con fórmula, sugiriendo que el DHA del cerebro depende de los aportes dietéticos. Algunos estudios fisiológicos han informado que la electrofisiología y la función visual son mejores en los niños a término lactados al pecho materno frente a los alimentados con fórmula, y además, esto guarda relación con el tiempo que se prolonga la alimentación al pecho (Carlson, 1989, 1996; Uauy, 1990, 1992; Makrides, 1993). Otros estudios señalan que las bases de la esencialidad de los ácidos grasos de la serie n-3 incluyen no sólo evidencias bioquímicas sino aspectos funcionales mensurables asociados con el déficit en humanos y en primates no humanos (Uauy, 1996). El desarrollo funcional de la retina y del cortex occipital se afectan por el déficit de ALA y por la ausencia de DHA en las fórmulas para prematuros, y más recientemente informado, en las dietas para nacidos a término (Carlson, 1993). Está comprobado que los niños nacidos a término y alimentados al pecho materno tienen una agudeza visual, valorada mediante potenciales evocados, significativamente mayor que los alimentados con fórmula no suplementada con DHA. Además, hay una correlación positiva de la agudeza visual con las concentraciones de DHA en los eritrocitos (Makrides, 1993, 1994). Los efectos funcionales de los ácidos grasos de la serie n-3 sobre el ciclo sueño-vigilia, la regulación del ritmo cardíaco soportan la necesidad de aportar en la dieta ácidos grasos de la serie n-3 precozmente durante el desarrollo.

Se sabe que la formación de dendritas y mielina y la estabilización de las uniones sinápticas alcanzan el máximo durante los dos primeros años de vida (Morgan, 1987; Clandinin, 1989). Se ha constatado que los AGPI-CL de las series n-3, n-6 y n-9 se acumulan en grandes cantidades en el sistema nervioso central durante los

primeros 18-24 meses de vida (Martinez, 1992). Agostoni et al. mediante un estudio prospectivo realizado en una población de recién nacidos a término, y que posteriormente se han revisado y estudiado a los 4, 12 y 24 meses de edad, han demostrado que existe un mayor puntaje en los tests de desarrollo psicomotor en aquellos niños que recibieron un correcto y compensado aporte de AGPI-CL en el periodo neonatal y de lactante (Agostoni, 1995a, 1995b). La última parte del trabajo fue presentada en el mes de Abril en el Simposium Internacional sobre Nutrición y Metabolismo Perinatal y Neonatal, celebrado en Granada, y posteriormente en el Congreso Mundial de Nutrición celebrado del 27 de Julio al 1 de Agosto de 1997 en Montreal (Canadá); tras el seguimiento, los resultados obtenidos a los 24 meses de edad demuestran la existencia de una estrecha correlación entre la composición de AGPI de la fosfatidilcolina de los eritrocitos y el coeficiente de desarrollo psicomotor a los 24 meses de edad (Agostoni, 1997; Giovannini, 1997a, 1997b). También se ha presentado un trabajo en el Congreso de Canadá realizado en recién nacidos pretérmino, en el que se demuestra una relación directa entre el aporte equilibrado de DHA y ácido araquidónico y mayores puntajes del test de desarrollo neuropsicomotor de Bayley a las 52 y 64 semanas postnatales (Damli, 1997).

La escala de Bayley y el test de Brunet-Lezine son pruebas que valoran globalmente las funciones superiores y el desarrollo psicomotor en lactantes y niños. En recién nacidos a término lactados al pecho o que recibieron fórmulas suplementadas con DHA, el test de Brunet-Lezine mostró mejores resultados a los 4 y 24 meses de vida (Agostoni, 1995), respecto a los que recibieron fórmulas sin DHA; sin embargo estas diferencias desaparecieron al realizar de nuevo el test a los 12 y 24 meses (Agostoni, 1997). Las diferencias bioquímicas encontradas en la sangre de los tres grupos, parecen demostrar que, a medida que transcurren los meses, otros factores ambientales aparte de la dieta influyen de forma progresiva en el desarrollo de las funciones superiores.

Actualmente se están suplementando las fórmulas para recién nacidos a término con este tipo de ácidos grasos de larga cadena, obteniéndose niveles plasmáticos más elevados que en lactantes no suplementados (Decsi, 1995). Las cantidades deben ser equilibradas en lo que se refiere a las series n-3 y n-6, sobre todo DHA y AA, con el fin de obtener en los lactantes alimentados artificialmente valores de estos ácidos grasos similares a los que reciben leche materna (Benito, 2002).

PARTE III. INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE.

Se sabe que la dieta de la madre lactante es fundamental, pues su alimentación y estado nutricional influyen sobre la calidad y cantidad de leche segregada. De modo que el estado nutricional previo al embarazo, durante el embarazo y el de la lactancia, constituye toda una secuencia nutricional (Tagle, 1980).

1. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA LECHE HUMANA

Los lípidos de la leche materna provienen de los depósitos de grasa maternos y de la síntesis hepática y mamaria, pero no están claros los mecanismos por los que se regula su excreción. Constituyen de un 3-5% de la leche humana y aportan de un 45-55% energía de la leche, por lo que representan la principal fuente de energía para el lactante alimentado al pecho y proporciona nutrientes esenciales como vitaminas liposolubles y AGPI. Los ácidos grasos esenciales AL y ALA son los precursores de los AGPI-CL, como el AA (20:4n-6) y el DHA (22:6n-3).

Durante la vida postnatal el contenido en AGE n-6 y n-3 en leche materna es totalmente necesario para el crecimiento óptimo del lactante, sobre todo para el desarrollo neurológico y actividad visual (Martínez, 1991; Birch, 1992). La suplementación de la dieta materna con DHA origina una elevación significativa de éste en la leche materna, al igual que ocurre con el ácido palmítico y el ácido oleico, sin afectar los niveles de AA y de tocoferol (Ruan, 1995; Makrides, 1996; Helland, 1998; Fidler, 2000). Entre otras funciones, el DHA se relaciona con una mejor estereopsis en el niño a los 3 y 5 años (Williams, 2001).

Se conoce que los niños alimentados con leche humana tienen un mayor desarrollo comparado a aquellos que son alimentados con leche de fórmula, lo que se relaciona con el contenido en DHA en leche materna (Innis, 1992). Si la madre lactante ingiere una concentración alta de DHA el niño también recibirá mayor cantidad de DHA, y sin embargo no afectará al resto de AGPI (Harris, 1984; Gibson, 1997).

En los años 80 se constató que la dieta materna rica en hidratos de carbono y baja en grasas originaba un aumento de los triglicéridos en la leche materna comparada con las que recibían una dieta rica en grasa y baja en hidratos de carbono (Harzer, 1984). Si en la dieta predominaban grasas con AL, fosfolípidos (PL), colesterol (Cho) o ácidos grasos de cadena larga (AGPI n-3), éstas se encuentran aumentadas en la leche materna (Innis, 1988, Park, 1999). En general, se ha demostrado que la cantidad de AGPI en la leche materna depende de los ingresos dietéticos de la mujer (Rocquelin, 1998). Sin embargo, en las embarazadas desnutridas, la cantidad de AL y AA en leche materna proviene principalmente de las reservas maternas (de Prado, 2001).

Es durante el tercer trimestre de la gestación cuando se produce el mayor paso de AGPI-CL desde la madre al feto, por lo que las reservas en el recién nacido prematuro se encuentran mermadas. Como las reservas maternas dependen de la dieta, pueden mejorarse con la suplementación con DHA y AA durante el embarazo y la lactancia. (Beijers, 1996; Jensen, 1992; Hamosh, 1998; Moya, 2000).

Hay una relación entre ingesta y excreción en leche materna de AGPI-CL (C22:6, n-3 y C20:5 n-3) (Hayat, 1999) y ésta se hace muy significativa con la evolución de la lactancia, es decir, en la leche madura (Scopesi, 2001). Sin embargo, estudios recientes con isótopos estables demuestran que la mayor parte de los AGPI en la leche no proviene de la dieta materna, sino de las reservas endógenas (Koletzko, 2001; Sauerwald, 2001). Los AG trans en la leche materna dependen principalmente de la ingesta de la mujer (Koletzko, 1991; Ratnayake, 1996; Larque, 2001). Las dietas ricas en AG trans elevan los niveles de AL en la leche materna, sin afectar a los AGPI-CL (Larque, 2001). En este sentido, numerosos estudios demuestran que el consumo de margarina puede favorecer el depósito de AG trans en el tejido adiposo de la madre, de donde puede ser movilizado en el curso de la lactancia, pasando a la leche materna. Esto podría producir efectos secundarios en el neonato lactado al pecho. La ingesta de este tipo de grasas es mayor en países de América del Norte o Europa que en África. Por otra parte, el consumo de aceite de oliva aumenta la presencia de ácidos grasos insaturados de cadena media en la leche humana (Chappel, 1985; Pretince, 1989; Boatella, 1993).

La composición de AGPI y oligosacáridos en leche materna experimenta variaciones geográficas que podrían obedecer en última instancia a la variabilidad genética (Fidler, 2000, Erney, 2000).

Las mujeres que siguen dietas restrictivas, debido a motivaciones filosóficas, culturales o religiosas, son notablemente diferentes de las de la población en general. Pueden mostrar modificaciones importantes en la composición de la leche materna. Dentro de los distintos grupos pueden establecerse diversas categorías: 1) *Lactoovovegetarianos*: en los que está excluida la administración de carne, pero que consumen leche y huevos. 2) *Lactovegetarianos* que excluyen la carne y los huevos, pero incluyen la leche en la dieta. 3) *Vegetarianos totales* que rechazan cualquier alimento de origen animal: denominados *Vegan*. Los valores de AL oscilan del 8-16% del total de los ácidos grasos, aunque en las mujeres que siguen una dieta Vegan pueden alcanzar valores más altos (Finley, 1985). La ingesta de ALA varía en función de los aceites utilizados, por ello en la dieta seguida por vegetarianos estrictos y vegetarianos con dieta ovoláctea posee mayor contenido en AL y ALA que aquella dieta seguida por los omnívoros. A pesar de las bajas concentraciones de DHA existentes en sangre de niños de madres vegetarianas con respecto a las omnívoras no existe evidencia de que la capacidad de sintetizar AGPI-CL sea limitada en vegetarianos (Sanders, 1999).

En cuanto el contenido de colesterol en leche materna madura no varía con la dieta materna. Se ha observado que la cantidad de colesterol y grasa ingerida no posee correlación con colesterol total sérico de niños lactados al pecho (Jensen, 1990; Kallio, 1992). Sin embargo, sí se ha demostrado que, en la vida adulta, los niveles de colesterol total y LDL-colesterol se encuentran significativamente disminuidos en aquellos sujetos que recibieron alimentación materna frente a los alimentados de forma artificial (Owen, 2003).

2. INFLUENCIA DE LA DIETA MATERNA SOBRE LA COMPOSICIÓN EN HIDRATOS DE CARBONO Y MICRONUTRIENTES DE LA LECHE HUMANA.

2.1. HIDRATOS DE CARBONO (H de C)

El contenido de AG de cadena media (C8 y C10) en leche humana aumentan con dieta materna rica en H de C, pues una dieta rica en éstos conduce a una mayor incorporación de ácidos grasos del tipo C6:0-C14:0 en los triglicéridos de la leche, al igual que en cada una de las subclases de fosfolípidos (Bach, 1982; Thompson, 1985; van Beusekom, 1990). El aumento de la demanda de glucosa durante la lactancia se resuelve con el aumento de la glucogenolisis (Tigas, 2002).

2.2. VITAMINAS

El contenido en vitaminas de la leche materna trata de cubrir los requerimientos adecuados para el lactante y sus valores van a depender del estado de nutrición y del aporte de vitaminas que recibe la madre, que en gran parte está en relación con los hábitos alimentarios de diversas áreas geográficas y por lo tanto pueden mostrar una gran variabilidad (Picciano, 1995; RDA, 2002). Además, las concentraciones de determinadas vitaminas en leche humana como α -tocoferol, disminuyen conforme se aumenta en la edad lactacional, con unas cantidades ligeramente superiores en leche de transición con respecto a la leche madura.

En cuanto a las concentraciones de retinol y caroterol en suero y leche humana son similares y están correlacionadas con la dieta que se ingiere (Canfield, 1995; Lammi-Keefe, 1995; Canfield, 1997; Lietz, 2001).

Los valores séricos de vitamina B₁₂ generalmente son más bajos en los vegetarianos que en los no vegetarianos, de modo que los lactantes alimentados con leche materna de madres con dieta Vegan pueden presentar deficiencias en vitamina B₁₂ si no reciben los correspondientes suplementos exógenos (Armstrong, 1974; MacLean, 1980).

La ingesta de vitamina C repercute positivamente tanto en sus niveles plasmáticos durante el embarazo como en leche materna; por tanto es importante instar al consumo de verduras y fruta a estas mujeres. Las mujeres fumadoras tienen niveles plasmáticos similares a las no fumadoras, pero su cantidad en leche materna es mayor en éstas últimas. (Ortega, 1998a).

El contenido de vitamina D en leche materna en algunos casos puede ser bajo y provocar la aparición de raquitismo. Una exposición materna al sol aumenta la composición de ésta en la leche humana (Brown, 1972; Harrison, 1987).

Se sabe que la vitamina E posee una actividad antioxidante importante y su acción sobre los AGPI-CL. Esta vitamina puede inhibir la peroxidación de los lípidos, reducir el riesgo de anemia hemolítica y otras patologías en los recién nacidos y especialmente en los prematuros (Haglund, 1991; Cho, 1994). Las concentraciones de antioxidantes en leche humana definen probablemente el grado de protección que puede ofrecer frente a la peroxidación. Las mujeres fumadoras poseen una concentración de vitamina E y lípidos significativamente más baja en leche madura que las mujeres no fumadoras (Kelly, 1990; Ortega, 1998b). Las concentraciones de las vitaminas A y E en leche materna están relacionadas con la dieta (Olafsdottir, 2001, Canfield, 2001).

Se ha sugerido la posibilidad de que el Colesterol intervenga en la secreción de vitamina K en el calostro, ya que existe una correlación entre ellos; esto no se ha demostrado con los PL ni con los lípidos totales. En leche madura, la cantidad de esta vitamina depende principalmente de la ingesta dietética materna (von Kries, 1987).

2.3. MINERALES

Se ha determinado que no existe influencia del ejercicio sobre la concentración de minerales y electrolitos en la leche humana (Fly, 1998).

Se han observado concentraciones menores de calcio en leche madura respecto a la de transición lo que puede ser modificado si durante el embarazo la mujer recibe un suplemento en calcio. Se ha demostrado que un suplemento diario de calcio de hasta 1000 mg no afecta a las concentraciones de calcio en leche materna, ya que en caso

de déficit, éste se ve compensado con un intercambio mineral con el hueso u otros lugares corporales de la madre (Ortega, 1998b; Pretince, 1998; Laskey, 1998).

Los niveles de hierro y cobre presentes en la leche materna no dependen de la dieta materna, infecciones concomitantes, consumo de anticonceptivos orales o tabaco (Dorea, 2000)

Una ingesta diaria de folatos de 380 μg no es la cantidad adecuada para satisfacer la demanda requerida por el lactante, pero sin embargo la cantidad de folatos en la leche materna se mantendrá constante a costa de una disminución en el estado nutricional de las madres lactantes. Esto se solventará con una suplementación en la madre de 1 mg de folato (Ortega, 1998c).

En la lactancia precoz, existe una mayor excreción de cinc (Zn) a la leche y sus niveles se mantienen relativamente constantes a pesar de una baja ingesta en este elemento. Una suplementación de cinc en la dieta materna contribuye a mantener altas concentraciones en leche humana, encontrando una relación entre el aporte de Zn y los valores en la leche materna. De modo que los niños alimentados con leche humana de madres con aporte adecuado de cinc no es necesario un suplemento del mismo (Vuori, 1980; Feeley, 1983; Karra, 1989; Krebs, 1995; Ortega, 1998c; Wauben, 1999).

2.4. OTROS MICRONUTRIENTES

La dieta materna es un condicionante fundamental en la cantidad de Yodo en leche materna, según distintos estudios llevados a cabo entre mujeres coreanas, con ingesta diaria elevada de algas marinas (Moon, 1999). Ese yodo transferido al lactante es esencial para su desarrollo físico y mental (Semba, 2001).

En cuanto al selenio (Se) presente en la leche, su concentración no se relaciona con la época de la lactancia, dieta o índice de masa corporal (Bianchi, 1999). Otros estudios han comprobado la disminución de las cantidades de Se conforme avanzaban los días de lactancia, desde el calostro a la leche madura (Li, 1999, Tamari, 1999). Parece existir una correlación negativa entre el Zn y el Se en la leche materna (Bratter, 1997). En Polonia, se ha comprobado que los recién nacidos reciben una cantidad diaria de Se inferior a la recomendada, en parte debido al bajo

contenido de este elemento en el suelo y, consiguientemente, en los alimentos de esta región (Zachara , 2001).

PARTE IV: ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS

1. VITAMINA E

La vitamina E fue descubierta por Evans y Bishop en 1922, cuando observaron que ratas, alimentadas con una dieta deficiente en determinados lípidos, desarrollaban un fallo en el sistema reproductor (Evans, 1922). En 1931 fue descrita la función antioxidante de la vitamina E (Olcott, 1931). Cinco años más tarde, se consiguió aislar el tocoferol (Evans, 1936) y Karrer ese mismo año consiguió su síntesis. Posteriormente se establece el papel protector que la vitamina E sobre la peroxidación “in vivo” de los ácidos grasos poliinsaturados (Filer, 1946).

En 1938 se realiza el primer ensayo clínico con la administración terapéutica de vitamina E a recién nacidos prematuros observando un efecto positivo sobre la ganancia de peso (Windernbauer, 1938). Desde entonces son muchos los estudios que se han realizado sobre vitamina E, tanto en lo referente a efectos terapéuticos como en absorción, transporte plasmático, depósitos tisulares y metabolización.

1. 1. DEFINICIÓN

El término de vitamina E hace referencia a dos grupos de compuestos, los tocoferoles y los tocotrienoles. Se tratan de aceites viscosos, en estado natural, amarillentos y fácilmente solubles en solventes orgánicos y en grasas, e insolubles en agua. En ausencia de oxígeno son estables frente al calor, la luz, los ácidos y las bases. Su oxidación da lugar a diferentes productos como el tocoperóxido, la tocoferilquinona y la tocoferilhidroquinona, además de la formación de polímeros (Bhagavan, 1983; Stryer, 1985).

La vitamina E es muy inestable, lo que dificulta el almacenamiento, pero su estabilidad puede verse aumentada de manera importante cuando se esterifica el grupo hidroxilo con el ácido acético o con el ácido succínico. Se forman así las moléculas de acetato y succinato de α -tocoferol, que son las formas comerciales de la vitamina

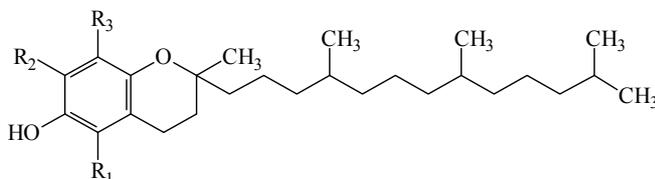
E. Estos compuestos carecen de actividad antioxidante, pero son hidrolizados en el intestino antes de su absorción, obteniéndose así las formas activas (Bhagavan, 1983; Stryer, 1985).

1.2. ESTRUCTURA

La vitamina E pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles junto a las vitaminas A, D y K. Dentro del termino vitamina E se incluyen distintos compuestos que están relacionados químicamente: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Entre ellos existen diferencias tanto en la estructura química como en el grado de actividad biológica (Stryer, 1985).

Los tocoferoles son el grupo más destacado, formado por el α -, β -, γ - y δ - tocoferol. Se trata de un núcleo fenólico (benzopirano o cromano), sustituido en la posición 2 por una cadena lateral saturada (Fernholz, 1938; Morisot, 1984; Diem, 1975), y un grupo hidroxilo que puede estar esterificado o no, pero debe estar libre para que el compuesto manifieste actividad vitamínica.

Figura 1. Fórmula del tocoferol:



Compuesto	R ¹	R ²	R ³
α -Tocoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -Tocoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ -Tocoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ -Tocoferol	H	H	CH ₃

La diferencia entre α -, β -, γ - y δ -tocoferol radica en la posición y el número de los grupos metilo en el anillo fenólico y la saturación de la cadena lateral de la molécula (Stryer, 1985).

Por su estructura fenólica presenta capacidad antioxidante ya que permite la estabilización de radicales libres. La liposolubilidad viene dada por

la cadena lateral de ácidos grasos y es esta la que facilita la retención de la vitamina E por las membranas biológicas (Fritsma, 1983).

La forma más activa es el α -tocoferol (5-7-8 trimetiltocol) responsable del 90% de la actividad en tejidos animales (Leboulanger, 1981; Farrell, 1985; Lemons, 1985; Aranda, 1986). Se ha visto que la forma sintética es menos activa que la forma aislada de las plantas. Esto es debido a que la molécula presenta varios centros asimétricos, que dan lugar a estereoisómeros durante la síntesis (Diplock, 1985; NRC, 1989).

1.3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS

La función más evidente es la de actuar como agente antioxidante y antirradical libre. Además, se ha visto que interviene en la cascada del Ácido araquidónico y también tiene una acción como regulador genético (Blake, 1995).

1.3.1. Función antioxidante

Los tocoferoles actúan como antioxidantes tanto “in vivo” como “in vitro” (Diem, 1975; Burton, 1983; Romero, 1992). Son los principales antioxidantes liposolubles del organismo (Benzie, 1996)

La vitamina E pertenece al grupo de antioxidantes que actúan en la *fase de propagación*, de la peroxidación lipídica, rompiendo la cadena de reacciones de la peroxidación (Burton, 1989; Packer, 1993).

La acción antioxidante de la vitamina E se debe a una serie de mecanismos moleculares. Se produce una sustracción del hidrógeno de los tocoferoles (α -TOH) por un radical peroxi ($\text{ROO}\cdot$) formándose un hidroperóxido lipídico (ROOH). Esta pérdida del hidrógeno transforma al tocoferol en un radical (α -TO \cdot) más estable a causa del anillo aromático, evitando así la propagación de la peroxidación (Doba, 1984). Se produce así una acción amortiguadora de los radicales no lipídicos (Roberts, 1987).



La vitamina E captura radicales peroxilo con una avidez 10000 veces mayor que la capacidad que tienen estos radicales de atacar a los ácidos grasos (Bloomgarden, 1997). Se cree que se sitúa por debajo de la membrana (Aranda, 1989; Fukuzawa, 1993).

La vitamina E protege principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados situados en las membranas biológicas (Giasudin, 1981; Urana, 1990). Se ha visto en casos de déficit, cómo la membrana del eritrocito se destruye con cierta facilidad y exhibe alteraciones morfológicas, posiblemente causadas por interacciones de las proteínas que se alojan en la matriz lipídica que constituye la propia membrana (Linder, 1985). Además de actuar frente a los ácidos grasos, la vitamina E protege de la oxidación a enzimas, proteínas, moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Fraga, 1989; Packer, 1991), y a la vitamina A, carotenos y a otras sustancias portadoras de grupos “tiol” (Leboulanger, 1981; Subramanian, 1986; Sies, 1992). A pesar de tener una pequeña concentración molar en las membranas, la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble que actúa interrumpiendo la peroxidación en cadena (Burton, 1989; Packer, 1993). El α -tocoferol está localizado en las regiones de la membrana con AGPI.

Debido a que la vitamina E se encuentra en una concentración muy baja existen moléculas que actúan regenerando o impidiendo la oxidación del tocoferol. Existe una media de seis moléculas de α -tocoferol por cada molécula de lipoproteína de baja densidad (LDL) (Esterbauer, 1992). Su acción antioxidante se ve aumentada por la acción regeneradora de otras sustancias como la vitamina C que se encuentra en plasma (Doba, 1985; Chen, 1989; Packer, 1992; Bloomgarden, 1997). Se produce así una acción sinérgica entre las vitaminas E y C gracias a la capacidad de la vitamina C de reducir el radical tocoferoxi de nuevo a α -tocoferol en la interfase, regenerando la vitamina E, e incrementando de este modo la efectividad de la misma (Packer, 1979; Niki, 1985; Chen, 1989; May, 1996). Por su parte, la vitamina C oxidada puede ser reducida por los grupos tiol de las proteínas, el glutatión y posiblemente el ácido úrico (Sevanian, 1991; Meister, 1992; Frei, 1993).

Algunos autores han intentado establecer un tipo y/o una cantidad de antioxidantes (v.g. tocoferol) que puedan revertir los efectos deletereos de las moléculas organocloradas (Wang, 2001). En un ensayo realizado también *in vitro* sí se logró minimizar la peroxidación derivada de la exposición al lindano o metoxicloro, gracias a la adición de alfa-tocoferol al cultivo celular (Krieger, 2001; Latchoumycandane, 2002).

Otros sistemas como el coenzima Q10 reducido, el citocromo C, o el NADH-citocromo B5 son capaces de actuar como antioxidantes del α -tocoferol (Maguire, 1992; Constantinescu, 1993; Crane, 1997).

1.3.2. Otras funciones.

Por un mecanismo, no del todo independiente de la actividad antioxidante, la vitamina E resultaría esencial para mantener la integridad y funcionalidad de las membranas plasmáticas (Giasuddin, 1981; Aranda, 1986; Urano, 1992), al controlar de manera estereoespecífica los perfiles de los fosfolípidos y la fracción del colesterol libre de las membranas celulares (Erin, 1985). Se ha visto en animales que presentan una acción protectora de las membranas frente a las fosfolipasas nocivas, especialmente la fosfolipasa A, y frente a los productos de hidrólisis de los fosfolípidos producidos por la fosfolipasa A (Erin, 1984; Salgado, 1993).

Junto a otros antioxidantes de la dieta, el tocoferol también interviene en la reducción del deterioro de las funciones fisiológicas y el riesgo de enfermedades crónicas a través de su influencia en la respuesta inmunitaria (Blumberg, 1993).

El tocoferol podría jugar un papel específico en el transporte de electrones de la cadena respiratoria en la mitocondria, siendo un catalizador de la respiración o un regulador específico de las concentraciones de enzimas y cofactores en la misma (Stockman, 1977).

Interviene como modulador en la cascada del ácido araquidónico iniciada por la lipooxigenasa y/o la ciclooxigenasa (Pentland, 1992;

Chan, 1993; Niki, 1993). Otros autores sugieren que la vitamina E reduce la agregación plaquetaria por un mecanismo que no está regido por una interacción específica entre el tocoferol y receptores específicos en las plaquetas (Steiner, 1991; Steiner, 1997).

La vitamina E podría regular alguna vía de transferencia de información genética, como por ejemplo la síntesis de las proteínas específicas y de los enzimas requeridos en la diferenciación o adaptación de determinados tejidos (Lebenthal, 1982; Farrell, 1985).

Existen indicios de que el tocoferol puede estar relacionado con la regulación genética de la adhesión de monocitos en el endotelio (Faruqui, 1994; Martin, 1997) y actuar así como regulador genético de la proliferación de células del músculo liso en la placa de ateroma (Chatelain, 1993; Azzi, 1995).

Se ha visto en cultivos celulares, que la vitamina E y en particular el d- α -tocoferol es capaz de aumentar los niveles de prostaglandina I₂ (PGI₂) producidos por las células de músculo liso aórtico, facilitando así la acción vasodilatadora de la PGI₂. En diabetes se produce un aumento de los agentes vasoconstrictores, como el tromboxano A₂, mientras que disminuyen los niveles de vasodilatadores. Esto puede deberse a un aumento de radicales libres. Así el tratamiento con vitamina E en pacientes diabéticos puede restaurar los niveles de prostaglandinas en las paredes de los vasos sanguíneos (Bloomgarden, 1997).

1.4. INGESTA DIETÉTICA DE VITAMINA E

La dosis diaria recomendada (RDA) (Brody, 1994) para adultos es de 10 mg de α -tocoferol, o su equivalente biológico. También es importante señalar la RDA en niños puesto que es en esta población donde se suele producir deficiencia de vitamina E. La RDA en recién nacidos es de 3 mg de α -tocoferol, o su equivalente (Brody, 1994). Para la mujer lactante, la cantidad diaria de vitamina E recomendada en la dieta es de 15 mg (RDA, 2002).

Una buena fuente de vitamina E son los aceites vegetales: aceite de maíz, soja y cacahuete. Las grasas animales como las mantecas y mantequilla tienen menores cantidades de vitamina. La cantidad diaria de vitamina E que se ingiere está alrededor de 10 mg (Brody, 1994).

Tabla I. Cantidad de Vitamina E en distintos alimentos (Brody, 1994)

Alimento	α-tocoferol ¹
Aceite de semilla de trigo	120
Aceite de girasol	50
Aceite de maíz	16
Pescado, huevos y ternera	0.5-2.0

¹ mg de tocoferol/100mg alimento

Determinación del estado nutricional de vitamina E

Para valorar el estado nutricional de esta vitamina hay que tener en cuenta numerosos factores, tales como la concentración de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, lipoproteínas, grado de eliminación del plasma y de almacenamiento en los tejidos. Por tanto, no es suficiente con obtener un único valor aislado de su concentración plasmática (Bieri, 1972; Farrell, 1985; Karp, 1986). También existen variaciones con el embarazo, con el estado nutricional y con la edad (Molina, 1986; Bayes, 1986). Si aumentan los lípidos en plasma, aumentan las concentraciones plasmáticas de tocoferol, movilizado desde los almacenamientos tisulares, principalmente de los eritrocitos (Omaye, 1986; Valverde, 1987). Así, se considera como mejor indicador del estado nutricional de la vitamina E el índice vitamina E/lípidos totales (Horwit, 1972).

Para la valoración del estado nutricional de la vitamina E se utilizan las concentraciones en hematíes y en plaquetas (Lehmann, 1988; Mino, 1989). Las concentraciones de vitamina E en las membranas biológicas son independientes de los lípidos plasmáticos y se correlacionan con el índice tocoferol plasmático/lípidos totales plasmáticos (Kitagawa, 1983; Vatassery, 1983; Mino, 1985a). Se ha visto en estudios realizados con ratas que la concentración de vitamina E en eritrocitos está relacionada con los depósitos hepáticos de vitamina E (Mino, 1985a).

En las tablas II y III quedan relacionados los valores medios de las concentraciones de α -tocoferol en suero, plasma o eritrocitos publicadas por diferentes autores.

Tabla II. Valores medios de las concentraciones de α -tocoferol en suero (Herberg, 1994; Ito, 1990; Olmedilla, 1997) o en plasma (Schneider, 1995; Morinobu, 1994; Fernandez-bañares, 1993; Ascherio, 1992) en diferentes países (Olmedilla, 1997).

α -TOCOFEROL(μ g/ml)		
PAIS (ref.) ¹	MUJER	HOMBRE
Francia (Herberg, 1994) 442H/552M, 6-97 a	10.1	10.5
Alemania (Schneider, 1995) 862H/1144M, 18-50 a	12.6	12.6
Japón (Morinobu, 1994) 65H/60M, 22-86 a	7.2	7.9
Japón (Ito, 1990) 618H/1196M, 7-86 a	9.9	10.4
España (Olmedilla, 1997) 210H/240M, 5-79 a	12.3	12.0
España (Fernandez-Bañares, 1993) 52H/62M, 18-82 a	11.1	10.6
Estados Unidos (Ascherio, 1992) 121H/186M, 45-65 a	11.7	11.3

¹ La población estudiada está descrita por sexos (hombre, H y, mujer, M) y rango de edad (años, a).

Tabla III. *Valores medios de las concentraciones de α -tocoferol en eritrocitos en adultos de diferentes países.*

PAIS(ref.)	Casos	α -TOCOFEROL($\mu\text{g/ml}$)
USA (Lehmann, 1984)	16	2.14 \pm 0.06
USA (Mino, 1985b)	26	1.76 \pm 0.09
USA (Lehmann, 1988)	20	2.19 \pm 0.04
USA (Chow, 1989)	14	2.70 \pm 0.01
España (Sierra, 1992)	46	1.75 \pm 0.03
Japón (Saito, 1992) (universitarios)	20	0.96 \pm 0.19

1.5. METABOLISMO DE LA VITAMINA E

1.5.1. Absorción

La vitamina E se absorbe en el intestino junto con los lípidos y está directamente relacionada con la capacidad de digerir y absorber grasas (Lubraro, 1990). La absorción de lípidos y vitaminas liposolubles a nivel intestinal depende de la función pancreática, de la secreción biliar, de la formación de micelas y del transporte a través de las membranas intestinales (Muller, 1974; Muller, 1976; Hollander, 1981). Hay una incorporación posterior a los quilomicrones y un transporte hacia la circulación a través de la linfa.

En la luz intestinal la vitamina E se solubiliza con las grasas, formándose micelas en presencia de sales biliares (Gallo-Torres, 1970). Posteriormente sufre una hidrólisis enzimática, habiéndose demostrado la existencia de una enzima hidroxilasa libre, de origen pancreático, y otra presente en el borde de cepillo del epitelio intestinal (Mathias, 1981). La acción de los enzimas hidrolíticos va a depender de la concentración de ácidos biliares intraluminares (Valverde, 1987).

Los triglicéridos de cadena media aumentan la absorción del α -tocoferol (Gallo-Torres, 1971); los AGPI-CL poseen un efecto inhibitorio debido a que son capaces de oxidar al α -tocoferol *in vivo* (Bjorneboe, 1987).

ha demostrado que la eficacia de la absorción de la vitamina E por el intestino disminuye proporcionalmente al aumento de la cantidad de vitamina E ingerida (Farrell, 1985; Traber, 1986). En general el coeficiente de absorción del α -tocoferol varía de manera muy amplia, oscilando entre un 10-40%, esto va a depender del preparado de tocoferol que se considere y de la capacidad individual para la absorción y digestión de grasas (Schwarz, 1983; Traber, 1986; Bjorneboe, 1990; Cohn, 1992).

1.5.2. Transporte

El α -tocoferol llega a la circulación general a través del conducto torácico (Farrell, 1985). Aproximadamente el 99% del α -tocoferol en linfa es transportado asociado a los quilomicrones, y en menor medida a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Bjorneboe, 1986). Aproximadamente un 35% de la vitamina E ingerida pasa a la circulación general por la vía linfática, el resto se elimina por heces (Leboulanger, 1981; Bieri, 1987). A diferencia del retinol y del colesterol, el α -tocoferol no es reesterificado durante la absorción intestinal, comportándose de manera similar a las vitaminas D y K.

Aún no se conoce bien la manera en que el α -tocoferol es transportado desde el borde de la membrana del cepillo del enterocito al complejo de Golgi para incorporarse a los quilomicrones. Pueden estar

involucrados procesos de endocitosis, difusión pasiva o transporte mediado por proteínas (Cohn, 1992; Drevon, 1993).

Cuando la vitamina E pasa al plasma unida a los quilomicrones rápidamente se transfiere a otras lipoproteínas (Bjorneboe, 1990), mientras estos son catabolizados por una lipoproteinlipasa ligada a la pared endotelial (Burton, 1993).

La vitamina E está presente en todas las lipoproteínas produciéndose una transferencia de la misma entre las lipoproteínas, en la que podría intervenir una proteína de transferencia de fosfolípidos (Kostner, 1995). En humanos, las LDL y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) representan las clases más abundantes de lipoproteínas y son las transportadoras más importantes de vitamina E en la sangre (Behrens, 1982; Ogihara, 1988).

El α -tocoferol también es transportado por los eritrocitos y las plaquetas. En el caso de los eritrocitos sólo se encuentra en la membrana de los mismos. Los niveles de vitamina E en hematíes son inferiores a los que se encuentran en el plasma (Burton, 1985).

1.5.3. Distribución

Los tejidos y órganos diana más importantes de depósito de tocoferol son pulmón, hígado, tejido adiposo, componentes sanguíneos, músculo esquelético, corazón, sistema endocrino-glandular (suprarrenales, hipófisis, testículos), útero y sistema nervioso (Leboulanger, 1981; Farrell, 1985; Kaseki, 1986; Valverde, 1987). Los adipocitos tienen gran parte del tocoferol corporal, pero se duda de la posibilidad de que la vitamina E presente en este tejido pueda ser utilizada por otros tejidos en un momento dado, ya que se ha visto que cuando se administra una dieta pobre en vitamina E, aunque los niveles de tocoferol en tejido adiposo permanecen altos, las concentraciones séricas de tocoferol disminuyen con rapidez (Bieri, 1972; Farrell, 1985).

La mayoría del α -tocoferol se acumula en el hígado (75% en células parenquimatosas y 25% en células no parenquimáticas), aunque también lo hace en otros tejidos como el tejido adiposo y el músculo estriado (Machlin, 1980).

El α -tocoferol se encuentra en las fracciones celulares más ricas en membranas tales como las mitocondrias y en el retículo endoplasmático (Cohn, 1992).

1.5.4. Excreción

La vitamina E es excretada por las heces vía biliar, mayoritariamente en su forma libre, aunque también en sus formas oxidadas (ácido tocoferónico, tocoferil-quinona y tocoferonolactona). El principal producto de oxidación hepática del α -tocoferol es la α -tocoferilquinona. Este producto posteriormente es reducido a la hidroquinona, la cual puede conjugarse con el ácido glucurónico y excretarse en la bilis o degradarse a ácido α -tocoferólico, conjugarse y eliminarse por la orina (Drevon, 1993).

1.6. DEFICIENCIA DE VITAMINA E

La deficiencia de vitamina E es bastante rara. Puede darse en personas con síndromes de malabsorción de grasas [fibrosis quística, coléctasis hepática, cirrosis hepática en adultos, insuficiencia pancreática, enfermedades que impiden la actuación de las lipoproteínas (β -lipoproteinemias)]. La deficiencia puede producir disminución de la vida media de los eritrocitos (“life span”), aumentar su adhesividad al endotelio, hipercoagulación, miopatías o disfunciones neurológicas como ataxia, falta de reflejos, disminución de la sensación vibratoria, y parálisis de los músculos del ojo (Drevon, 1993). La terapéutica incluye la administración de vitamina E durante meses.

En la colestasis biliar de la infancia, la deficiencia de vitamina provoca síntomas severos como la incapacidad para andar. La deficiencia en recién nacidos está asociada a la anemia hemolítica. La deficiencia de vitamina E también ha sido relacionada con el desarrollo de displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular en el cerebro y fibroplasia retrolental. Además, alteraciones en el estado de vitamina E han sido asociadas a la aparición de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y afectaciones en el sistema inmune (Drevon, 1993).

2. VITAMINA A

A principios de este siglo, en 1909, Strepp descubrió la existencia de una sustancia liposoluble en la yema del huevo, esencial para la vida. Posteriormente, se estableció el hecho de que uno de los elementos nutritivos esenciales que faltaban en las dietas purificadas era soluble en las grasas (McCollum, 1957; Osborne, 1913). En 1919 se descubrió que los boniatos amarillos y las zanahorias sostenían el crecimiento normal y proporcionaban inclusive una cantidad suficiente de la sustancia desconocida, para la reproducción (Steenbock, 1919). Este elemento nutritivo se asoció al color amarillo. Diez años después, científicos alemanes e ingleses demostraron que el caroteno cristalino tenía valor de vitamina A.

2.1. DEFINICION

Vitamina A es un término genérico que designa aquellos compuestos con estructura “ β -ione” que presentan la actividad biológica del retinol. En la dieta, la Vitamina A se encuentra solo en productos animales, principalmente en hígado, huevos y leche. Las formas precursoras de la vitamina A son los carotenoides que tienen actividad biológica de vitamina A después de convertirse en retinol en el intestino; los más importantes son: β -caroteno, α -caroteno y criptoxantina. Estos están presentes principalmente en vegetales verdes y amarillos y en la fruta (Gerster, 1997).

La actividad de la vitamina A se expresa en unidades de peso: Equivalentes de retinol (RE). $1\mu\text{g}$ de RE corresponde con $1\mu\text{g}$ de retinol. Antiguamente se definía en Unidades Internacionales (IU) que corresponden a $0.3\mu\text{g}$ de retinol (Gerster, 1997).

Todos los compuestos relacionados estructuralmente con la vitamina A se llaman retinoides y se incluyen todas las formas naturales de la vitamina A y los compuestos naturales y sintéticos que pueden tener o no actividades biológicas de vitamina A. Los carotenoides no están incluidos dentro de los retinoides (Gerster, 1997).

Tabla IV. *Compuestos con actividad vitamina A y sus relacionados.*

Equivalencia de los compuestos Vitamina A	
	1 µg retinol (3.33 IU)
1 µg RE	6 µg beta-caroteno
	12 µg otros carotenoides provitamina A
1 µg retinol	1 µg RE
1 µg beta-caroteno	0.167 µg RE
1 µg otras provitaminas A	0.084 µg RE

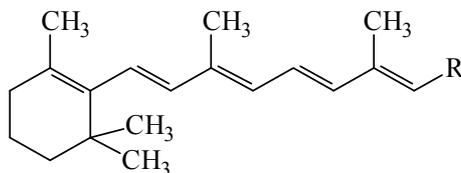
RE: equivalentes de retinol

2.2. ESTRUCTURA

Las sustancias con características de vitamina A son los compuestos derivados de los carotenos que muestran actividad biológica del denominado "todo trans-retinol". Su estructura química quedó definida en 1931 por Karrer (Thiers, 1956) y fue Isler quien formuló su síntesis en 1947 (Isler, 1970). El término de vitamina A abarca una serie de sustancias esenciales para la visión, el crecimiento, la diferenciación y proliferación celular, la reproducción y la integridad del sistema inmunológico (Goodman, 1984; Olson, 1984; Sporn, 1984).

La vitamina A es un alcohol de cadena larga que se encuentra principalmente en forma de ésteres de ácidos grasos. Es insoluble en agua y soluble en éter, cloroformo, acetona, grasas y aceites. Se degrada rápidamente por acción de la luz, el oxígeno y los ácidos.

Figura 2. Fórmula de la vitamina A:



<i>Compuesto</i>	<i>R</i>
Retinol	CHOH
Retinal	CHO
Acido Retinoico	COOH

La vitamina A es activa en numerosas formas químicas distintas, tales como aldehído (retinal), alcohol (retinol) y ácido (ácido retinoico) (Stryer, 1985).

2.3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS

La Vitamina A participa en varios mecanismos importantes para el organismo humano, entre ellos podemos destacar su papel en la diferenciación de las células epiteliales, en el sistema reproductor (crecimiento fetal y mantenimiento de los testículos) y su participación en el ciclo visual.

De las distintas formas de vitamina A, parece ser que el ácido retinoico solo participa en el mantenimiento del crecimiento normal y la diferenciación de los tejidos (Blaner, 1994). Se ha visto, que animales tratados con ácido retinoico, como única fuente de vitamina A, sufren pérdida de visión nocturna y se convierten en estériles. Además el ácido retinoico no puede ser almacenado en el hígado al carecer del grupo hidroxilo necesario para unirse a los ácidos grasos. El retinol, el retinal y los ésteres de retinol son convertibles entre sí. Estas tres formas se pueden convertir en ácido retinoico, pero el ácido retinoico no puede reducirse a retinal.

2.3.1. Diferenciación celular

El ácido retinoico juega un papel importante en la morfogénesis donde es necesario en cantidades fisiológicas para la correcta formación de los miembros en las fases tempranas de la embriogénesis (Eichele, 1992).

En ausencia de vitamina A, las células basales tienden a convertirse en células queratinizantes formando así un epitelio escamoso, que perjudica a distintos órganos (Rosenthal, 1994). A partir de las células basales se forman las distintas células del epitelio: las células secretoras de moco, que son blandas y húmedas, y las células

queratinizantes que son escamosas y duras. En el sistema respiratorio la formación de células queratinizantes reduce la resistencia de la superficie a las infecciones; se pueden dar casos de neumonía e incluso puede producirse la muerte por esta deficiencia. También puede afectar a la visión; la cornea puede cicatrizar, la conjuntiva sufre pigmentación y endurecimiento; puede llegar a producirse xeroftalmia y finalmente ceguera como resultado de los cambios en la diferenciación celular en la superficie del epitelio (Gerster, 1997). Las células epiteliales de la glándula olfatoria se pueden queratinizar perdiendo así olfato. En el intestino sucede lo mismo, disminuyendo la resistencia a organismos patógenos (Brody, 1994).

2.3.2. Efectos hormonales

Después de entrar en la célula tanto el retinol como el ácido retinoico se unen a distintas proteínas citoplasmáticas, que son su medio de transporte dentro de los distintos compartimentos de la célula. Su función hormonal se lleva a cabo en el núcleo celular, donde también se une a proteínas que regulan el control genético. El complejo proteína-vitamina se une a regiones específicas de la cromatina y provoca así cambios en la transcripción de determinados genes (Brody, 1994).

La vitamina A puede provocar cambios en el metabolismo independientemente de la regulación genética. Estos cambios parecen estar involucrados en la formación de glicoproteínas (Brody, 1994)

2.3.3. Actuación en la visión

La vitamina A participa muy activamente en el proceso de la visión nocturna. La forma 11-cis-retinal se une covalentemente a la opsina (una proteína de 38000 daltons de peso molecular) mediante la formación de una base de Schiff entre el grupo ϵ -amino de un resto de lisina y el grupo aldehído del retinal, formándose así la rodopsina. La luz induce la conversión del 11-cis-retinal en todo-trans-retinal, fenómeno que se conoce como "blanqueamiento" de la rodopsina. Ésta se disocia iniciando el ciclo en la fase oscura. El todo-trans-retinal se transforma en todo-trans-retinol y a través de distintas enzimas se transforma de nuevo en 11-cis-retinal, capaz de unirse a la opsina, y comenzar de nuevo el ciclo (Herrera, 1989; Gerster, 1997). Esto sucede en unas estructuras del ojo llamadas bastones, encargadas de la visión nocturna.

2.4. INGESTA DIETETICA DE VITAMINA A

Son muchos los factores que influyen en la captación de vitamina A y carotenoides de la dieta: la cantidad de retinol circulante en plasma, cantidad de retinol almacenada en hígado, la composición grasa de la dieta, la cantidad de vitamina presente en los alimentos y la preparación de los mismos. Todo esto produce grandes variaciones y diferencias interindividuales que dificultan la obtención de datos fiables sobre la ingesta de vitamina A (Maisey, 1995). A esto hay que sumar que son pocas las personas que consumen hígado, el alimento más rico en vitamina A y además lo consumen con irregularidad. La ingesta de carotenoides puede variar con las estaciones del año, debido a la estacionalidad de las frutas y verduras (Basu, 1994).

En otro estudio realizado en 18 ciudades de 12 países europeos, se observó una gran variabilidad en la ingesta de retinol y carotenoides en los distintos países de Europa, en personas mayores. En los países del norte era mayor el consumo de vitamina A que en los países del sur, sin embargo, sucedía lo contrario con los carotenoides, con un mayor consumo por los países del sur de Europa, en parte para compensar las menores ingestas de retinol (Euronut Seneca Investigator, 1991).

En un gran estudio dietético realizado en los Estados Unidos se confirman los datos obtenidos en Alemania que indican que el nivel socioeconómico influye en el consumo total de vitamina A (Gerster, 1997).

Dentro de los grupos de riesgo, con ingesta insuficiente de vitamina A se encuentran las mujeres jóvenes que siguen una dieta baja en calorías (Crawley, 1995). En el estudio realizado en Alemania (NVS), los jóvenes presentaban un alto riesgo de ingerir cantidades insuficientes de vitamina A, especialmente los hombres durante el invierno y la primavera (Heseker, 1991). Y en general, las personas con bajos ingresos, tienen un mayor riesgo de consumir bajas cantidades de vitamina A.

2.4.1. Recomendaciones oficiales para la ingesta dietética de vitamina A (RDA).

A pesar de la cantidad de estudios realizados sobre vitamina A durante todos estos años, no existe un consenso internacional en los requerimientos nutricionales diarios de vitamina A "para mantener la

salud prácticamente a todas las personas sanas de una población". Sin embargo las recomendaciones en la RDA de 2002 se concretan en 770 µg por día en el caso de mujeres en época de lactancia (RDA, 2002).

Tabla V. Recomendaciones dietéticas para la ingesta de vitamina A (µg RE)

	FAO/WHO (1988) Basal seguridad ²	NRC (1989) Estados Unidos ¹	DGE (1991) Alemania	DRV Panel (1991) ³ Reino Unido	SCF (1992) Unión Europea
Niños⁴					
0-1 a	180	350		350	
1-2 a	200	400	375	500-600	400 (1-3 a) 350
2-6 a	200	400	400	600 (1-3 a)	500 (4-6 a) 400 (1-3 a)
6-10 a	250	500		700 (4-6 a)	500 (7-10 a) 400 (4-6 a)
	400	700		800 (7-9 a)	500 (7-10 a)
Hombres	300	500			600 (11-14 a)
10-12 a	300		1000	1100	600
Adl. y Adul	600		1000	1000	700 700
Mujeres	270	500			
Adl y Adul	370	600	800	800	600 600
Embarazo	550		800	800 ⁵	700 700
Lactancia	950		1300	1800	950 950

Adl: adolescentes; Adul: Adultos

¹ Los requerimientos basales son definidos como la cantidad mínima necesaria para prevenir los signos clínicos de deficiencia en una población sana.

² Una ingesta adicional proporciona al organismo una reserva de vitamina A que mantiene la salud durante periodos prolongados en los que la ingesta es menor o se presentan situaciones de estrés.

³ Las recomendaciones dietéticas en el Reino Unido han sido tradicionalmente menores que en el resto de países europeos y en Estados Unidos. Los valores se aproximan a aquellos de los países en desarrollo.

⁴ En los paréntesis hay diferentes grupos de edades en niños.

⁵ Se recomienda 1100 µg de RE a partir de la semana 14 de embarazo.

En los países en vías de desarrollo, la mayor fuente de ingresos dietéticos de vitamina A a través de la leche materna la constituyen los carotenoides, contribuyendo al efecto inmunoprotector de la lactancia materna. Se ha constatado que las mujeres de estos países toman menos de la mitad de vitamina A en su dieta que las de países desarrollados y, por tanto menos de lo recomendado, por lo que la suplementación durante la época de la lactancia se ha considerado en múltiples estudios (Newman, 1994). Los ensayos realizados por Canfield et al. han demostrado que una única dosis de 60 mg de beta-caroteno es capaz de elevar los niveles de éste en suero y en leche materna, sin afectar a otros carotenoides, retinol o alfa-tocoferol (Canfield, 1997). Estudios posteriores suplementan a las mujeres lactantes con 30 mg de beta-caroteno al día durante 4 semanas, lo cual condujo a un aumento de éste 6,4 veces en leche materna y 7,4 veces en suero, sin afectación de otros carotenoides, retinol o alfa-tocoferol. Este ascenso se mantiene hasta aproximadamente 1 mes después de la suplementación, con lo que el niño lactante ingiere una mayor concentración de esta vitamina (Canfield, 1998).

En la tabla V se muestran las diferencias existentes entre los distintos grupos de expertos, de diferentes países: FAO/WHO Expert Consultation Group (Joint FAO/WHO Expert consultation, 1988), la DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung) en Alemania (DGE, 1991), DRV panel (Panel on Dietary Reference Values) en Reino Unido (DRV PANEL, 1991), y la SCF (Scientific Committee for Food) en la Comunidad Europea (Comission of the European Communities, 1993).

2.4.2. Determinación del estado nutricional de vitamina A

En la tabla VI se ven reflejados los datos aportados por diferentes estudios de distintos países. En todos ellos el tamaño de la muestra fue mayor a 100 individuos y se separaron según sexo (Olmedilla, 1997).

Un estudio reciente realizado en animales ha demostrado una correlación negativa entre los niveles de contaminantes orgánicos persistentes (vg. DDT, PCB) y las reservas endógenas de vitamina A (Nyman, 2003).

Tabla VI. *Valores medios de las concentraciones de retinol en suero (Hercberg, 1994; Ito, 1990; Tee, 1994; Stacewicz, 1987) o en plasma (Thurnham, 1988; Morinobu, 1994; Fernandez-Bañare, 1993; Vuilleumer, 1983; Ascherio, 1992) en diferentes países (Olmedilla, 1997).*

RETINOL ($\mu\text{g/ml}$)		
PAIS(ref.) ¹	MUJER	HOMBRE
Francia (Hercberg, 1994) 442H/552M, 6-97 a	0.53	0.48
Japón(Morinobu, 1994) 65H/60M, 22-86 a	0.49	0.43
Japón(Ito, 1988) 618H/1196M, 7-86 a	0.83	0.67
Malasia(Tee, 1994) 58H/42M, 17-78 a	0.76	0.70
España(Olmedilla, 1997) 210H/240M, 5-79 a	0.53	0.44
España(Fernandez-Bañares, 1993) 52H/62M, 18-82 a	0.55	0.48
Suiza(Vuilleumier, 1983) 75H/75M, >18 a	0.67	0.50
Inglaterra(Thurnham, 1988) 944H/938M, adultos	0.63	0.54
Estados Unidos(Stacewicz, 1987) 55H/55M, 49-69 a	0.74	0.66
Estados Unidos(Ascherio, 1992) 121H/186M, 45-65 a	0.61	0.55

¹ *La población estudiada está descrita por sexos (hombre, H y mujer, M) y rango de edad (años, a).*

2.5. METABOLISMO DE LA VITAMINA A

2.5.1. Absorción

Las formas precursoras de la vitamina A se encuentran en alimentos animales en forma de ésteres. Los ésteres de retinol de la dieta deben hidrolizarse antes de ser absorbidos, de esto se encarga una hidrolasa presente en el jugo pancreático o en las vellosidades de las células de cepillo de la mucosa intestinal; la vitamina E favorece esta hidrólisis. Una vez en la mucosa del intestino delgado el retinol se esterifica con ácidos grasos de cadena larga, principalmente el ácido palmítico. Estos deben estar en su forma activa (palmitoil-CoA) y participan dos enzimas con actividad aciltransferasa: acil CoA-retinol aciltransferasa (ARAT) (Helgerud, 1982; 1983; Goodman, 1988) y lecitín-retinol aciltransferasa (LRAT) (ONG, 1987; MacDonald, 1988). McDonald y Ong encontraron que el retinol unido a la CRBP (tipo II) (proteína citoplasmática transportadora de retinol) es esterificado por LRAT, mientras que el retinol libre situado en las membranas es esterificado por la ARAT.

Los carotenoides (α - β - y γ - caroteno y criptoxantina), con actividad provitamina A, se absorben mediante difusión pasiva en el intestino delgado, ligados a sales biliares. En humanos lo hacen en una proporción de un 5 a un 50%. La absorción va a depender de la grasa de la dieta. Con una dieta "normal", 1/6 del β -caroteno y 1/12 de otros carotenoides con actividad provitamina A son absorbidos (Blomhoff, 1991).

Una vez en las células de la mucosa intestinal se dividen en dos unidades de retinal o bien en retinoides de cadena más larga que luego se convierten en retinol, que es esterificado por el enzima 15'15'-dioxigenasa, para unirse después a los quilomicrones. Una porción de los carotenoides puede ser dividida en una molécula de retinal y una molécula de apocarotenal (Gerster, 1997). El retinal es reducido en su mayoría a retinol, por la retinol deshidrogenasa, pero una pequeña parte del retinal es convertida posteriormente en ácido retinoico (Wang, 1991).

Los ésteres de retinol y los carotenoides que no han sido convertidos a vitamina A en el intestino pasan a formar parte de los quilomicrones transportados a través del sistema linfático; y de ahí al sistema circulatorio sanguíneo. Estos quilomicrones se convierten en

quilomicrones remanentes que son captados en su mayoría por el hígado. Sin embargo, una parte importante puede ser captada por otros tejidos, facilitando así la liberación de retinol y carotenoides al tejido adiposo, bazo, médula ósea, tejido pulmonar, músculo esquelético y riñón (Schwarz, 1983; Schrijver, 1991; Blomhoff, 1994a).

La absorción de retinol (70-90%) es más eficaz que la de los carotenoides (20-50%). Al aumentar la ingesta dietética de carotenoides disminuye la absorción pudiendo llegar a un 10%. La absorción también va a depender de la grasa de la dieta (Blomhoff, 1991).

2.5.2. Almacenamiento

Una mayoría de quilomicrones remanentes es captada por las células parenquimatosas del hígado mediante el reconocimiento de su apolipoproteína E por receptores específicos (Brody, 1994). Una vez captados los ésteres de retinol son liberados y rápidamente hidrolizados a retinol por una hidrolasa que ha sido descrita por Harrison y Gad (Joint FAO/WHO Expert consultation, 1988). El alcohol libre se moviliza, unido a una proteína específica plasmática (la proteína transportadora del retinol, RBP) que lo transporta a las "células estrelladas" del hígado, que almacenan grasa y se sitúan entre los capilares y los hepatocitos (Blomhoff, 1982 y 1984). Aquí la vitamina A es de nuevo esterificada para su almacenamiento (Herrera, 1989). Este proceso es cuantitativamente muy importante, ya que los ésteres de retinol acumulados en el hígado constituyen hasta un 90% de todos los retinoles del organismo. En condiciones normales un 90-95% del almacén de retinil ésteres se encuentra en las células estrelladas, mientras que un 5-10% está en hepatocitos donde el retinol está preparado para ser movilizado (Blomhoff, 1994b). Los beta-carotenos son transportados por los lípidos séricos, sobre todo por las LDL y alcanzan las células alveolares mamarias por receptores de esas LDL (Parker, 1996).

2.5.3. Movilización : Proteína transportadora de retinol.

Para la movilización de la vitamina A, esta es de nuevo convertida en retinol por una hidrolasa (con ayuda de las sales biliares) y liberada al torrente circulatorio unida a la proteína transportadora de

retinol (RBP) (Andersen, 1992). A diferencia del retinol, el β -caroteno no tiene un transportador específico (Ross, 1993).

La movilización del retinol unido a la RBP asegura unas concentraciones plasmáticas constantes (400-800 $\mu\text{g/L}$ =1.4–2.8 $\mu\text{mol/L}$) frente a variaciones en la ingesta y el almacenaje (Gerster, 1997). Aproximadamente un 5% del total de la vitamina A en plasma se encuentra unida a lipoproteínas como retinil ésteres. Existe una pequeña cantidad que circula como retinil ésteres libres ($\cong 50\mu\text{g/L}$).

Proteína transportadora del retinol

Es un polipéptido simple con un peso molecular de 21200 daltons que fue aislado por primera vez, en plasma humano, por Kanai (Kanai, 1968). La RBP humana consta de 182 aminoácidos y tres puentes disulfuro y se sintetiza en el hepatocito.

Esta molécula presenta alta especificidad por el β -retinol y no por su análogo α - (Muhilal, 1975). Esta alta especificidad explica que el α -retinol pueda ser absorbido y almacenado en el hígado como análogo natural β -retinol, no pudiendo ser distribuido a los tejidos extrahepáticos, donde podría ejercer la actividad biológica que se ha demostrado in vitro (Clamon, 1974).

Además del sitio de unión a la vitamina A, la proteína transportadora del retinol posee otros dos sitios de unión: uno para la prealbúmina (transtirretina: TTR) (Van Jaarsveld, 1973) y otro para la unión a los receptores presentes en la superficie de las células diana (Heller, 1975).

Al entrar en contacto la RBP con la proteína receptora situada en la membrana celular se produce la liberación de retinol que se introduce en el interior de la célula (Brody, 1994). El retinol es introducido en la célula mientras que la RBP libre vuelve a la circulación en forma de apo-RBP, que tiene poca afinidad por la TTR y es filtrada de forma selectiva por el glomérulo renal.

Una vez dentro de las células hay proteínas que enlazan al retinol (tipo I y tipo II) y otras proteínas que enlazan al ácido retinoico (CRABP) (Chytil, 1984).

2.5.4. Captación celular del retinol

a. Células epiteliales pigmentadas de la retina (RPE)

El retinol, una vez liberado de la RBP y captado por las células RPE, se asociaba a una proteína de peso molecular 16.000 daltons (Ottonello, 1987). Parece haber una relación funcional entre la captación de retinol y su esterificación, ya que al inhibir la formación de retinil ésteres se produce una reducción en la captación de vitamina A por las células RPE. Puesto que la proteína involucrada es la CRBP (tipo I), la enzima encargada de la esterificación debe ser la lecitinretinol aciltransferasa (LRAT).

Se ha visto que el receptor del retinol en estas células tiene un peso molecular aproximado de 63.000 daltons (Bavik, 1991).

b. Hepatocitos y células estrelladas del hígado

Los hepatocitos y las células estrelladas del hígado pueden captar tanto retinol como RBP del RBP-retinol plasmático a través de un transporte complejo (Gjoen, 1987).

Hay una captación selectiva *in vivo* de RBP por el parénquima del hígado y por las células estrelladas mientras que la RBP no es captada por las células de Kupffer o las células endoteliales (Senoo, 1990).

c. Testículos y barrera hematoencefálica

Las células de Sertoli forman la barrera sangre-testículos y están encargadas de la maduración de los espermatozoides. Puesto que la espermatogénesis es dependiente del retinol, cabría esperar que las células de Sertoli expresaran receptores para RBP. Se ha demostrado que el retinol es captado por estas células desde el RBP-retinol a través de un receptor RBP, y este RBP no se introduce en las células. Los datos obtenidos sugieren que el retinol se une a CRBP (tipo I) dentro de las células para ser posteriormente esterificado (Shingleton, 1989a; Shingleton, 1989b).

2.5.5. Reciclaje y homeostasis del retinol plasmático.

Hasta hace más de una década, se creía que el retinol, tras abandonar la circulación, es captado por los tejidos, que lo utilizan de manera irreversible. Sin embargo, estudios *in vivo* desde 1972 demuestran que el retinol puede reciclarse (gracias al RBP) y recircular en la sangre entre 7 y 13 veces (Vahlquist, 1972; Green, 1985; 1987a; 1987b; Lewis, 1981; 1990). El 50% del recambio plasmático de retinol sucede en riñón, un 20% en hígado y el resto en otros tejidos (Green, 1987a; Lewis, 1990). La fuente de RBP para el reciclaje de retinol en el riñón y en otros tejidos, no se conoce aún; pero estos tejidos presentan mRNA para RBP (Makover, 1989; Soprano, 1986).

El tiempo de recambio del retinol plasmático está definido como la media de distribución de los tiempos en que las moléculas de retinol permanecen en el plasma antes de que éste abandone el plasma reversible o irreversiblemente (Blomhoff, 1992). En ratas se ha visto que este tiempo es de 1-3.5 horas (Green, 1985; 1987b; Lewis, 1990).

Tanto en humanos como en animales de experimentación, las concentraciones de retinol plasmático se mantienen dentro de un rango estrecho, frente a amplias fluctuaciones de la ingesta dietética de vitamina A.

2.5.6. Metabolismo intracelular del retinol

El papel de las proteínas transportadoras, dentro de las células, es el de dirigir los retinoides hacia enzimas específicas. Hay tres procesos principales involucrados en el metabolismo intracelular del retinol: a) El retinol puede ser almacenado después de su conversión en retinilesteres; b) el retinol puede ser convertido en un metabolito activo como el ácido retinoico o el retinal; c) la molécula de retinol o ácido retinoico puede ser catabolizada para ser posteriormente excretada (Blomhoff, 1991).

A) ESTERIFICACION DEL RETINOL

La principal enzima que participa en el proceso de esterificación intracelular es la LRAT (Blaner, 1990).

En los enterocitos la LRAT esterifica al retinol para incorporarlo a los quilomicrones, mientras que en las células estrelladas lo esterifica

para almacenarlo en las gotas de grasa de estas células. Esta deferencia puede deberse a las distintas proteínas transportadoras, CRBP (tipo I) para las células estrelladas del hígado y CRBP (tipo II) para los enterocitos.

La actividad LRAT en las células del epitelio pigmentado de la retina (RPE) es aproximadamente 1000 veces mayor que la actividad en intestino y en hígado (Saari, 1989). La esterificación de todo-trans retinol por la LRAT en las RPE está relacionada con la conversión de todo-trans retinil ésteres a 11-cis retinol por una enzima con actividad isomerasa (Canada, 1990).

En la glándula mamaria de la mujer lactante, el retinol es esterificado y transportado como retinil ésteres en la grasa de la leche. Aquí es la ARAT el enzima más importante para la esterificación del retinol. La glándula mamaria contiene niveles menores de actividad LRAT y CRBP (tipo I) que el hígado (Randolph, 1991).

Se ha visto en la epidermis de humanos que hay un gradiente de ésteres de retinol, siendo la concentración mayor en la capa más externa de la piel. Aquí también parece ser más importante la actividad enzimática de la ARAT. El gradiente de pH que existe en la epidermis puede ser importante para facilitar la esterificación del retinol en la parte superior de la epidermis (Torma, 1990).

B) ACTIVACION DEL RETINOL

El 11-cis retinal unido covalentemente a la opsina y el ácido todo-trans retinoico unido no covalentemente a los receptores nucleares retinoicos (RARs) son las formas activas de los retinoides tanto en la visión como en la regulación de la transcripción. También se ha demostrado que el ácido 9-cis retinoico se une y activa los tres receptores retinoicos nucleares X (RXRs), factores de la transcripción ligando-dependientes (Hayman, 1992; Levin, 1992). Así, la isomerización no sólo es importante en la visión, sino que también interviene en la regulación de la transcripción.

C) EXCRECIÓN

Se ha estudiado el catabolismo del retinol por análisis radioactivo urinario, biliar y fecal de metabolitos del retinol. Se forman distintos

metabolitos polares, algunos de ellos ya han sido identificados (Frolik, 1984). En estudios realizados con microsomas hepáticos de rata, el retinol se oxida 4-hidroxi retinol y 4-oxo retinol, el sistema citocromo P-450 parece estar involucrado en esta conversión (Leo, 1985). Se pueden formar glucurónidos del retinol para ser excretados por la bilis y por orina (Barua, 1986). Sin embargo, la mayoría del catabolismo del retinol pasa por la formación de ácido retinoico como intermediario. El ácido retinoico posteriormente se conjuga y pasa a retinol β -glucurónido y taurina (Frolik, 1984).

2.6. DEFICIENCIA DE VITAMINA A

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la deficiencia de vitamina A un problema de salud pública en aproximadamente 60 países, poniendo en riesgo la vida y la visión de 250 millones de niños en edad preescolar (Potter, 1997).

Se ha visto en animales que una deficiencia de vitamina A produce anorexia, falta de crecimiento, infecciones y xeroftalmia. A menudo la muerte se produce antes de presentarse la xeroftalmia, debido a las infecciones. La deficiencia de vitamina A afecta a la formación de anticuerpos, así como produce daño en el tejido epitelial que recubre el tracto respiratorio y gastrointestinal. Esto provoca la invasión de organismos patógenos (Brody, 1994).

En los países subdesarrollados se ha visto que la ceguera infantil, se produce en una parte importante por la deficiencia de vitamina A. Algunos estudios han demostrado una correlación entre la ceguera y la aparición de infecciones respiratorias y gastrointestinales (Brody, 1994).

La deficiencia de vitamina A se presenta cuando se consume de manera crónica una dieta deficiente en vitamina A o durante una inanición prolongada. La enfermedad que provoca esta deficiencia se conoce con el nombre de keratomalacia, se trata de un conjunto de síntomas, que en caso de afectar al órgano de la visión se conoce con el nombre de xerofalmia. Las diferentes fases de esta enfermedad fueron definidas por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organisation) (Who, 1982). El primer síntoma es una ceguera nocturna (reversible), seguido de un daño en la córnea (irreversible). Se produce sequedad en la conjuntiva (xerosis) y unas manchas opacas blancas

denominadas "manchas de Bitot". El daño irreversible producido en la córnea, el cristalino con la consecuente ceguera es parte de la xeroftalmia (Brody, 1994). La suplementación en los países en desarrollo de las mujeres lactantes con beta-carotenos, podría revertir este déficit de vitamina A tanto materno como del niño lactante (Canfield, 1998).

Justificación y Objetivos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

No cabe duda de que la investigación y el conocimiento de la toxicidad de los compuestos organoclorados ampliamente utilizados en nuestro medio, y algunos de ellos aún en uso, promueve gran interés. En la actualidad se conocen numerosas sustancias con potencial estrogénico, pero no es así respecto al grado de toxicidad de cada una de ellas. Sólo se ha establecido la unidad de “tóxico equivalente” para las dioxinas y algunos pesticidas organoclorados (Craan, 1998; Nunes, 1998; Torres-Arreola, 1999; Noren, 2000), quedando sin regulación el resto de sustancias organocloradas. Aunque existe un máximo permitido para cada sustancia, al no conocerse en qué concentraciones podrían causar su efecto nocivo en cada etapa de la vida, y dado que la sinergia y el fenómeno de “toxicidad aditiva” ya han sido demostrados, se plantea un problema de salud que por el momento sólo está mostrando la “punta del iceberg”. La importancia de la demostración de la contaminación humana y la elaboración de protocolos que permitan determinar la relación existente entre la exposición prolongada a este tipo de moléculas y la aparición de tumores, malformaciones congénitas, endocrinas, y/o funcionales, va adquiriendo con el paso del tiempo un papel muy relevante en todo el mundo (Isca, 2002).

La posible patología derivada de los efectos tóxicos de la contaminación por xenobióticos es en la actualidad poco conocida y está en fase de investigación. No obstante, tanto el médico generalista como los especialistas deben empezar a conocer la presentación clínica derivada de esta exposición, que a veces saldrá a la luz a muy a largo plazo.

Los trabajos experimentales demuestran cómo los lactantes humanos están expuestos a los contaminantes medioambientales a través del transporte placentario y continúan estándolo a través de su alimentación (Matsuda, 1978a; 1978b; Yakushiji, 1984; Patandin, 1997; Bates, 2002; Wong, 2002; Jaga, 2003). Además, a lo largo de la vida, el consumo de aguas contaminadas o productos animales provocan una ingesta continuada de bajos niveles de éstas y otras muchas sustancias potencialmente tóxicas.

Como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo de investigación, no debe sorprendernos que la leche humana posea unas concentraciones más altas de plaguicidas que la leche de vaca. Los pesticidas organoclorados tienden a concentrarse más en muestras de seres vivos cada vez más altas de la cadena alimentaria, es decir, los animales carnívoros almacenan más DDT que los herbívoros (Woodwell, 1967a; Woodwell, 1967b). En la transmisión de estas moléculas a través de la leche materna es importante considerar tanto la intensidad de la contaminación como la duración de la lactancia (Gladen, 1988; AAP, 1994; Rogan, 1996; Sarcinelli, 2003). La exposición a través de la leche materna está demostrada tanto para PCBs, DDT, PCDD/PCDFs como para otros compuestos clorados (Newsome, 1999). No hay información concluyente sobre efectos perjudiciales en lactantes alimentados al pecho en las áreas en donde el empleo de DDT ha sido intenso, aunque ello no excluye la posibilidad de consecuencias a largo plazo.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son considerados esenciales para el recién nacido y el lactante. Un buen estado nutricional en ácido docosahexaenoico se ha relacionado con una mejor agudeza visual y un mejor desarrollo neurológico y cognitivo. Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes fundamentales de las membranas celulares y van a formar parte de todas las estructuras y órganos de nuestro cuerpo; juegan un papel muy relevante en el desarrollo del sistema nervioso central durante la vida fetal, postnatal y durante los dos primeros años de la vida. Las madres lactantes van a transmitir a sus hijos junto a nutrientes fundamentales, toda la carga de xenobióticos acumulada a lo largo de su vida. Por este motivo, el lactante se ve sometido a una exposición intensiva durante los primeros meses, que va a dejar un depósito “histórico” en su organismo. Éste se irá incrementando poco a poco, ocasionando consecuencias en etapas posteriores de la vida de diferente magnitud y que, por el momento, no son bien conocidas.

Hay diversos estudios publicados recientemente en la literatura internacional que correlacionan los metabolismos de xenobióticos y ácidos grasos poliinsaturados ligados a fosfolípidos. Esta cuestión es uno de los temas de máxima investigación en la actualidad y se trata de conocer mejor los procesos metabólicos y endocrinos que van a producir estas moléculas tóxicas en el ser humano, con consecuencias a corto, medio y, sobre todo, a largo plazo. Por ahora, se sabe realmente poco acerca de los procesos metabólicos que sufren de forma individualizada

cada una de estas moléculas, aunque sí está más claro su papel como sustancias estrogénicas. Los efectos más nocivos van a estar derivados, no sólo de su acción individual, sino fundamentalmente de su acción aditiva y sinérgica.

Un estudio llevado a cabo en mujeres españolas sugiere que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la leche humana está relacionado con la cantidad de xenobióticos contenidos en ella. Este estudio mostraba una correlación positiva entre endosulfan-lactona/DHA y ácido linolénico en leche madura (Jiménez-Torres, 2000). Puente-Fraga et al (Puente-Fraga, 1995), en un estudio realizado en células renales de ratas demostraron que el HCH induce la liberación del ácido araquidónico procedente del fosfatidil inositol. Esta acción podría ser llevada a cabo por los isómeros gamma y delta. Los efectos de los xenobióticos lipofílicos se han estudiado, asimismo, en la membrana celular del *Bacillus stearothermophilus*. En cultivos de este microorganismo, el DDT es capaz de disminuir su crecimiento y su capacidad de adaptación, debido a las alteraciones en la función y propiedades físicas de la bicapa lipídica. Estos efectos nocivos se relacionan, sobre todo, con un aumento de la concentración relativa de fosfoglicolípidos, aumento de fosfatidiletanolamina y disminución paralela de fosfatidilglicerol (Donato, 1997). Algunos autores consideran a los componentes lipídicos de la membrana del *Bacillus stearothermophilus* como criterio sensible para detectar efectos nocivos de los xenobióticos a bajas dosis (Donato, 2000).

Los problemas de fertilidad descritos en la bibliografía fueron evaluados por Fonovich et al. (Fonovich, 2000) en relación a la exposición a dieldrín. Estos autores demostraron en ovocitos de anfibios que el dieldrín afecta al metabolismo de los fosfolípidos de membrana. Años atrás, Becze et al. demostraban que los fenómenos de peroxidación lipídica son fundamentales para entender determinados daños celulares inducidos por insecticidas clorados (Bencze, 1975).

Ante los datos sugeridos en la literatura especializada, y la falta de información y de conocimientos profundos del metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo humano, el presente estudio tiene como objetivos:

- 1.- Demostrar la presencia de pesticidas organoclorados en leche humana de madres lactantes del sur de Andalucía.

2.- Establecer relaciones entre la liberación de pesticidas organoclorados a través de la leche humana y el contenido de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles.

3.- Comprobar la influencia de la ingesta dietética sobre la eliminación de estos disruptores endocrinos a través de la leche materna.

4.- Investigar si la liberación de pesticidas organoclorados a través de la leche de mujer junto a los ácidos grasos poliinsaturados obedece a un metabolismo común en el organismo.

Estos objetivos están basados en las siguientes hipótesis de trabajo:

1ª) Los pesticidas organoclorados, debido a su solubilidad, se almacenan y se liberan en nuestro organismo unidos a las grasas.

2ª) Existen datos sugerentes de alteraciones del metabolismo de los fosfolípidos de membrana ligadas al efecto de diversos disruptores endocrinos.

3ª) La demostración de la liberación conjunta y relacionada de pesticidas organoclorados y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, puede reflejar en alguna medida el potencial efecto tóxico de estas moléculas sobre el metabolismo de los fosfolípidos de las membranas celulares.

Material y Métodos

MATERIAL Y METODOS

1. CASUISTICA

En el presente estudio se han obtenido muestras de leche calostrala, de transición y madura, de 25 mujeres sanas del sur de España, con edades comprendidas entre 16 y 35 años. Las mujeres fueron elegidas al azar y todas ellas firmaron un documento de consentimiento informado para la participación en el estudio. Los criterios de exclusión fueron: cesárea por preeclampsia, sufrimiento fetal agudo, crecimiento intrauterino retardado, prematuridad y otras complicaciones que podrían influir en los resultados.

El estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética de cada uno de los Centros participantes [Hospital Universitario San Cecilio de Granada y Hospital de Poniente de El Ejido (Almería)].

2. RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras de leche humana se recogieron entre las 11:00 y las 12:00 horas de la mañana, coincidiendo con la visita periódica al pediatra, del siguiente modo: 1) una muestra de leche de 2-5 ml del primer pecho antes de iniciar la toma; 2) seguidamente el niño fue amamantado de ese pecho de 5 a 10 minutos; 3) para finalizar se tomó más volumen de leche de ese mismo pecho; 4) igual procedimiento se llevó a cabo para obtener las muestras del segundo pecho; 5) Para conocer el volumen de ingesta de leche por toma se realizó el método de la “doble pesada” del recién nacido.

Las muestras se depositaron en tubos blancos opacos y se congelaron inmediatamente a -70°C hasta el momento de su análisis. El volumen final de trabajo necesario se obtiene tras mezclar el contenido de todos los tubos obtenidos de las tomas en cada período. Esto se realiza debido a que el contenido en grasa de la leche humana cambia durante el tiempo de lactación, siendo la concentración mayor al principio que al acabar la sesión. El volumen final será aproximadamente de 5-10 ml de leche. Los análisis se realizaron en los tres tipos de leche: Calostro (1-7 días postparto); Transición (7-12 días); Madura (13-35 días).

3. MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN NUTRICIONAL

Para conocer los hábitos alimentarios de las mujeres de Almería y Granada, en el momento de la obtención de la muestra, que se realizó en el marco de las visitas periódicas al pediatra, las madres entregaban una encuesta tipo “recuerdo de 24 horas” (que incluía datos de la ingesta realizada los 3 días anteriores a esta visita). En esta visita, todas las mujeres debían señalar en la encuesta alimentaria cada uno de los ingredientes constituyentes del plato y las cantidades utilizadas. Si la señora no rellenaba en las encuestas el modo de elaboración de los platos o bien la cantidad ingerida de los mismos, se hacía necesario recurrir a la información publicada por diversos autores para los hábitos alimentarios españoles (Jiménez-Cruz, 1990; Alcoriza, 1990; De Cos, 1991; Suarez-López, 1996). En éstos se recogen valores medios estandarizados para cada ración así como el modo de elaboración de los platos.

3.1. INFORMACIÓN PERSONAL Y DE HáBITOS DE VIDA.

En la encuesta epidemiológica se incluyeron datos relativos a la edad (años), peso al principio y al final del embarazo (Kg), talla (cm), nivel cultural, paridad (a las madres multíparas, se les preguntó acerca del número de lactancias realizadas), domicilio, tipo de trabajo, nivel socio-económico, ingesta de alcohol, patología durante el embarazo, fármacos administrados durante la gestación y tipo de parto. 15 madres voluntarias fueron reclutadas en Almería y 10 en Granada. El número total de encuestas previstas fue de 225 (de Almería 135 y 90 de Granada). En la Tabla VII se recoge un resumen de estos datos.

Tabla VII.

	Máximo	Mínimo	Mediana	Media \pmDS
Edad	35	16	28	27.2 \pm 5
Estudios	4	1	2	2.6 \pm 0.7
Sc-econ	5	1	3	2.9 \pm 0.7
Peso final	88	45	58	60.45 \pm 9.8
Talla	173	149	160	160.9 \pm 6.2

Estudios: 1=analfabeta; 2=primarios; 3=secundarios; 4=superiores

Sc-econ (Nivel socioeconómico): 1=bajo; 2=bajo-medio; 3=medio; 4=medio-alto; 5=alto

3.2. ENCUESTA ALIMENTARIA.

Para obtener la información necesaria se hizo coincidir el momento de la encuesta con las tres etapas de lactancia que se estudian: calostrado (dieta estandarizada del hospital), leche de transición y madura (dieta habitual de la madre). Finalmente, se obtuvieron nueve encuestas alimentarias repartidas en las tres etapas de lactancia establecidas.

Tabla VIII. Requerimientos nutricionales diarios (RDA, 2002).

		Unidades	Mujer adulta sana	Mujer lactante sana
Energía		Kcal	2200	2700
Proteínas		g	46	71
Lípidos		g	73	90
Hidratos de carbono		g	130	175
	Vitamina A	µg	700	770
Vitaminas Liposolubles	Vitamina D	µg	5	5
	Vitamina E	mg	15	15
	Vitamina C	mg	75	85
	Tiamina	mg	1.1	1.4
	Riboflavina	mg	1.1	1.4
Vitaminas Hidrosolubles	Niacina	mg	14	8
	Vitamina B6	mg	1.3	1.9
	Folato	µg	400	600
	Vitamina B12	µg	2.4	2.6
	Calcio	mg	1000	1000
	Fósforo	mg	700	700
	Magnesio	mg	310-320	350-360
	Hierro	mg	18	27
Minerales	Cinc	mg	8	11
	Yodo	µg	150	220
	Selenio	µg	55	60

3.3. PROGRAMA INFORMÁTICO Y TABLAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS.

La evaluación de las encuestas se realizó mediante un programa informático desarrollado por Suárez-López (Suárez-López, 1993), que transforma los alimentos en sus correspondientes nutrientes y el cual contiene todas las recetas de los platos elaborados. Se basa en un programa DBASE IV (1990) que gestiona una base de datos con las tablas de composición de alimentos de Wander, que incluye las tablas de composición de alimentos españolas (Jiménez-Cruz, 1990). De este modo se conocen así los valores de energía, macronutrientes y micronutrientes consumidos por cada mujer en cada uno de los períodos estudiados. Esto permite conocer y comparar si la ingesta diaria de las mujeres en el período de lactancia se encuentra en el rango óptimo considerado por las tablas de ingesta de RDA para madres lactantes (RDA, 2002) (Tabla VIII).

4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

4.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EN LECHE HUMANA

Fundamento:

Para el análisis de pesticidas organoclorados (PO) en leche humana se ha adaptado un método de extracción en suero, modificado según las indicaciones AOAC (Association of Official Methods of Analysis, Ref. 989.05, 1990), ya que la leche presenta una composición característica, fundamentalmente en lo referente al contenido en calcio. El método analítico utilizado para la determinación de PO en leche materna es el cromatográfico. A continuación se describe la metodología de Cromatografía de Gases con detector de captura de electrones (CG/DCE) y Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG/EM), desarrollado y aplicado para los pesticidas organoclorados presumiblemente presentes en las muestras a analizar.

Instrumentación:

- Cromatógrafo de gases con detector captura de electrones, modelo Varian-3350.
- Cromatógrafo de gases-espectrometría de masas modelo Saturn 2000, Varian Instruments con inyector automático 8200, SPI/1078.
- Procesador de datos: Millenium Chromatography Manager software.

Material:

- Agitador vibratorio.
- Micropipetas automáticas.
- Centrífuga.
- Tubos eppendorf.
- Microjeringa para cromatografía de 50 μ l.
- Cartuchos sep-pack® de sílice

Reactivos:

- Metanol.
- Oxalato sódico.
- Éter etílico.
- Hexano.
- Ácido sulfúrico.
- Isopropanol

Preparación de muestras:

Se trata de una técnica analítica de extracción líquido/líquido, que consta de los siguientes pasos:

- 1) Tomar un volumen de muestra entre 2 y 8 mL.
- 2) Añadir la mitad del volumen de la muestra de metanol (precipita las proteínas) y se agita hasta conseguir una mezcla homogénea.
- 3) Adicionar 0,1g de oxalato sódico (precipita el calcio), agitando el tubo de nuevo 1min.
- 4) Proceder a la extracción: añadir 10 mL de éter etílico/ hexano (1:1 v/v) y centrifugar 15 min. a 3000 rpm.
- 5) Recoger la fase orgánica (se repite dos veces más el punto 4).
- 6) Colectar los tres extractos orgánicos.

- 7) Concentrar a presión reducida y temperatura de 40°C hasta un volumen final de 1 mL.
- 8) Añadir sobre el residuo 0,5 mL de H₂SO₄ concentrado para eliminar la materia orgánica que pudiera ser arrastrada y se centrifuga de nuevo durante 10 min. a 3000 rpm.
- 9) Recoger la fase orgánica y sobre el residuo adicionar dos veces más 1 mL de hexano y centrifugar durante 10 min. a 3000 rpm.
- 10) Reunir las tres fases orgánicas en un tubo y llevar a sequedad total en corriente de nitrógeno.
- 11) Redisolver el residuo seco en 1mL hexano y purificar.

Purificación de los extractos mediante cartuchos de sílice

El extracto orgánico obtenido en la extracción anterior se purifica utilizando cartuchos sep-pack® de sílice, previo acondicionamiento del cartucho con 2 mL de hexano. Se eluye el extracto con 10 mL de hexano y a continuación con 10 mL de Hexano: metanol: isopropanol (45:40:15; v/v/v). Se colectan ambos eluidos y se concentran a sequedad en corriente de nitrógeno. (Rivas, 1999).

Cuantificación por Cromatografía gases/Detector de captura de electrones (CG/DCE, ⁶³Ni)

Condiciones cromatográficas:

- Temperaturas: inyector: 250°C; horno: 190°C; detector: 200°C.
- Gas portador y auxiliar: nitrógeno con un flujo de 30 mL/min. y 40 mL/min. respectivamente.
- Programa: temperatura inicial de 130°C durante 1 min., aumenta a velocidad de 20°C/min. hasta 150°C; en este momento cambia la velocidad de aumento de temperatura a 10°C/min. hasta 200°C, cambiando de nuevo a 20°C/min. para llegar finalmente a los 260°C, para lo que se requieren 20 minutos.
- Volumen de inyección 1 :L.
- Procesador de datos: Millenium Chromatography Manager software.

Cuantificación por Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

Condiciones cromatográficas:

- Detector: ionización de electrones.
- Temperaturas de inyector: T^a inicial es de 90°C (0,1 min.), aumenta a una velocidad de 200°C/min. hasta alcanzar al final 280°C.
- Gas portador: helio con un flujo de 1 mL/min.
- Programa: temperatura inicial de 80°C durante 2,5 min., aumenta 50°C/min. hasta 140°C; en este momento cambia la velocidad de aumento de temperatura a 5°C/min. para llegar finalmente a los 260°C, que se mantiene durante 3 min.
- Volumen de inyección 2µL (con autoinyector).
- Procesador de datos: centro de datos para EI-EM/EM.

4.2. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LECHE HUMANA

Fundamento:

La composición de ácidos grasos en leche materna fue determinada siguiendo una modificación del método directo descrito por Lepage (Lepage, 1986), que consiste en la trans-esterificación y extracción en un paso de muestras secas congeladas.

Instrumentación:

- Cromatógrafo de gases de Hewlett-Packard Serie 5890 Series II GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) con detector de ionización de llama.
- Columna de sílice fundido SP-2380, con espesor de 0,20 µm.

Material:

- Agitador vibratorio.
- Micropipetas automáticas.
- Centrifuga.

- Tubos eppendorf.
- Microjeringa para cromatografía de 50 μ l.

Reactivos:

- Acetil clorina.
- Metanol.
- Ácido heptadecanoico (C17:0) (Fluka, Busch, Switzerland).
- Helio.

Preparación de las muestras:

Los metil-ésteres fueron separados por cromatografía de gases de Hewlett-Packard Serie 5890 Series II GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) con una columna de sílice fundido SP-2380 de 0.25 mm x 60m, con espesor de membrana de 0,20 μ m (90% bisisobutyl-10% cianopropilfenilsiloxane; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA).

Se transesterificaron 100 μ l de leche con acetil clorina en metanol y patrón interno (C17:0) (Fluka, Busch, Switzerland).

Cuantificación por cromatografía de gases (GC):

Condiciones cromatográficas:

- Detector: detector de ionización de llama
- Temperaturas de inyector y detector: 250°C y 300°C, respectivamente.
- Gas portador: helio con flujo lineal de 20,7 cm/s.
- Programa: la temperatura inicial es de 160°C durante 2 min., aumenta 4°C/min. hasta 240°C que se mantiene durante 3 min.
- Volumen de inyección 1 μ L (con autoinyector).
- Procesador de datos: centro de datos para EI-EM/EM.

Los ácidos grasos fueron identificados por comparación en los tiempos de retención con los de los estándares auténticos (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA). El contenido de los ácidos grasos se expresó como porcentaje (wt/wt) del total de grasa, porque de esta manera, se refleja mejor la composición en ácidos grasos esenciales que cuando se intentan determinar las concentraciones absolutas en plasma y en leche humana (Decsi, 1995).

4.3. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS A Y E EN LECHE HUMANA (GONZÁLEZ-CORBELLÁ, 1994).

Fundamento:

Para la determinación de vitaminas A y E en leche humana se utiliza un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con un detector ultravioleta a 292 nm de longitud de onda.

Instrumentación

- Sistema cromatográfico de HPLC formado por una bomba cuaternaria de baja presión HP-1050 con horno. Inyector Rheodyne con un loop de volumen constante de 100µl. Detector de “Diode array” 1040 M. Estación de datos cromatográficos HPLC ChemStation. Impresora HP Thinkjet.
- Columna de fase reversa C18 del tipo Spherisorb ODS-2 de 250x4.6 mm, de un tamaño de partícula de 5 µm.

Material:

- Agitador vibratorio.
- Micropipetas automáticas.
- Centrifuga.
- Tubos eppendorf.
- Microjeringa para cromatografía de 50 µl.

Reactivos:

- α -tocoferol, acetato de α -tocoferol y pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno) suministrados por SIGMA (St.Louis, MO, USA).
- EDTA suministrado por FLUKA (Buchs, Switzerland).
- Cloruro sódico de PROBUS (Badalona, España).
- Metanol y etanol para HPLC de SCHARLAU (Barcelona, España).
- N-hexano para HPLC de SDS (Peypin, Francia).
- Dietileter para HPLC de PANREAC (Barcelona, España).

Preparación de las muestras:

Para determinar el α -tocoferol por HPLC se debe efectuar una serie de pasos previos. Para extraer esta vitamina liposoluble se han utilizado métodos directos, sin saponificación previa.

- 1) *Partimos de 100 μ l de leche humana + 50 μ l del patrón interno 100 μ g/ml de acetato de α -tocoferol en etanol o de retinol en su caso.*
- 2) 50 μ l de etanol frío: precipita las proteínas.
- 3) *100 μ l de hexano: para romper el precipitado de lipoproteínas (agitando de forma regular durante un minuto).*
- 4) *Centrifugamos a 3000 r.p.m. durante 5 minutos.*
- 5) *Separar la fase acuosa de la orgánica.*
- 6) *Colectar la fase orgánica con el objeto extraer completamente el α -tocoferol (repetir pasos 3-6).*
- 7) Evaporar el hexano bajo corriente de nitrógeno y redissolver el extracto orgánico con 100 μ l de metanol.

Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC):

Condiciones cromatográficas:

- Fase móvil: metanol.
- Flujo: 1 ml/min.
- Temperatura del horno: 50 °C.
- Detección: 292 nm (detector de "Diode array"). Es la longitud de onda en la que la vitamina E presenta el máximo de absorción.
- Volumen de inyección: 50 μ l.
- Tiempo de análisis: 10 min.

Para la cuantificación del método se ha escogido la calibración con patrón interno ya que de este modo se eliminan los posibles errores existentes durante el proceso de manipulación de la muestra y los debidos a cambios de las condiciones cromatográficas. Otra ventaja es que los resultados son independientes del volumen de muestra inyectado.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos obtenidos en el presente estudio, se realizó un test de rechazo de observaciones extremas. Posteriormente, se procedió a un análisis descriptivo de los resultados (media, mínimo, máximo, desviación estándar, SEM) y los tests de normalidad. A continuación se realizaron los tests paramétricos y no paramétricos, utilizando para ello el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) en su versión 11.0 para Windows. Previamente los datos se introdujeron en un archivo de datos de extensión.sav para poder ser tratados por dicho paquete SPSS.

Primera Fase del Estudio

Un primer paso ha sido comprobar mediante el correspondiente test de normalidad (prueba de Shapiro), si las variables analizadas pueden considerarse normales, ya que el análisis que se ha aplicado está basado en la normalidad de las variables. También, para cada análisis efectuado se ha tenido en cuenta si se cumple la condición de homogeneidad de varianzas, que es otro requisito para poder aplicar el análisis de la varianza. Para aquellas variables en que se incumple alguna de estas condiciones ó ambas, se ha aplicado una transformación que corrija dichos defectos, como la transformación logarítmica, la raíz cuadrada, etc.

Un primer tipo de análisis se ha aplicado utilizando, dentro de “Analizar” el módulo de modelo lineal general (medidas repetidas). En primer lugar cuando solicitamos éste análisis se nos proporciona un cuadro con los valores descriptivos (media, desviación estándar y tamaño de muestra), de cada combinación de tipos de leche (calostro, transición y leche madura) y tanto en la medida inicial como final de dicha variable. Asimismo, se nos da un intervalo de confianza al 95% para cada media.

Una vez realizado el análisis de la varianza se solicita que nos realice las comparaciones múltiples entre los distintos niveles del tipo de leche calostrual, de transición o madura.

Se ha solicitado la prueba de Bonferroni al ser los tamaños muestrales desiguales entre los tipos de leche. También se pidió el test de Tahmane para aquellos casos en que las varianzas resultaron desiguales. Al solicitar dichas pruebas además de señalar entre qué medias existe significación se nos proporciona el valor de la diferencia de las medias comparadas, el error típico de la diferencia y la significación (valor P) y de igual forma un intervalo de confianza para la diferencia de medias, lo que nos informa acerca de la magnitud de dicha diferencia.

Segunda Fase del estudio estadístico:

Para el análisis de correlación se han realizado correlaciones bivariadas de Pearson. Para la comparación de los coeficientes de correlación se ha empleado el test de transformación de la “r” de Pearson en “Z” de Fisher. Así mismo, también se ha utilizado el coeficiente de correlación de Spearman para contrastar el posible grado de asociación entre dos variables (v.g. pesticida/metabolito en distintos tipos de leche).

Para analizar qué variables de la dieta influyen en el contenido en leche materna de los distintos pesticidas, así como de los distintos ácidos grasos y vitaminas, se ha realizado el procedimiento de regresión múltiple paso a paso, para cada variable estudiada. Los modelos obtenidos y sus correspondientes correlaciones aparecen reflejados en las tablas de resultados.

En todos los resultados se ha considerado un nivel de significancia mínimo de $p < 0.05$. La representación gráfica se obtuvo mediante los programas de Microsoft Excel 2000, Microsoft Powerpoint 2000 y el paquete estadístico SPSS 11.0.

Resultados

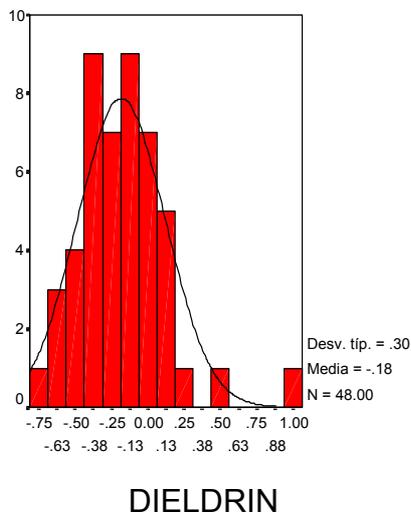
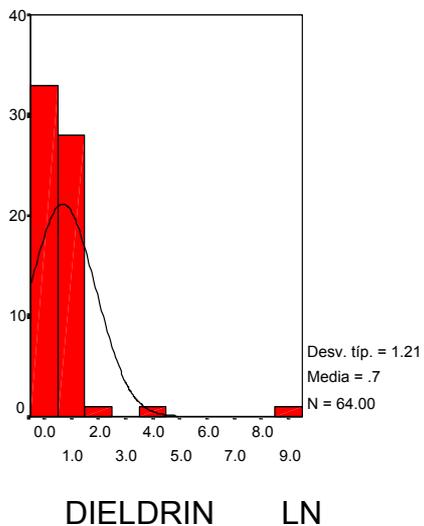
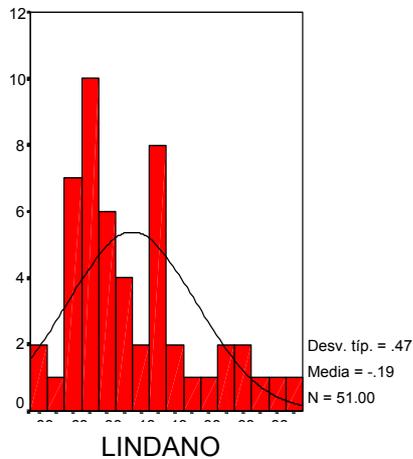
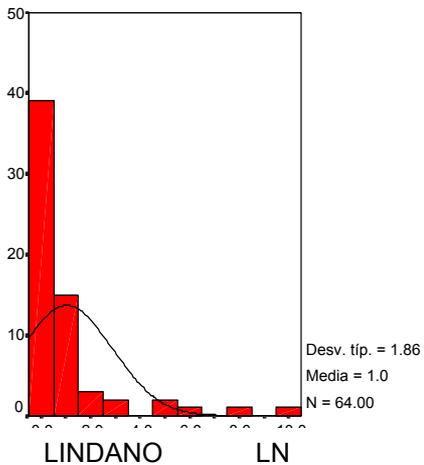
RESULTADOS

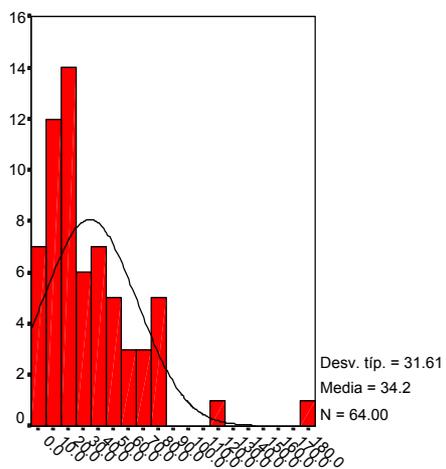
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Como se evidencia en las tablas IX, X y XI, queda demostrada claramente la presencia de cantidades variables de todos los pesticidas organoclorados analizados en las muestras de leche materna, aspecto que se estudiará exhaustivamente más adelante.

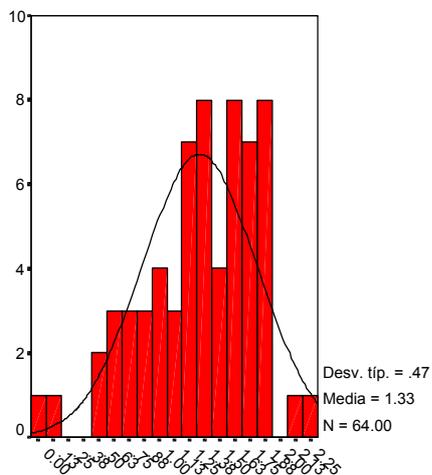
Se han reflejado los valores mínimos, máximos, medias y desviaciones estándar de los pesticidas organoclorados analizados en las muestras de leche humana calostroal, de transición y madura, respectivamente. Se muestran asimismo el porcentaje de muestras de leche materna contaminadas por cada uno de los PO en cada período de tiempo. De estos datos se afirma con rotundidad que el p.p'DDE aparece en el 100% de las muestras obtenidas. Otro ejemplo, el endosulfán éter contamina también todas las muestras de calostro y leche madura y casi el 96% de las de transición. Por el contrario, el metoxicloro sólo se ha encontrado en el 12% de las muestras de calostro y el 26,7% de las de leche madura.

Al igual que sucede en otros estudios sobre la presencia de distintas concentraciones de pesticidas en medios biológicos, se demuestra en el presente estudio que sus concentraciones en muestras de leche humana no siguen una distribución Normal, lo cual ha sido tenido en cuenta en el análisis estadístico. Este hecho puede observarse gráficamente en los histogramas, que representan los valores de las concentraciones de algunos de ellos; por ejemplo, lindano, dieldrín, endosulfán alfa ó p.p'DDE. A continuación se muestran los correspondientes histogramas, junto con las transformaciones logarítmicas, donde se observa el ajuste a la normalidad (*Ln: logaritmo neperiano*).

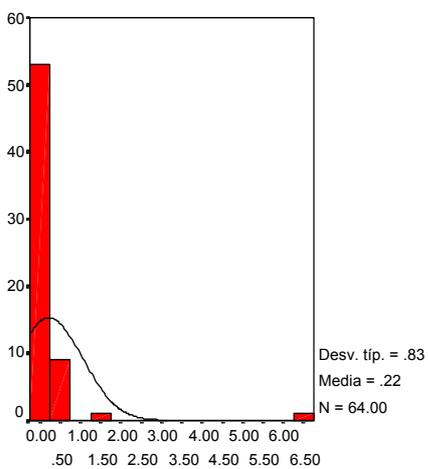




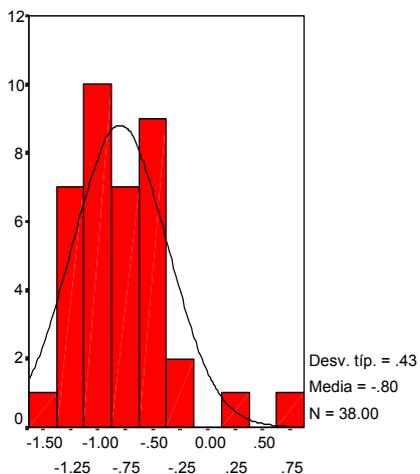
p.p'DDE LN



p.p'DDE



ENDOSULFÁN ALFA



LN ENDOSULFÁN

Tabla IX. Pesticidas organoclorados presentes en leche calostrala (en ng/mL) y porcentaje de muestras contaminadas por ellos en este período.

	<i>n</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>±DS</i>	<i>%</i>
Lindano	25	L.D.	9.81	1.68	2.30	92
Aldrín	25	L.D.	31.97	3.01	6.19	96
Dieldrín	25	L.D.	1.57	0.69	0.46	88
Mírex	25	L.D.	9.41	1.14	2.55	24
Clordano	25	L.D.	238.71	44.05	58.07	84
Endosulfán alfa	25	L.D.	0.44	0.11	0.12	64
Endosulfán beta	25	L.D.	13.85	1.47	3.55	24
Endosulfán éter	25	0.02	20.49	1.44	4.14	100
Endosulfán lactona	25	L.D.	0.21	$6.36 \cdot 10^{-2}$	$6.13 \cdot 10^{-2}$	68
Endosulfán diol	25	L.D.	1.35	0.12	0.28	40
Endosulfán sulfato	25	L.D.	5.24	0.48	1.32	16
p,p'DDE	25	4.48	181.50	33.41	38.34	100
p,p'DDD	25	L.D.	50.16	10.98	14.73	60
o,p'DDT	25	L.D.	2.59	0.20	0.55	20
p,p'DDT	25	L.D.	54.26	3.43	10.78	48
Metoxicloro	25	L.D.	0.59	$5.64 \cdot 10^{-2}$	0.16	12

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar; *LD*: límite de detección; *%*: porcentaje de muestras de leche afectadas por cada pesticida.

Tabla X. Pesticidas organoclorados presentes en leche de transición (en ng/mL) y porcentaje de muestras contaminadas por ellos en este período.

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS	%
Lindano	24	L.D.	8.29	0.68	1.73	66.7
Aldrín	24	L.D.	9.67	1.73	2.09	91.7
Dieldrín	24	L.D.	9.06	0.75	1.81	62.5
Mírex	24	L.D.	7.92	1.46	1.90	54.2
Clordano	24	L.D.	234.60	26.15	47.17	79.2
Endosulfán alfa	24	L.D.	6.55	0.43	1.34	58.3
Endosulfán beta	24	L.D.	15.91	3.71	6.11	33.3
Endosulfán éter	24	L.D.	16.40	1.96	3.95	95.8
Endosulfán lactona	24	L.D.	1.06	0.23	0.28	87.5
Endosulfán diol	24	L.D.	0.98	$6.63 \cdot 10^{-2}$	0.20	25
Endosulfán sulfato	24	L.D.	23.32	2.35	5.58	25
p,p'DDE	24	0.92	115.90	36.23	27.97	100
p,p'DDD	24	L.D.	32.17	7.81	10.46	54.2
o,p'DDT	24	L.D.	6.18	0.64	1.39	41.7
p,p'DDT	24	L.D.	26.39	4.30	7.36	70.8
Metoxicloro	24	L.D.	234.60	21.21	48.11	62.5

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar; *LD*: límite de detección; %: porcentaje de muestras de leche afectadas por cada pesticida.

Tabla XI. Pesticidas organoclorados presentes en leche madura (en ng/mL) y porcentaje de muestras contaminadas por ellos en este período.

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS	%
Lindano	15	L.D.	1.89	0.49	0.53	80
Aldrín	15	L.D.	17.30	2.35	4.27	80
Dieldrín	15	L.D.	3.61	0.59	0.89	73.3
Mírex	15	L.D.	7.98	1.42	2.49	33.3
Clordano	15	L.D.	179.87	23.84	47.75	60
Endosulfán alfa	15	L.D.	0.48	$8.93 \cdot 10^{-2}$	0.14	53.3
Endosulfán beta	15	L.D.	26.89	3.39	7.84	33.3
Endosulfán éter	15	0.02	42.03	3.15	10.76	100
Endosulfán lactona	15	L.D.	1.90	0.61	0.60	93.3
Endosulfán diol	15	L.D.	0.28	$4.20 \cdot 10^{-2}$	$7.99 \cdot 10^{-2}$	33.3
Endosulfán sulfato	15	L.D.	4.44	0.34	1.14	26.7
p,p'DDE	15	1.33	78.84	32.35	26.07	100
p,p'DDD	15	L.D.	46.60	9.91	15.17	40
o,p'DDT	15	L.D.	1.65	0.20	0.45	26.7
p,p'DDT	15	L.D.	19.44	3.66	6.00	60
Metoxicloro	15	L.D.	1.11	0.19	0.38	26.7

n: número de casos; DS: Desviación estándar; LD: límite de detección; %: *porcentaje de muestras de leche afectadas por cada pesticida.*

En la tabla XII se reflejan, percentiladas, las distintas concentraciones (en ng/mL) de cada pesticida organoclorado analizado en las muestras de leche humana del presente estudio. Para la mayoría de los pesticidas analizados (lindano, aldrín, dieldrín, clordano, endosulfán éter, endosulfán lactona y p,p'DDE) puede subrayarse el hecho de que contaminan más del 75% de las muestras estudiadas; de entre ellos, el clordano y el p,p'DDE alcanzan muy altas concentraciones en más del 75% de ellas. Se puede observar cómo mirex, endosulfán beta, endosulfán diol, o,p'DDT y metoxicloro no se han detectado en, al menos, el 50% de las muestras de leche materna obtenidas. Sólo uno de estos pesticidas, el endosulfán sulfato, contaminaba menos del 25% de las muestras de leche humana.

Tabla XII. *Percentiles 25, 50 y 75 de los diferentes pesticidas organoclorados (en ng/mL) en leche humana.*

	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75
Lindano	0.1875	0.3550	0.9475
Aldrín	0.4100	1.4250	2.4425
Dieldrín	$4.5 \cdot 10^{-2}$	0.4700	0.8250
Mírex	L.D.	L.D.	2.1525
Clordano	6.9700	15.5750	36.9400
Endosulfán alfa	L.D.	$6.5 \cdot 10^{-2}$	0.1775
Endosulfán beta	L.D.	L.D.	0.7250
Endosulfán éter	0.1425	0.3000	0.7575
Endosulfán lactona	$4.25 \cdot 10^{-2}$	$8.5 \cdot 10^{-2}$	0.2200
Endosulfán diol	L.D.	L.D.	0.1000
Endosulfán sulfato	L.D.	L.D.	L.D.
p,p'DDE	10.3375	24.7350	50.6425
p,p'DDD	L.D.	4.1300	16.2475
o,p'DDT	L.D.	L.D.	0.3525
p,p'DDT	L.D.	1.0800	3.2800
Metoxicloro	L.D.	L.D.	1.0025

L.D.: Límite de Detección.

Han sido cuantificadas, en las muestras obtenidas de leche materna, las concentraciones de distintos AGPI, tanto de la serie n-3 (ALA y DHA) como de la serie n-6 (AL y AA), expresadas en forma de porcentaje respecto al total de grasa (Tablas XIII, XIV y XV). Igualmente, las concentraciones de las vitaminas liposolubles A y E quedan expuestas en las tablas siguientes (Tablas XVI, XVII y XVIII).

Tabla XIII. *Contenido de Ácidos Grasos en leche calostroal.*

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS
AL [§]	25	11.19	22.80	16.38	2.74
ALA [§]	25	0.23	0.56	0.36	7.44 · 10 ⁻²
AA [§]	25	0	1.05	0.69	0.19
DHA [§]	25	0.27	0.78	0.49	0.10
AL/ALA	25	31	69	46.15	8.78
AA/DHA	25	0	2.39	1.43	0.45

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar.

AL: ácido linoleico; *ALA*: ácido α-linolénico; *AA*: ácido araquidónico; *DHA*: ácido docosahexaenoico.

[§]: en porcentaje wt/wt del total de grasa.

Tabla XIV. *Contenido de Ácidos Grasos en leche de transición.*

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS
AL [§]	24	8.80	24.10	15.74	4.12
ALA [§]	24	0.33	1.79	0.65	0.32
AA [§]	24	0.50	0.92	0.65	0.11
DHA [§]	24	0.29	0.90	0.50	0.17
AL/ALA	24	10.35	51.44	27.14	9.51
AA/DHA	24	0.59	2.26	1.42	0.45

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar.

AL: ácido linoleico; *ALA*: ácido α-linolénico; *AA*: ácido araquidónico; *DHA*: ácido docosahexaenoico.

[§]: en porcentaje wt/wt del total de grasa.

Tabla XV. *Contenido de Ácidos Grasos en leche madura.*

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS
AL^{\$}	15	10.73	25.30	17.55	4.20
ALA^{\$}	15	0.41	2.68	0.82	0.55
AA^{\$}	15	0.23	0.69	0.54	0.11
DHA^{\$}	15	0.20	0.56	0.38	0.11
AL/ALA	15	7.78	47.94	25.79	10.64
AA/DHA	15	0.61	2.42	1.55	0.55

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar.

AL: ácido linoleico; *ALA*: ácido α -linolénico; *AA*: ácido araquidónico; *DHA*: ácido docosahexaenoico.

^{\$}: en porcentaje wt/wt del total de grasa.

Tabla XVI. *Contenido de vitamina A y vitamina E en leche calostral.*

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS
Vit E / Vit A	25	1.49	97.51	9.90	18.68
Vit E⁺	25	0.26	4.94	1.31	0.90
Vit A⁺	25	0.01	0.6	0.22	0.12

Vit E: vitamina E; *Vit A*: vitamina A.

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar.

⁺: en mg/dL.

Tabla XVII. *Contenido de vitamina A y vitamina E en leche de transición.*

	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS
Vit E / Vit A	24	1.52	11.01	4.27	1.98
Vit E⁺	24	0.20	1.40	0.54	0.21
VitA⁺	24	0.05	0.34	0.14	$6.70 \cdot 10^{-2}$

Vit E: vitamina E; *Vit A*: vitamina A.

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar

⁺: en mg/dL.

Tabla XVIII. *Contenido de vitamina A y vitamina E y en leche madura.*

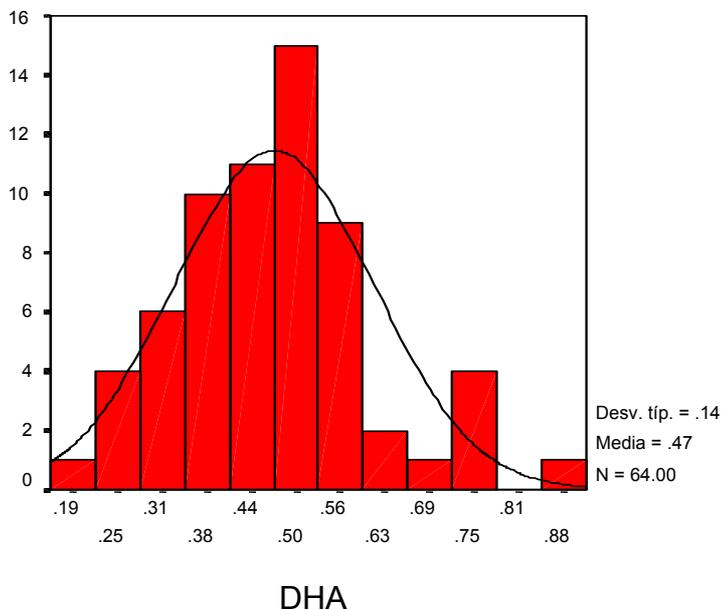
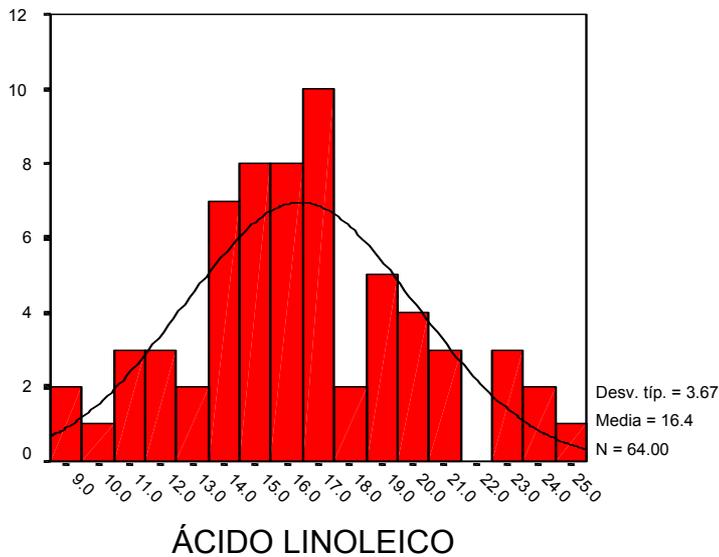
	n	Mínimo	Máximo	Media	±DS
Vit E / Vit A	15	1.27	52.52	7.11	12.90
Vit E⁺	15	0.13	0.99	0.36	0.21
VitA⁺	15	0.01	0.21	0.10	$5.60 \cdot 10^{-2}$

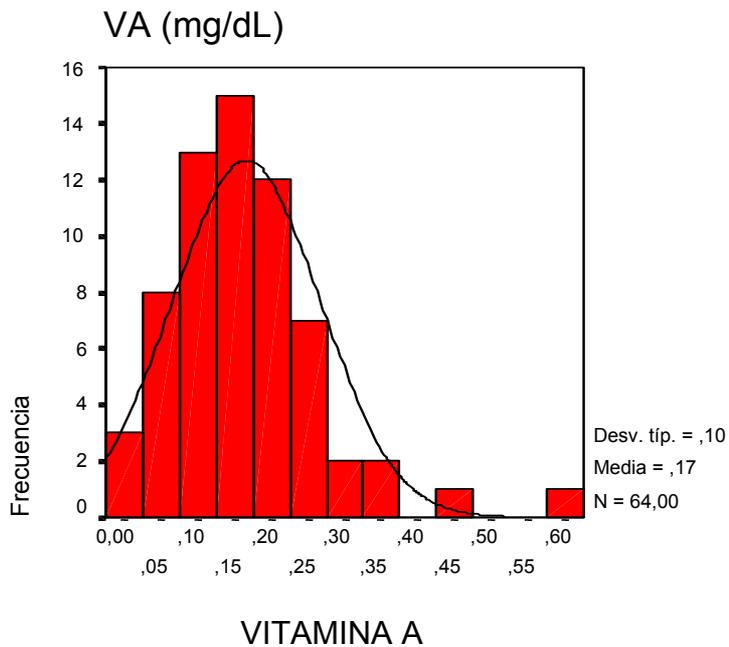
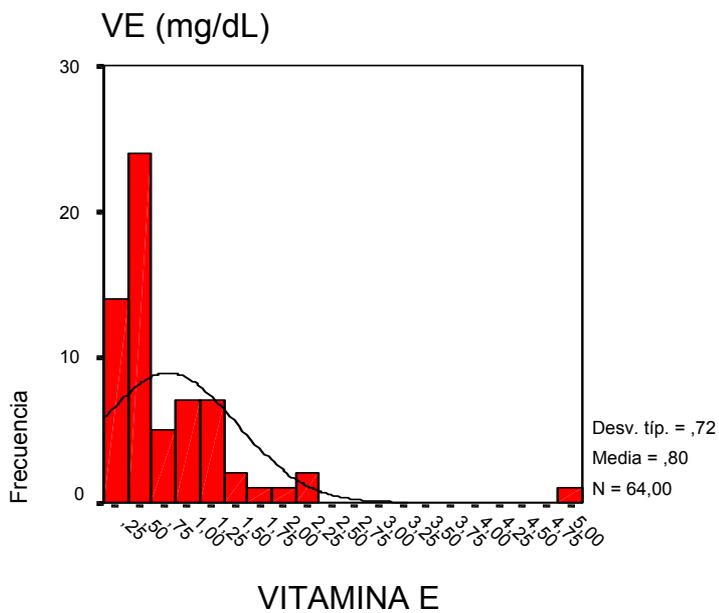
Vit E: vitamina E; *Vit A*: vitamina A.

n: número de casos; *DS*: Desviación estándar

⁺: en mg/dL.

Los histogramas representativos de las concentraciones de los distintos AGPI en las muestras de leche materna (sin tener en cuenta cada período de lactancia) se muestran a continuación, pudiéndose observar que siguen una distribución Normal (v.g. AL y DHA). Los valores de las concentraciones de las vitaminas A y E también se ajustan a este tipo de distribución estadística.





2. ANÁLISIS COMPARATIVO

En las siguientes tablas quedan expuestas las oscilaciones de los distintos pesticidas a lo largo de la lactancia, así como las comparaciones existentes entre ellos. Puede apreciarse cómo todos ellos se encuentran de forma persistente desde el calostro hasta la leche madura; en otros casos, son los metabolitos de los pesticidas encontrados en leche calostrual los que se observan en épocas posteriores. Sólo hay dos de ellos cuyas concentraciones experimentan cambios significativos conforme avanza la lactancia; a saber: endosulfán lactona en leche calostrual, cuyas concentraciones se ven incrementadas con respecto a la leche de transición y a la madura; y el metoxicloro calostrual cuyos niveles aumentan en relación a la leche madura (Tabla XIX, XX, XXI y XXII).

En las tablas XXIII y XXIV quedan reflejadas las diferencias encontradas tras la comparación de los ácidos grasos analizados entre las distintas épocas de la lactancia. Nótese el incremento de las concentraciones medias del ácido linolénico (precursor del ácido docosahexaenoico) conforme avanza la lactancia, mientras que la concentración del ácido linoleico (precursor del Ácido Araquidónico) se mantiene constante. Por este mismo motivo, el índice linoleico/linolénico va decreciendo desde la leche calostrual a la leche madura (Figuras 3 y 4). El DHA y el AA son aportados en el calostro y en la leche de transición en una concentración significativamente más elevada que en la madura. El cociente AA/DHA no experimenta modificación alguna conforme avanza la lactancia (figura 3).

Tabla XIX. Comparación múltiple de las concentraciones de pesticidas en leche calostroal, transición y madura (en ng/mL).

	Calostro	Transición	Madura
	0 ±DS	0 ±DS	0 ±DS
Lindano	1.68±2.30	0.68±1.73	0.49±0.53
Aldrín	3.00±6.19	1.73±2.09	2.35±4.27
Dildrín	0.69±0.46	0.75±1.81	0.59±0.89
Mírex	1.14±2.55	1.46±1.90	1.42±2.49
Clordano	44.05±58.07	26.15±47.17	23.84±47.75
Endosulfán alfa	0.11±0.12	0.43±1.34	8.93·10 ⁻² ±0.14
Endosulfán beta	1.47±3.55	3.71±6.11	3.39±7.84
Endosulfán éter	1.44±4.14	1.96±3.95	3.15±10.76
Endosulfán lactona	6.36·10 ⁻² ±6.13·10 ⁻²	0.23±0.28*	0.61±0.60[#]
Endosulfán diol	0.12±0.28	6.63·10 ⁻² ±0.20	4.20·10 ⁻² ±7.99·10 ⁻²
Endosulfán sulfato	0.48±1.32	2.35±5.58	0.34±1.14
p,p'DDE	33.41±38.34	36.23±27.97	32.35±26.07
p,p'DDD	10.98±14.73	7.81±10.46	9.91±15.17
o,p'DDT	0.20±0.55	0.64±1.39	0.20±0.45
p,p'DDT	3.43±10.78	4.30±7.36	3.66±6.00
Metoxicloro	5.64·10 ⁻² ±0.16	21.21±48.11	0.19±0.38[#]

* Transición vs calostro ($p < 0.05$)

[#] Madura vs calostro ($p < 0.05$)

[&] Madura vs transición ($p < 0.05$)

⁺ en mg/dL

[§] en porcentaje wt/wt del total de grasa

0: media; DS: desviación estándar

Tabla XX. Comparación múltiple de las concentraciones de pesticidas en leche materna (I).

	Ln Lindano		Ln Aldrin		Ln Dieldrin		Ln Mirex		Ln Clordano		Ln Endoalfa	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
T vs C	0.450	0.506	0.026	0.873	0.184	0.671	2.355	0.143	0.032	0.860	1.627	0.213
M vs C	0.990	0.327	0.263	0.611	0.346	0.561	0.362	0.563	1.040	0.317	0.050	0.825
M vs T	0.042	0.839	0.460	0.503	0.004	0.952	0.462	0.506	1.340	0.258	0.629	0.437

* Significación: $p < 0.05$.

T vs C: Transición vs Calostro; M vs C: Madura vs calostro ;M vs T: Madura vs Transición. Endoalfa: endosulfán alfa.

Tabla XXI. Comparación múltiple de las concentraciones de pesticidas en leche materna (II).

	Ln Endobeta		Ln Endoeter		Ln Endolact		Ln Endodiol		Ln Endosulfa		Ln p.p'DDE	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
T vs C	1.091	0.317	0.196	0.660	13.694	0.001*	0.000	0.989	0.064	0.807	0.370	0.546
M vs C	0.327	0.825	0.028	0.868	15.545	0.000*	0.009	0.927	0.339	0.582	0.002	0.963
M vs T	1.947	0.190	0.299	0.588	0.005	0.946	0.005	0.947	1.063	0.333	0.174	0.679

* Significación: $p < 0.05$.

T vs C: Transición vs Calostro; M vs C: Madura vs calostro ;M vs T: Madura vs Transición.

Endobeta: endosulfán beta; Endoeter: endosulfán éter; Endolact: endosulfán lactona;

Endodiol: endosulfán diol; Endosulfa: endosulfán sulfato

Tabla XXII. Comparación múltiple de las concentraciones de pesticidas en leche materna (y III).

	Ln p.p.'DDD		Ln o.p.'DDT		Ln p.p.'DDT		Ln Metoxi	
	F	p	F	p	F	p	F	p
T vs C	0.525	0.475	2.019	0.179	0.126	0.725	0.937	0.347
M vs C	0.348	0.562	0.001	0.980	0.095	0.761	19.009	0.007*
M vs T	0.011	0.918	1.823	0.202	0.484	0.493	0.163	0.693

* Significación: $p < 0.05$.

T vs C: Transición vs Calostro; M vs C: Madura vs calostro ;M vs T: Madura vs Transición.

Metoxi: Metoxicloro.

Tabla XXIII. Comparación múltiple de las concentraciones de ácidos grasos en leche calostroal, transición y madura.

	Calostro	Transición	Madura
	0 ±DS	0 ±DS	0 ±DS
AL ^{\$}	16.38±2.74	15.74±4.11	17.55±4.20
ALA ^{\$}	0.36±7.44 x 10 ⁻²	0.65±0.32 *	0.82±0.55 #
AA ^{\$}	0.69±0.19	0.65±0.11	0.54±0.11 #&
DHA ^{\$}	0.49±0.10	0.50±0.17	0.38±0.11 #&
AL/ALA	46.15±8.78	27.14±9.51*	25.79±10.64 #
AA/DHA	1.43±0.45	1.42±0.45	1.55±0.55

* Transición vs calostro ($p<0.05$); # Madura vs calostro ($p\neq 0.05$); & Madura vs Transición ($p<0.05$); \$ en porcentaje wt/wt del total de grasa; 0 :media; DS: Desviación estándar; AL: ácido linoleico; ALA: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; DHA: ácido docosahexaenoico.

Tabla XXIV. Comparación múltiple de las concentraciones de ácidos grasos en leche materna

	AL		ALA		AA		DHA	
	F	p	F	p	F	p	F	p
T vs C	3.471	0.069	9.162	0.004*	1.776	0.383	0.586	0.979
M vs C	3.661	0.063	7.295	0.010*	3.811	0.015*	6.004	0.012*
M vs T	0.120	0.889	0.755	0.390	3.157	0.015*	5.225	0.024*

* Significación: $p<0.05$.

T vs C: Transición vs Calostro; M vs C: Madura vs calostro ;M vs T: Madura vs Transición.

AL: ácido linoleico; ALA: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; DHA: ácido docosahexaenoico.

Figura 3

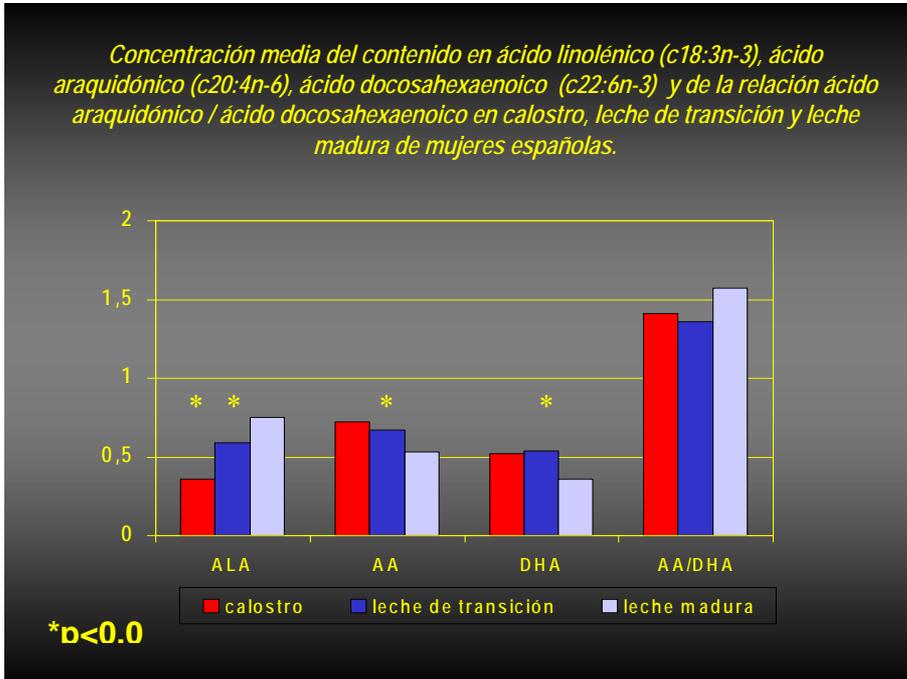
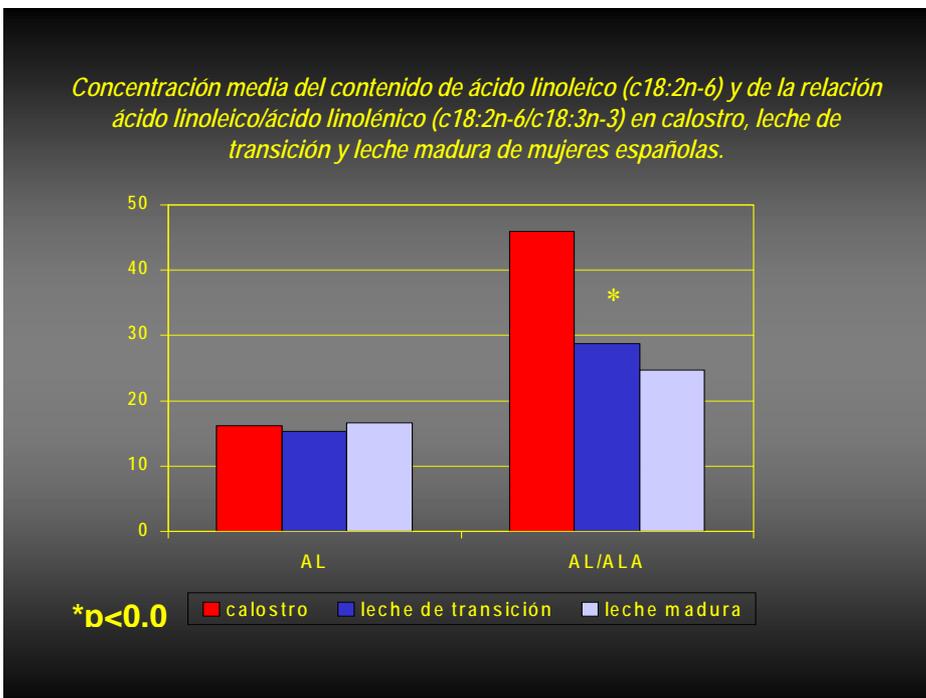


Figura 4



Al establecer la comparación entre las vitaminas liposolubles en las distintas épocas de la lactancia, se demuestra que, tanto la vitamina A como la E, son excretadas en leche calostroal en una alta concentración frente a épocas posteriores. La vitamina E, además, se excreta en una concentración significativamente más baja en leche madura respecto al período previo (Tablas XXV y XXVI).

Tabla XXV. Comparación múltiple de las concentraciones de vitamina A y vitamina E en leche calostroal, transición y madura.

	Calostro	Transición	Madura
	0 ±DS	0 ±DS	0 ±DS
Vit E⁺	1.31±0.90	0.54±0.21 *	0.36±0.21 #&
VitA⁺	0.22±0.11	0.14±6.70 x 10 ⁻² *	0.10±5.6 x 10 ⁻² #

* Transición vs calostro ($p<0.05$); # Madura vs calostro ($p<0.05$); & Madura vs Transición ($p<0.05$); + en mg/dL; 0 :media; DS: Desviación estándar; Vit E: vitamina E; Vit A: vitamina A..

Tabla XXVI. Comparación múltiple de las concentraciones de vitamina E y vitamina A en leche materna.

	Vitamina E		Vitamina A	
	F	p	F	p
T vs C	8.189	0.006*	5.707	0.018*
M vs C	4.556	0.039*	9.026	0.000*
M vs T	3.262	0.050*	2.367	0.149

* Significación: $p<0.05$.

T vs C: Transición vs Calostro; M vs C: Madura vs calostro ;M vs T: Madura vs Transición.

3. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

En la búsqueda de evidencias que demuestren la excreción conjunta de los PO y los AGPI, se llevaron a cabo los correspondientes análisis de correlación, cuyos resultados se exponen a continuación. La Tabla XXVII expone claramente las correlaciones lineales y directas constatadas en las distintas épocas de la lactancia entre diferentes pesticidas organoclorados y los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena. Por ejemplo, en la leche de transición, existe evidencia de una correlación lineal y positiva entre el ácido araquidónico y metabolitos del DDT (Figuras 5 y 6), así como entre el ácido linolénico y el endosulfán éter. En esta época de la lactancia, el endosulfán lactona sufre una excreción en la leche paralela a la del DHA. Este pesticida muestra una excreción estrechamente ligada, y de forma directa, a la del ácido linolénico en la leche madura (Figura 7). Por el contrario, existen correlaciones negativas, es decir, que se ha objetivado la relación inversa entre la excreción en leche materna de algunos pesticidas y los AGPI [v.g. Endosulfán lactona y DHA en leche madura (figura 8) y DDD con AL en la leche de transición].

Si se analizan las correlaciones entre PO y AGPI sin tener en consideración la época de la lactancia que se trate, encontramos coincidencias con los resultados hallados anteriormente: el lindano se sigue relacionando directa y significativamente con el DHA, al igual que el endosulfán lactona y el ALA o el endosulfán diol con el AA; el p.p'DDD aparece correlacionado de forma inversa con el AL (Tabla XXVIII). Se muestran en la citada tabla otras correlaciones directas no encontradas anteriormente: a saber, el lindano con el ALA; el endosulfán alfa y el endosulfán lactona con el AL.

Cuando se buscan en las muestras de leche materna obtenidas las correlaciones existentes entre los distintos PO entre sí se demuestra que muchos de ellos se hallan íntimamente relacionados. Así, por ejemplo, aldrín y dieldrín se encuentran claramente vinculados de forma directa entre sí. Cada uno de ellos, por separado, se muestra relacionado con otros PO del grupo de los endosulfanes y también del grupo de los DDT. Los pesticidas endosulfán alfa y beta también se hallan en leche materna en concentraciones directamente relacionadas con sus metabolitos, al igual que ocurre con el DDT y derivados (Tabla XXIX).

Los estudios que se establecieron en las distintas muestras de leche también incluyeron un análisis de correlación entre las concentraciones de los distintos PO y las vitaminas liposolubles E y A (Tabla XXX). La única correlación encontrada en este trabajo de investigación implica a la vitamina E y al pesticida endosulfán lactona; el signo del coeficiente de correlación de Pearson es negativo, lo cual implica que la concentración de endosulfán lactona desciende conforme aumentan los niveles de vitamina E en leche materna y viceversa. No se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre la vitamina A presente en la leche materna y ningún pesticida.

Tabla XXVII. *Correlaciones y significaciones estadísticas constatadas entre PO y AGPICL en las distintas épocas de lactancia.*

	Calostro (n=25)		Transición (n=24)		Madura (n=15)	
	r	p	r	P	r	p
Lindano/DHA	-	-	-	-	0.68	0.005
Aldrín/AL	0.44	0.027	-	-	-	-
Dieldrín/DHA	-	-	-	-	0.56	0.028
Dieldrín/(n-3/n-6)	-0.44	0.030	-	-	-	-
Mírex/ALA	-	-	0.45	0.028	-	-
Mírex/DHA	0.50	0.011	-	-	-	-
Clordano/ALA	0.45	0.023	-	-	-	-
Clordano/DHA	-	-	-	-	0.62	0.013
Endosulfán éter/ALA	-	-	0.41	0.046	-	-
Endosulfán lactona/DHA	-	-	0.42	0.039	-0.54	0.037
Endosulfán lactona/ALA	-	-	-	-	0.62	0.015
Endosulfán lactona/(AA/DHA)	-	-	-	-	0.66	0.008
Endosulfán diol/AA	0.43	0.031	-	-	-	-
Endosulfán diol/DHA	-	-	-	-	0.55	0.035
Endosulfán diol/(AA/DHA)	0.43	0.032	-	-	-	-
Endosulfán diol/(n-3/n-6)	-	-	-	-	0.52	0.047
p,p'DDD/AL	-	-	-0.45	0.029	-0.52	0.050
o,p'DDT/AA	-	-	0.41	0.048	-	-
p,p'DDT/AA	-	-	0.45	0.026	-	-
Metoxicloro/DHA	0.57	0.003	-	-	-	-

n: número de casos; *r*: coeficiente de correlación de Pearson; *p*: nivel de significación estadística; AL: ácido linoleico; ALA: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; DHA: ácido docosahexaenoico

Tabla XXVIII. Correlaciones y significaciones estadísticas constatadas entre pesticidas organoclorados y ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena presentes en leche materna.

		AL	ALA	AA	DHA
Ln Lindano	r	-0.064	-0.367	0.151	0.344
	p	0.654	0.008*	0.292	0.013*
Ln Aldrín	r	0.037	-0.108	0.135	0.060
	p	0.782	0.420	0.312	0.652
Ln Dieldrín	r	0.044	-0.213	0.146	0.063
	p	0.769	0.146	0.323	0.671
Ln Mírex	r	0.392	0.229	0.183	0.138
	p	0.058	0.281	0.392	0.519
Ln Clordano	r	0.044	-0.257	0.146	0.060
	p	0.764	0.075	0.317	0.683
Ln Endosulfán alfa	r	0.376	0.000	0.306	-0.067
	p	0.020*	1	0.061	0.689
Ln Endosulfán beta	r	0.148	-0.071	0.064	0.290
	p	0.545	0.772	0.795	0.228
Ln Endosulfán éter	r	0.004	0.150	-0.032	0.183
	p	0.976	0.241	0.803	0.152
Ln Endosulfán lactona	r	0.284	0.378	-0.118	-0.092
	p	0.041*	0.006*	0.406	0.516
Ln Endosulfán diol	r	0.320	0.246	0.621	-0.088
	p	0.157	0.283	0.003*	0.705
Ln Endosulfán sulfato	r	0.007	-0.308	0.614	0.280
	p	0.981	0.284	0.020*	0.332
Ln p,p'DDE	r	-0.185	0.067	0.035	0.205
	p	0.144	0.598	0.783	0.105
Ln p,p'DDD	r	-0.490	-0.052	-0.006	0.049
	p	0.003*	0.771	0.972	0.784
Ln o,p'DDT	r	0.249	-0.074	0.361	-0.063
	p	0.304	0.762	0.128	0.797
Ln p,p'DDT	r	0.313	0.078	0.186	0.020
	p	0.056	0.640	0.262	0.904
Ln Metoxicloro	r	-0.023	-0.091	0.240	0.070
	p	0.919	0.687	0.281	0.758

* Significación: $p < 0.05$; $r =$ Coeficiente de Correlación de Pearson

Tabla XXIX. Correlaciones y significaciones estadísticas constatadas entre los distintos pesticidas organoclorados entre sí (en Ln).

		Linda no	Aldrín	Diel drín	Mírex	Clor dano	Endo alfa	Endo beta	Endo eter	Endo lact	Endo diol	Endo sulfa	p,p' DDE	p,p' DDD	o,p' DDT	p,p' DDT	Metoxi
Lindano	r																
	p																
Aldrín	r	0.252															
	p	0.087															
Dieldrín	r	0.283	0.410														
	p	0.077	0.005*														
Mírex	r	0.113	0.220	-0.201													
	p	0.607	0.313	0.424													
Clordano	r	0.246	0.387	0.700	-0.027												
	p	0.120	0.007*	0.000*	0.909												
Endoalfa	r	0.278	0.425	0.755	-0.200	0.603											
	p	0.130	0.010*	0.000*	0.459	0.000*											
Endobeta	r	-0.044	0.310	-0.156	0.365	-0.140	0.129										
	p	0.867	0.211	0.565	0.334	0.605	0.646										
Endoeter	r	0.103	0.288	0.196	0.505	0.075	0.260	0.641									
	p	0.474	0.028*	0.182	0.012*	0.609	0.121	0.003*									
Endolact	r	-0.159	0.032	-0.058	0.316	0.045	0.218	-0.601	0.166								
	p	0.308	0.828	0.729	0.152	0.781	0.238	0.014*	0.238								
Endodiol	r	-0.135	0.193	0.706	0.547	0.582	0.690	-0.052	0.283	0.132							
	p	0.581	0.429	0.001*	0.128	0.007*	0.009*	0.865	0.214	0.612							
Endosulfa	r	0.007	0.183	-0.139	0.457	0.070	0.684	0.837	0.571	0.389	0.638						
	p	0.985	0.569	0.667	0.362	0.811	0.029*	0.019*	0.033*	0.189	0.123						
p,p'DDE	r	0.388	0.314	0.213	0.305	0.195	0.129	0.373	0.463	0.221	-0.127	0.445					
	p	0.005*	0.016*	0.146	0.147	0.180	0.442	0.116	0.000*	0.115	0.585	0.111					
p,p'DDD	r	-0.067	-0.095	-0.202	0.166	-0.004	-0.362	-0.284	0.022	-0.120	-0.326	-0.492	0.300				
	p	0.737	0.598	0.293	0.606	0.982	0.106	0.397	0.900	0.522	0.255	0.124	0.084				
o,p'DDT	r	0.179	0.600	0.447	0.574	0.450	0.774	0.220	0.189	0.313	0.559	0.712	0.190	-0.151			
	p	0.558	0.014*	0.095	0.106	0.080	0.001*	0.493	0.452	0.256	0.093	0.032*	0.436	0.640			
p,p'DDT	r	-0.081	0.460	0.268	0.352	0.422	0.525	0.455	0.195	0.537	0.466	0.416	0.327	-0.493	0.763		
	p	0.688	0.005*	0.160	0.166	0.023*	0.005*	0.077	0.247	0.002*	0.069	0.157	0.045*	0.020*	0.000*		
Metoxi	r	-0.261	0.301	0.469	0.088	0.411	0.551	0.647	0.409	0.027	0.678	0.706	0.081	-0.361	0.702	0.266	
	p	0.296	0.185	0.050*	0.775	0.057	0.033*	0.165	0.058	0.905	0.064	0.050*	0.720	0.169	0.052	0.338	

r = Coeficiente de Correlación de Pearson; * Significación: $p < 0.05$. Metoxi: Metoxicloro; Endoalfa: endosulfán alfa; Endobeta: endosulfán beta; Endoeter: endosulfán éter; Endolact: endosulfán lactona; Endodiol: endosulfán diol; Endosulfa: endosulfán sulfato.

Tabla XXX. Correlaciones encontradas entre los pesticidas organoclorados estudiados y las vitaminas E y A en leche materna.

		<i>Vitamina E</i>	<i>Vitamina A</i>
<i>Ln Lindano</i>	r	0.122	0.121
	p	0.394	0.396
<i>Ln Aldrín</i>	r	0.62	0.015
	p	0.646	0.911
<i>Ln Dieldrín</i>	r	0.056	0.007
	p	0.703	0.962
<i>Ln Mírex</i>	r	0.106	0.021
	p	0.622	0.923
<i>Ln Clordano</i>	r	0.066	0.121
	p	0.652	0.408
<i>Ln Endosulfán alfa</i>	r	0.010	0.028
	p	0.951	0.869
<i>Ln Endosulfán beta</i>	r	-0.213	0.019
	p	0.382	0.939
<i>Ln Endosulfán éter</i>	r	0.106	-0.106
	p	0.409	0.408
<i>Ln Endosulfán lactona</i>	r	-0.370	-0.252
	p	0.007*	0.072
<i>Ln Endosulfán diol</i>	r	0.105	-0.162
	p	0.651	0.483
<i>Ln Endosulfán sulfato</i>	r	0.121	0.148
	p	0.680	0.613
<i>Ln p,p'DDE</i>	r	-0.009	-0.042
	p	0.943	0.742
<i>Ln p,p'DDD</i>	r	-0.152	-0.048
	p	0.392	0.786
<i>Ln o,p'DDT</i>	r	-0.177	-0.045
	p	0.468	0.855
<i>Ln p,p'DDT</i>	r	-0.004	0.025
	p	0.983	0.883
<i>Ln Metoxicloro</i>	r	-0.128	0.200
	p	0.570	0.371

r= Coeficiente de Correlación de Pearson

* Significación: $p < 0.05$;

Figura 5

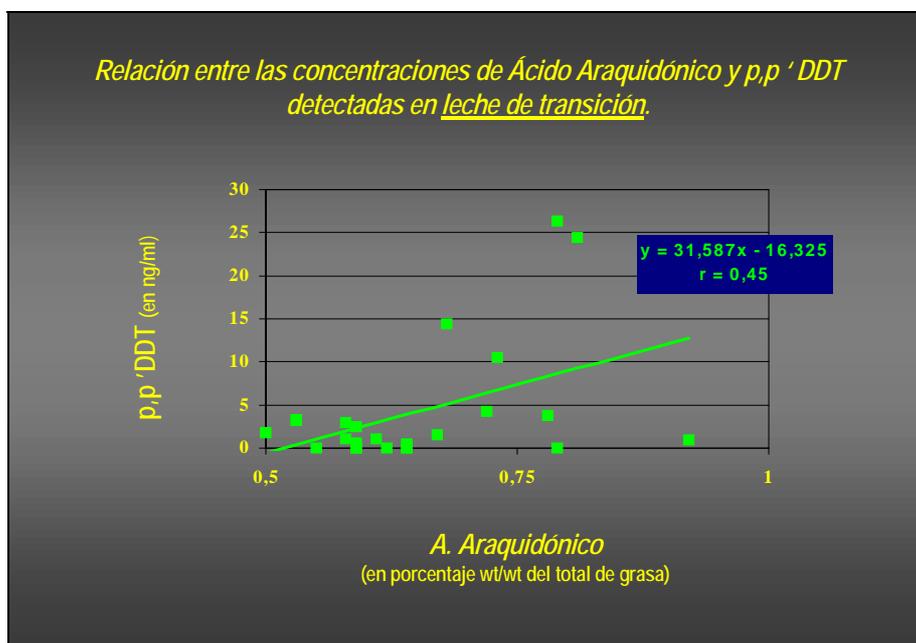


Figura 6

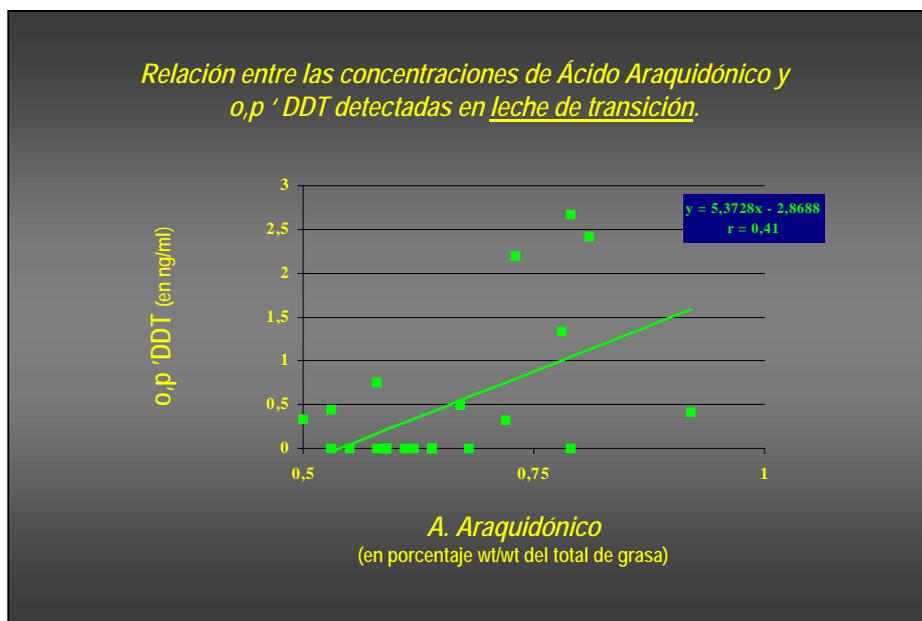


Figura 7

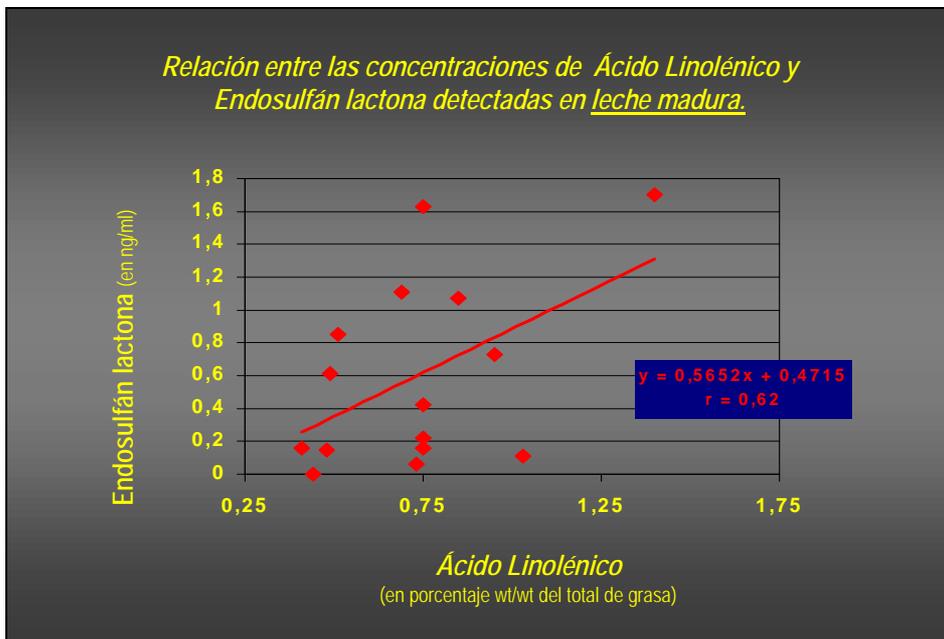
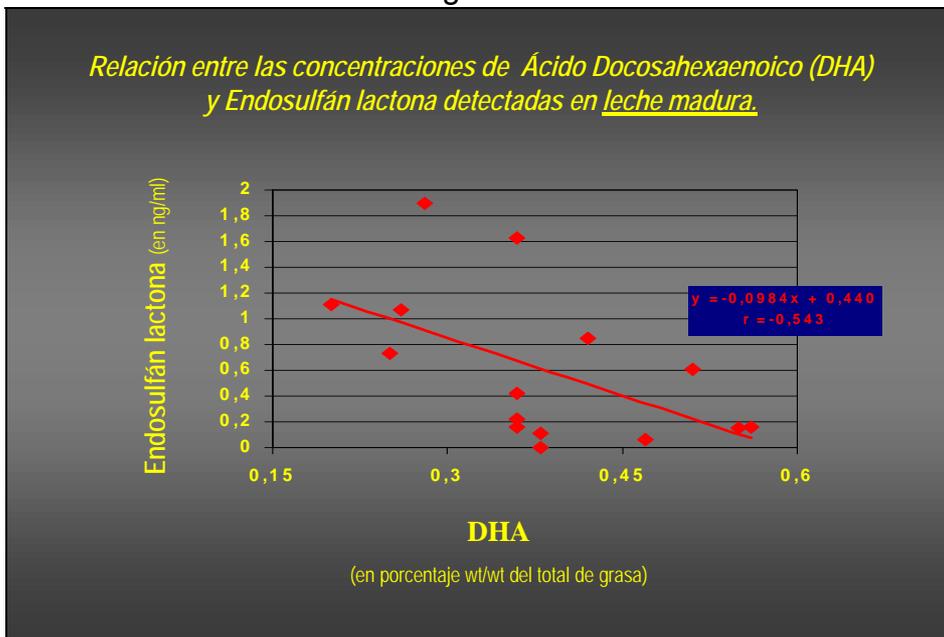


Figura 8



En cuanto a las relaciones existentes entre los distintos tipos de grasa y vitaminas de la dieta y la aparición de los ácidos grasos y vitaminas liposolubles en leche, los resultados se muestran en la Tabla XXXI. Se ha encontrado correlación directa entre la cantidad de grasa ingerida y la que se aporta en forma de sus distintos ácidos grasos (AGS, AGM y AGPI), así como de cada uno los tipos de ácidos grasos entre sí. Esta cantidad total de grasa de la dieta se correlaciona negativamente con la concentración de vitamina E y A en la leche materna (Figuras 9 y 10); igual ocurre con los AGS y los AGM de la dieta. El nivel de vitamina A en la dieta se halla relacionada de forma directa con la ingesta de vitamina E.

Además, una mayor ingesta de grasa, AGS, AGPI lleva aparejada de forma significativa, según los resultados de este trabajo de investigación, una mayor ingesta de vitamina A. En este sentido, se ha evidenciado una correlación positiva entre los AGM y los AGPI de la dieta y la ingesta de vitamina E.

En cuanto al AA contenido en las muestras de leche recogidas, se correlaciona directamente con el DHA contenido en ellas (Figura 11).

El ALA contenido en la leche se correlaciona de forma inversa con la cantidad de vitaminas E y A en ella. Asimismo, las concentraciones de estas vitaminas están correlacionadas directamente entre sí, de forma que cuanto mayor es la concentración de vitamina A en leche materna, mayor es también la de vitamina E (Figura 12).

Tabla XXXI. Correlaciones entre las grasas y vitaminas de la dieta y su aparición en la leche materna.

	Grasa dieta	AGS dieta	AGM dieta	AGPI dieta	Vit E dieta	Vit A dieta	AL leche	ALA leche	AA leche	DHA leche	Vit E leche	Vit A leche
Grasa dieta	r											
	p											
AGS dieta	r	0.802										
	p	0.000*										
AGM dieta	r	0.830	0.652									
	p	0.000*	0.000*									
AGPI dieta	r	0.627	0.426	0.527								
	p	0.000*	0.000*	0.000*								
Vit E dieta	r	0.189	-0.128	0.297	0.328							
	p	0.134	0.315	0.017*	0.008*							
Vit A dieta	r	0.565	0.246	0.242	0.378	0.565						
	p	0.000*	0.050*	0.054	0.002*	0.000*						
AL leche	r	-0.044	0.012	0.028	0.132	0.147	0.004					
	p	0.731	0.927	0.827	0.297	0.247	0.973					
ALA leche	r	0.112	0.188	0.172	0.039	-0.028	-0.224	0.326				
	p	0.377	0.137	0.174	0.760	0.070	0.075	0.009*				
AA leche	r	-0.103	-0.117	-0.005	0.051	0.072	0.089	0.082	0.172			
	p	0.416	0.358	0.968	0.688	0.571	0.483	0.521	0.175			
DHA leche	r	0.159	0.033	0.033	0.050	0.115	0.184	-0.184	0.228	0.266		
	p	0.209	0.795	0.795	0.694	0.365	0.145	0.146	0.070	0.034*		
Vit E leche	r	-0.293	-0.370	-0.310	-0.201	0.090	-0.081	0.087	-0.275	0.134	0.028	
	p	0.019*	0.003*	0.013*	0.112	0.479	0.524	0.493	0.028*	0.290	0.825	
Vit A leche	r	-0.180	-0.318	-0.232	-0.100	0.175	-0.101	-0.071	-0.375	0.129	0.083	0.422
	p	0.154	0.010*	0.065	0.431	0.167	0.427	0.578	0.009*	0.309	0.515	0.001*

r: coeficiente de correlación de Pearson; *significación $p < 0.05$.

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. AL: ácido linoleico; ALA: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; DHA: ácido docosaheptaenoico. Vit E: vitamina E; Vit A: vitamina A.

Figura 9

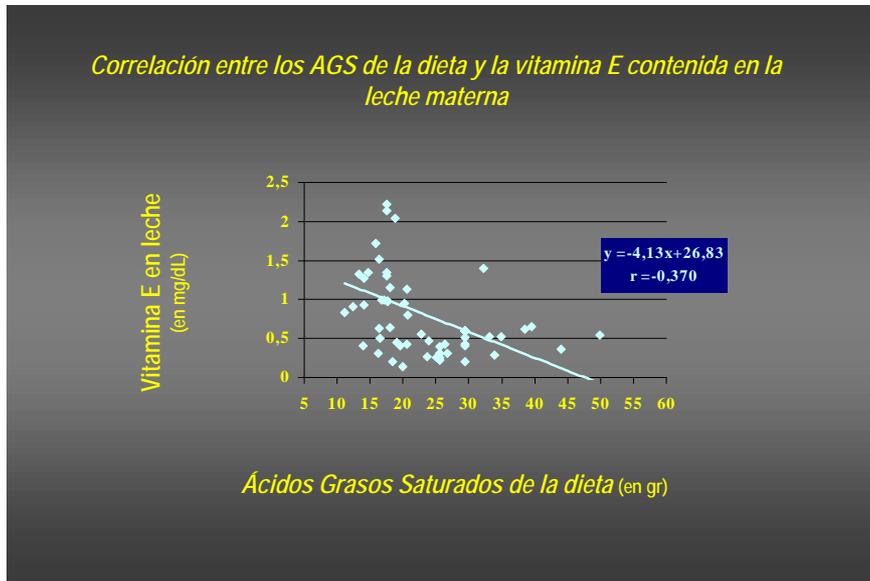


Figura 10

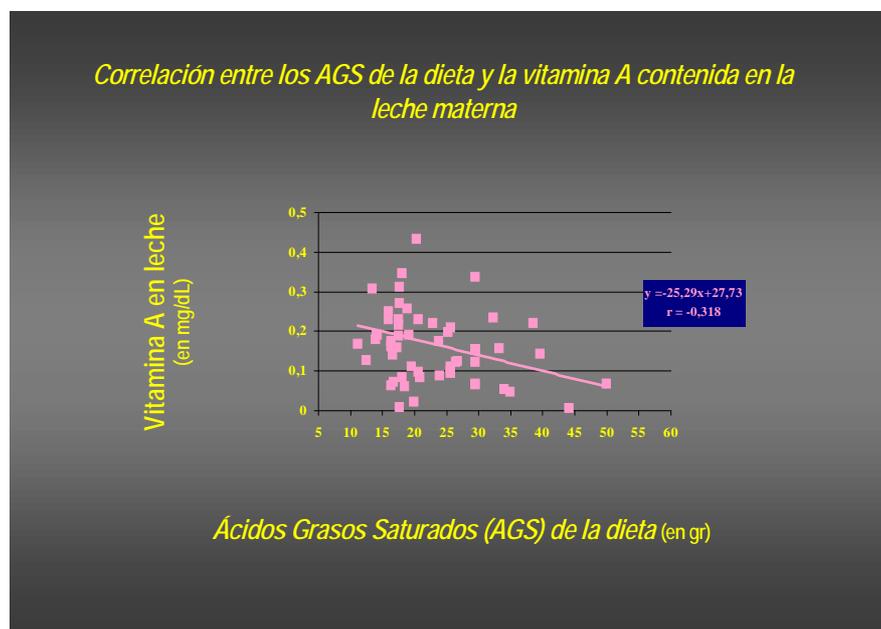


Figura 11

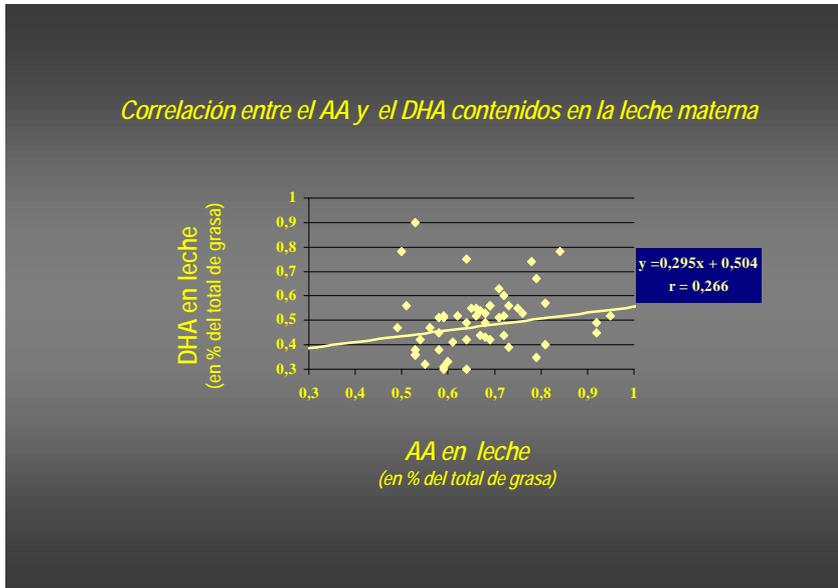
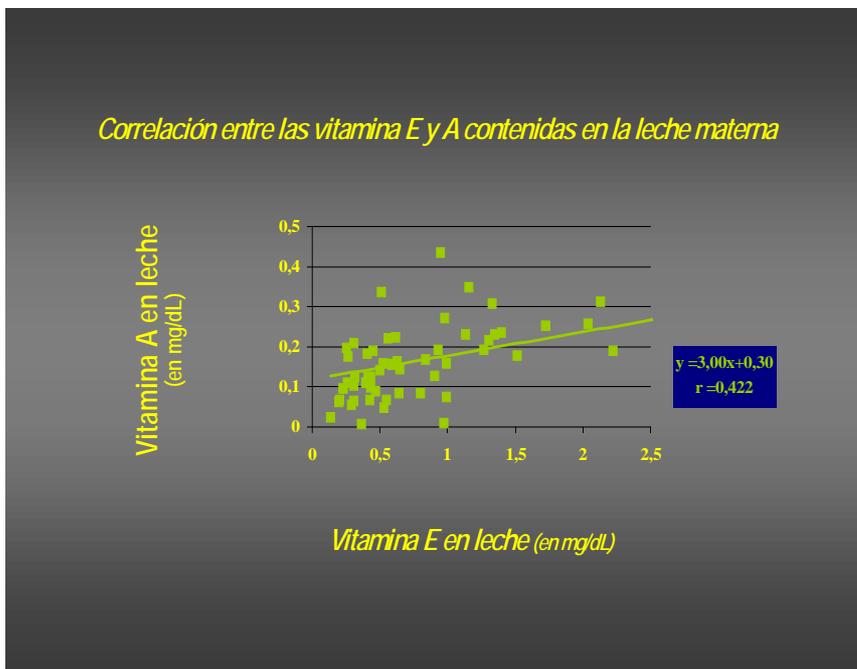


Figura 12



4. EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA

En la tabla XXXII aparecen las concentraciones mínimas, máximas y medias así como la desviación estándar del análisis de los nutrientes ingeridos diariamente por las madres lactantes estudiadas. En la tabla XXXIII se muestran las diferencias de la ingesta de las madres lactantes del presente estudio respecto a las RDA de 2002 (RDA, 2002). El número de encuestas analizadas de acuerdo con las muestras de leche obtenidas en cada período han sido un total de 192, correspondientes a las 25 muestras de calostro, 24 de leche de transición y 15 a leche madura.

Tabla XXXII. Aporte energético diario, macro y micronutrientes contenidos en la dieta materna.

	Mínimo	Máximo	<i>Media</i>	<i>±DS</i>
Energía (Kcal)	1445.33	3529.18	2225.44	351.78
Proteínas (g)	52.27	194.07	109.53	28.01
HC (g)	95.64	529.92	243.99	62.05
Grasa (g)	50.60	143.53	82.75	18.99
AGS (g)	11.16	49.91	23.53	7.98
AGM (g)	15.30	55.98	31.97	7.81
AGPI (g)	4.49	24.15	12.66	3.99
Grasa (%)	23.14	47.70	33.62	6.50
AGS (%)	4.59	19.77	9.72	3.35
AGM (%)	5.78	20.46	13.04	2.88
AGPI (%)	6.80	19.34	10.86	2.34
Colesterol (mg)	169.33	1152.48	394.50	139.13
Vit E (mg)	3.62	15.74	7.37	1.94
Vit A (µg)	420.91	1760.72	964.30	284.71
Vit C (mg)	32.67	440.37	134.05	71.61
Vit E/AGPI	0.19	1.35	0.63	0.22
Fibra (g)	2.91	39.09	16.90	5.47
Fe (mg)	6.88	23.63	13.83	2.84
Zn (mg)	4.52	13.92	8.86	1.94

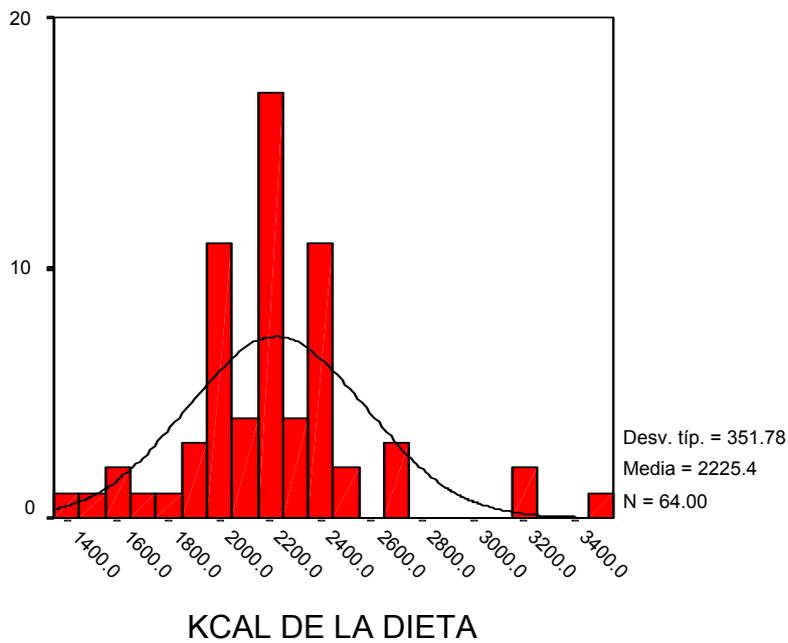
DS: desviación estándar.

Vit E: vitamina E; Vit A: vitamina A; Vit C: vitamina C.

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

HC: hidratos de carbono.

Fe: hierro; Zn: cinc.



Puede observarse cómo los valores de la energía (en Kcal) y la cantidad de colesterol contenidos en la dieta (en mg) siguen una distribución estadística Normal.

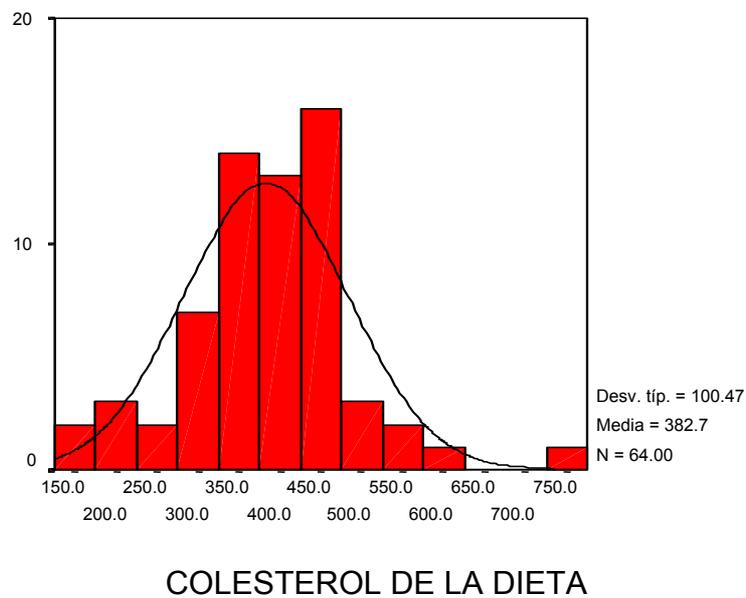


Tabla XXXIII. Comparación entre los aportes energéticos, macro y micronutrientes de la dieta materna en las madres estudiadas y las RDA 2002.

	<i>Rango</i>	<i>Media±DS</i>	RDA 2002	%<RDA
Energía (Kcal/día)	1445.33-3529.18	2225.44±351.78	2700	93.8
Proteínas (g/día)	52.27-194.07	109.53±28.01	71	7.8
HC (g/día)	95.64-529.92	243.99±62.05	175	7.8
Grasa (g/día)	50.60-143.53	82.75±18.99	90	59.4
Grasa (% de aporte calórico)	23.14-47.70	33.62±6.50	35	48.4
AGS (% de grasa)	19.82-41.45	28.30±5.27	30	51.6
AGM (% de grasa)	22.71-52.65	38.78±4.78	40	45.3
AGPI (% de grasa)	16.45-49.95	32.92±7.15	30	40.6
Colesterol (mg)	169.33-1152.48	394.50±139.13	300-350	14.1
Vit E (mg)	3.62-15.74	7.37±1.94	15	98.4
Vit A (µg)	420.91-1760.62	964.30±284.71	770	20.3
Vit C (mg)	32.67-440.40	134.05±71.61	85	20.3
Fe (mg)	6.88-23.63	13.83±2.84	27	100
Zn (mg)	4.52-13.92	8.86±1.94	11	85.9

DS: desviación estándar.

%<RDA: porcentaje de mujeres con ingesta dietética diaria inferior a la recomendada.

Vit E: vitamina E; Vit A: vitamina A; Vit C: vitamina C.

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

HC: hidratos de carbono.

Fe: hierro; Zn: cinc.

Nótese que la ingesta calórica total diaria está por debajo de las recomendaciones en el 93.8% de las madres estudiadas. Por otra parte, la gran mayoría de esas mujeres (el 92.2%) supera los aportes diarios recomendados de proteínas e hidratos de carbono mientras que el 59.4% no llega a las necesidades de lípidos en su dieta. El 48.4% de las madres lactantes no cubrían la ingesta de grasa recomendada del 35% del total calórico. Además, el 40.6% de estas mujeres no cubrían las recomendaciones de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, pues no alcanzaban el porcentaje mínimo del 30% de la ingesta de grasa recomendada. En este mismo sentido, quedan en evidencia déficits notables en cuanto a los ingresos dietéticos de vitamina E (98.4% de las mujeres de nuestro estudio) y cinc (85.9%). Destaca asimismo que ninguna de ellas alcanzaba los mínimos requerimientos dietéticos diarios de hierro. Se constata que la ingesta diaria de vitamina A y vitamina C la realizan de forma adecuada el 79,7% de las madres lactantes del estudio.

5. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA DIETA MATERNA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS, AGPI Y VITAMINAS LIPOSOLUBLES PRESENTES EN LA LECHE DE MUJER.

En las tablas XXXVIV y XXXV quedan expuestas las correlaciones encontradas entre distintos componentes de la dieta (grasa total y distintos tipos de ácidos grasos, así como las vitaminas A y E,) con los pesticidas organoclorados analizados en la leche de las madres estudiadas. Podemos resaltar a algunos de éstos últimos que, por su gran número de correlaciones con los ácidos grasos de la dieta, destacan sobre los demás; tal es el caso de los endosulfanes (en concreto, *endosulfán lactona*) y *metoxicloro* (Figuras 13 y 14). Se hallaron correlaciones significativas entre los PO ya mencionados y la cantidad de grasa ingerida, los AGS y los AGM. Todas los coeficientes de correlación de Pearson tienen signo positivo, lo cual vendría a confirmar la relación directa entre los PO y las grasas ingeridas.

Al buscar las correlaciones entre los AGPI de la dieta y la presencia de pesticidas en la leche materna, se encontró para el *endosulfán beta* (Figura 15)

En cuanto a los derivados del DDT (Tabla XXXIV) no se ha encontrado correlación alguna que los vinculen con ningún componente de la dieta. Tampoco se demuestran correlaciones entre la vitamina E de la dieta los pesticidas organoclorados. En este mismo sentido, la cantidad de vitamina A de la dieta tampoco se correlaciona con ningún pesticida, excepto para el *endosulfán diol* (Figura 16).

Tabla XXXIV. Correlaciones y significaciones estadísticas encontradas entre las grasas de la dieta y los pesticidas analizados en leche materna.

		Grasa dieta	AGS dieta	AGM dieta	AGPI dieta
Ln Lindano	r	-0.164	-0.185	-0.158	-0.023
	p	0.251	0.193	0.268	0.873
Ln Aldrín	r	-0.030	-0.068	0.027	-0.116
	p	0.821	0.614	0.838	0.385
Ln Dieldrín	r	0.057	0.018	0.049	0.076
	p	0.701	0.903	0.740	0.609
Ln Mírex	r	0.031	0.036	-0.032	0.024
	p	0.885	0.866	0.883	0.913
Ln Clordano	r	-0.108	-0.206	-0.012	0.059
	p	0.462	0.156	0.936	0.688
Ln Endosulfán alfa	r	0.119	0.035	0.117	0.133
	p	0.478	0.835	0.484	0.427
Ln Endosulfán beta	r	0.539	0.377	0.406	0.538
	p	0.017*	0.112	0.085	0.018*
Ln Endosulfán eter	r	0.327	0.141	0.237	0.173
	p	0.009*	0.270	0.061	0.175
Ln Endosulfán lactona	r	0.296	0.273	0.326	0.189
	p	0.033*	0.050*	0.018*	0.180
Ln Endosulfan diol	r	0.156	0.067	0.173	0.197
	p	0.499	0.774	0.454	0.391
Ln Endosulfán sulfato	r	0.347	0.332	0.279	0.157
	p	0.224	0.246	0.334	0.593
Ln p,p'DDE	r	0.196	0.171	0.157	0.168
	p	0.121	0.178	0.216	0.185
Ln p,p'DDD	r	-0.119	-0.069	-0.176	-0.188
	p	0.502	0.700	0.319	0.286
Ln o,p'DDT	r	-0.006	0.026	-0.040	0.161
	p	0.979	0.915	0.870	0.509
Ln p,p'DDT	r	0.080	-0.043	0.098	0.152
	p	0.634	0.797	0.559	0.363
Ln Metoxicloro	r	0.655	0.533	0.532	0.375
	p	0.001*	0.011*	0.011*	0.085

r: coeficiente de correlación de Pearson; *significación $p < 0.05$.

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla XXXV. *Correlaciones y significaciones estadísticas encontradas entre las vitaminas A y E de la dieta y los pesticidas analizados en leche materna.*

		Vitamina E dieta	Vitamina A dieta
Ln Lindano	r	0.091	-0.116
	p	0.524	0.418
Ln Aldrín	r	0.226	-0.024
	p	0.088	0.860
Ln Dieldrín	r	0.176	0.252
	p	0.232	0.084
Ln Mírex	r	-0.050	-0.361
	p	0.815	0.083
Ln Clordano	r	0.204	0.101
	p	0.160	0.488
Ln Endosulfán alfa	r	0.070	0.152
	p	0.676	0.362
Ln Endosulfán beta	r	0.201	0.169
	p	0.409	0.488
Ln Endosulfán eter	r	0.034	-0.008
	p	0.793	0.949
Ln Endosulfán lactona	r	0.104	0.032
	p	0.463	0.822
Ln Endosulfan diol	r	0.374	0.674
	p	0.095	0.001*
Ln Endosulfán sulfato	r	0.291	0.412
	p	0.312	0.143
Ln p,p'DDE	r	0.050	-0.039
	p	0.693	0.762
Ln p,p'DDD	r	-0.302	-0.214
	p	0.082	0.224
Ln o,p'DDT	r	-0.036	-0.090
	p	0.883	0.715
Ln p,p'DDT	r	0.210	0.135
	p	0.206	0.418
Ln Metoxicloro	r	-0.299	0.020
	p	0.176	0.929

r: coeficiente de correlación de Pearson; *significación $p < 0.05$.

Figura 13

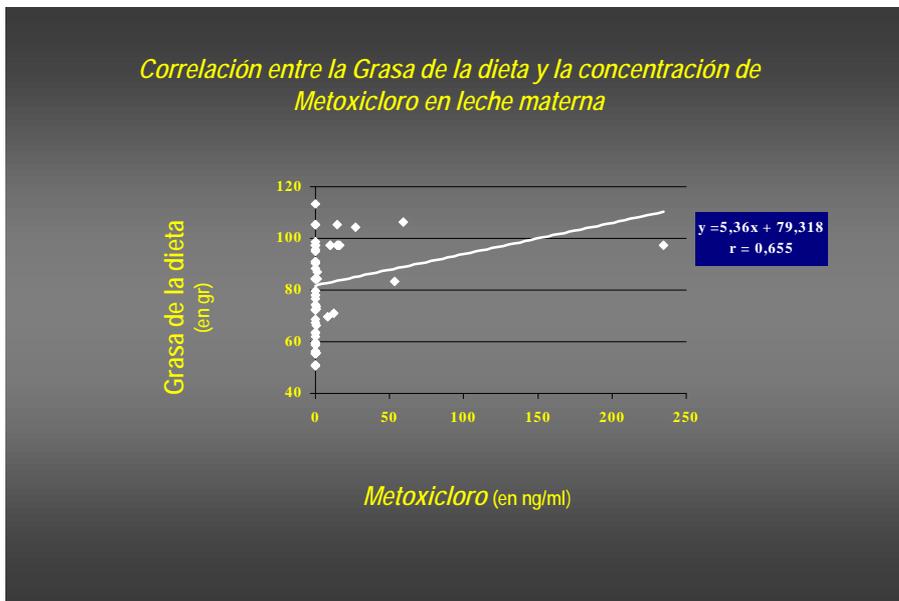


Figura 14

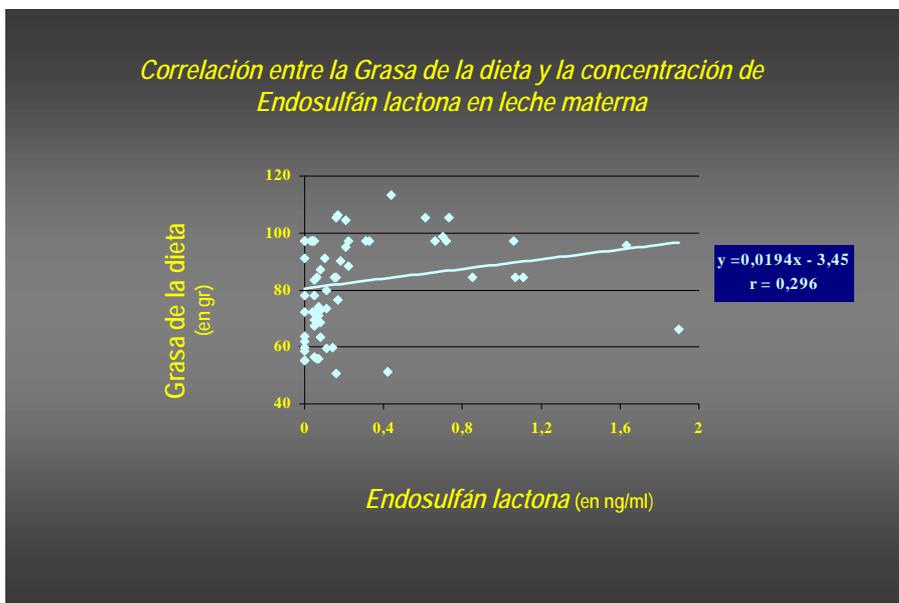


Figura 15

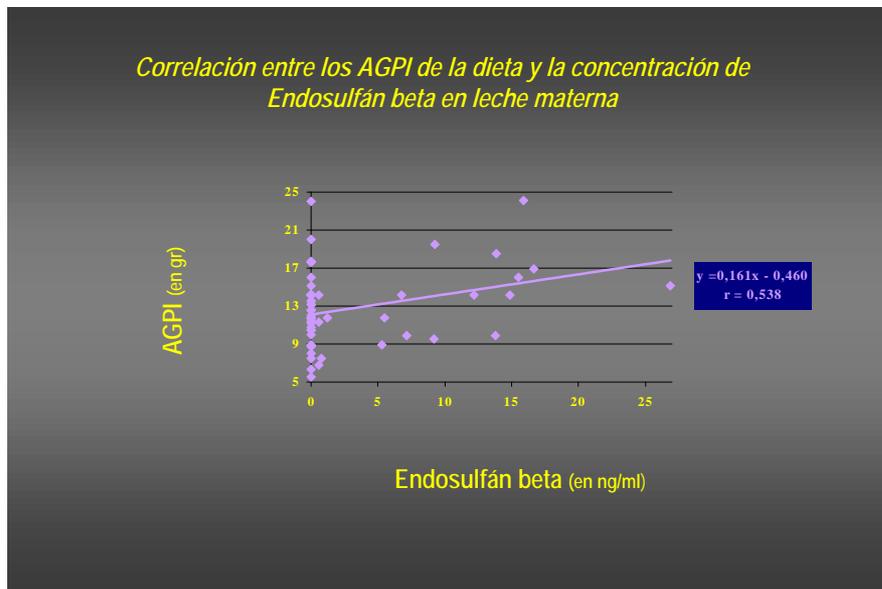
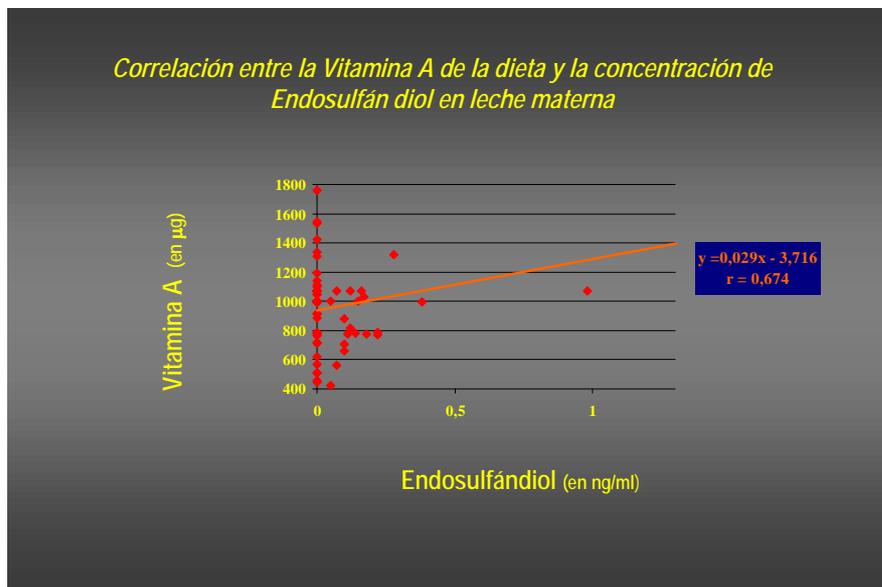


Figura 16



Discusión

DISCUSIÓN

1. RESPECTO A LA PRESENCIA DE PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN LECHE DE MADRES ESPAÑOLAS

En los últimos años, el hombre ha adquirido poder suficiente para alterar el mundo que lo rodea, produciéndose avances importantes en la investigación agrícola, por la utilización de plaguicidas, herbicidas y fertilizantes. Las consecuencias positivas son, la mejora en la calidad de los cultivos, la erradicación de plagas, con el aumento subsiguiente en la producción y el descenso de las pérdidas, etc; sin embargo, el efecto colateral más destacado del progreso científico a este nivel consiste en la “contaminación del medio ambiente”, la cual acontece a través de los vertidos a los ríos, mares, etc. Posteriormente, estos tóxicos son ingeridos por los animales más pequeños y pasarán a los de mayor tamaño a través de la depredación, siguiendo así la cadena trófica (Willett, 1993).

En la actualidad hay más control y restricción en el empleo de algunos pesticidas organoclorados en agricultura, lo cual debería traducirse en menores niveles de exposición que en el pasado. Quizás por la elevada persistencia de estas moléculas en la naturaleza, y el uso indiscriminado que se hace de ellas, la realidad es otra y el grado de impregnación en los seres vivos sigue siendo excesivo, sobre todo en países en vías de desarrollo, en los que las políticas de control no son tan exhaustivas o están ausentes. Así, se ha descubierto recientemente que sufren una mayor exposición al DDT y DDE las personas de países de África o de Latinoamérica que las de Europa o Estados Unidos (Jaga, 2003). En China, los últimos estudios ponen de manifiesto una elevada tasa de pesticidas organoclorados en la leche materna, tales como DDT, DDE, HCH y PCB en unas cantidades de 2 a 15 veces superiores que en países europeos y Canadá (Wong, 2002). Otro ejemplo positivo es Nueva Zelanda, que ha visto disminuídos los niveles de pesticidas en leche humana hasta en un 70% desde el año 1988 hasta el 1999 gracias al estrecho control de este tipo de sustancias (Bates, 2002).

En nuestro país, la preocupación institucional por los vertidos de contaminantes a ríos, mares o lagos se manifiesta en un nuevo Real Decreto elaborado recientemente por el Ministerio de Medio Ambiente. Éste viene a modificar el redactado en 1986, que se refería al Reglamento del Dominio Público Hidráulico y desarrolla distintos

aspectos de la Ley de Aguas del 2 de Agosto de 1985. Se identifican, ordenados por clases y grupos, todos los contaminantes de las cuencas hidráulicas españolas a causa de los vertidos procedentes de los distintos tipos de industrias. Quedan expuestos en este ámbito los compuestos organoclorados, así como aquellos con demostradas propiedades mutagénicas, cancerígenas, o que puedan alterar la función esteroidogénica, tiroidea o reproductiva en el medio acuático o a través del medio acuático (Real Decreto 606 de 23 de Mayo de 2003).

Tal y como se ha comentado ampliamente en la introducción de este trabajo, numerosos estudios se han centrado en conocer la influencia de los hábitos alimentarios de los diferentes grupos de poblaciones sobre la contaminación humana. En el caso de la mujer lactante, se han realizado estudios para conocer tanto los hábitos dietéticos como la influencia de la alimentación sobre la concentración final de nutrientes en la leche humana, el análisis de alimentos de consumo humano y su estudio como fuente de sustancias tóxicas que pudieran ser perjudiciales para el bebé lactante. Para la madre lactante, como para la mayoría de la población, las fuentes de contaminación fundamentales serían: el agua, los alimentos y la exposición laboral. Recientemente se ha demostrado que el origen de los pesticidas organoclorados presentes en la leche humana es la dieta materna (Solomón, 2002). De modo que la mujer lactante se expone a la ingestión continua de pequeñas dosis de tóxicos por su dieta diaria, sin olvidar las cantidades acumuladas de estas sustancias a lo largo de su vida. Aún se conoce poco acerca de los efectos que la ingesta continuada de alimentos contaminados puedan ocasionar en el organismo humano a corto, medio y largo plazo (National Research Council, 1993; Martínez, 1997). No obstante, recientemente se ha publicado que la determinación de pesticidas organoclorados puede ser útil como biomarcador de la carga estrogénica corporal (Botella, 2000).

Los pesticidas organoclorados y los metabolitos que se han seleccionado en el presente estudio fueron: lindano, aldrín, dieldrín, endrín, mirex, clordano, o,p´DDT, p,p´DDT, p,p´DDE, p,p´DDD, metoxicloro, endosulfán alfa, endosulfán beta, endosulfán éter, endosulfán lactona, endosulfán diol, y endosulfán sulfato, elegidos a causa de su efecto estrogénico, ya probado por ensayos *in vivo* o *in vitro* (Soto, 1995; Sohoni, 1998; Andersen, 1999; Botella Orts, 2000; Hu, 2002; Iscan, 2002).

En el presente trabajo de investigación, ha quedado una vez más en evidencia la presencia de xenobióticos en leche humana de mujeres españolas. Podemos afirmar que los niños españoles alimentados al pecho, al igual que en otros países, están expuestos a estas sustancias, y por tanto, a sus efectos potencialmente tóxicos. En las tablas IX, X y XI se describen las concentraciones mínimas, máximas y medias de los pesticidas organoclorados encontrados en las muestras de calostro, leche de transición y leche madura de las madres estudiadas. Como se puede observar, hay una gran dispersión en los valores obtenidos. Alguno de estos pesticidas se encontró en el 100% de las muestras analizadas tanto de calostro, transición y madura, caso del p,p'DDE.

Los resultados de los datos correspondientes al análisis de leche humana y su comparación con la leche de fórmula permite obtener una información importante respecto a la exposición del lactante a estos productos. De los valores recogidos en las tablas de resultados y considerando cada una de las moléculas de pesticidas en todos los medios analizados se llega al siguiente comentario:

La frecuencia media de aparición de los distintos pesticidas en medios biológicos es muy variable. En las muestras de leche humana analizadas, el *lindano* se detecta en más del 67% de las muestras, mientras que el *aldrín y dieldrín* se han encontrado en la leche humana con una frecuencia superior al 80% y al 62% respectivamente. Todos ellos mantienen un nivel estable en cada una de las etapas de la lactancia, tanto en su concentración como en su frecuencia de aparición (Tablas IX, X, XI, XIX y XX).

El *mírex* contamina a un mayor número de muestras de leche en la etapa de transición (54,2%) con respecto a las etapas anterior y posterior (24% y 33,3% respectivamente); su concentración no se modifica sustancialmente en todo el período estudiado (Tablas IX, X, XI, XIX y XX).

Respecto al *clordano* se ha encontrado con muy alta frecuencia en calostro y transición (84% y 79,2% respectivamente) mientras que en leche madura se aprecia un moderado descenso, aunque todavía en un porcentaje considerable (60%); su nivel no se vio modificado con el paso del tiempo.

También debemos atender al *endosulfán*, pesticida que está formado por una mezcla de isómeros y metabolitos cuya proporción varía dependiendo del medio biológico que se analice. El *endosulfán* α es más persistente que el *endosulfán* β , de modo que se estima una permanencia media del primero de hasta 800 días frente a 60 días del isómero β , posiblemente debido a una degradación aeróbica de este último (Doong, 1999). El metabolismo en seres superiores supone su transformación hacia las moléculas más hidrosolubles. Pero a pesar de todo esto y debido a su alta lipofilidad, todas sus formas (*endosulfán* éter y *endosulfán* diol, ambos en equilibrio, *endosulfán* sulfato, metabolito principal, *endosulfán* lactona) se almacenan en el tejido adiposo y circulan en suero y leche humana. Nuestros datos demuestran variaciones en la aparición de todos los metabolitos. Se ha comprobado que el *endosulfán* éter se encuentra contaminando a más del 90% de las muestras recogidas en nuestro estudio (en concreto, el 98,4%); se evidencia su aparición en el 100% de las muestras de calostro y leche madura así como en el 95.8% de las de transición. Su concentración media en calostro fue de $1,44 \pm 4,14$ ng/mL, nivel que se mantuvo estable hasta el final del período de lactancia. Respecto al *endosulfán* lactona, es el único de estos metabolitos cuya concentración aumenta significativamente desde la leche calostrada ($6.33 \cdot 10^{-2} \pm 6.13 \cdot 10^{-2}$ ng/mL) hasta un nivel medio en leche madura de 0.61 ± 0.60 ng/mL (Tabla XIX y XXI). El porcentaje de muestras contaminadas por este pesticida también se va incrementando conforme avanza la lactancia: calostro 68%, transición 87.5% y madura 93.3% (Tabla IX, X y XI).

Hasta ahora se ha relatado cómo la concentración de estos metabolitos presentes en leche cambia con el paso del tiempo, debido posiblemente al distinto contenido en grasa que poseen las tres formas de leche analizadas, tal y como sugieren Dorea et al. en sus trabajos (Dorea, 2000). Esto influye especialmente al *endosulfán* sulfato por ser el más hidrosoluble de todos los metabolitos. Así hemos demostrado que contamina al 16% de muestras calostrales, al 25% de las de transición y al 26.7% de las de madura. Respecto a los metabolitos precursores, la mayor frecuencia es para el isómero α (59.4%). En las muestras analizadas de calostro, 24% de β y 64% de α ; para leche de transición 33.3% de β y 58.33% de α , y madura de β un 33.3% y de α un 53.3%.

El *p,p* DDE se encuentra en el 100% de las muestras de leche humana con un valor medio en leche calostrada de 33.41 ± 38.34 , en leche de transición de 36.23 ± 27.97 y en leche madura de 32.35 ± 26.07 (Tabla IX, X y XI). Sus niveles no muestran tendencia significativa al descenso

a lo largo de la lactancia. Esta constancia del metabolito p,p'DDE y sus niveles de concentración confirman los datos presentados por otros autores (Izquierdo, 1996; Krauthacker, 1998; Dorgan, 1999, Cajka, 2003), y la posibilidad de contaminación del lactante. La ruta metabólica que transforma, en el ser humano, los pesticidas del grupo de los DDT tiene como último metabolito al p,p'DDE, de ahí su presencia en todas las muestras de leche analizadas.

No se ha demostrado en el presente estudio una contaminación tan alta como el anterior para el *p,p'DDD*, aunque sigue siendo considerable, dado que afecta al 60% de muestras de calostro, 54,2% de transición y 40% de madura.

Respecto al *o,p'DDT* y *p,p'DDT*, su presencia en leche materna ha sido confirmada, tal como se aprecia en las tablas IX, X y XI. Sus concentraciones se mantienen estables a lo largo de la lactancia (Tabla XIX y XXII). La frecuencia se mantiene con el tiempo, así el *o,p'DDT* se presenta en el 20% de calostro, el 41.7% de leche de transición y 26.7% de leche madura; en el caso del *p,p'DDT* del 48% en calostro, se produce un incremento en la presencia de este pesticida en leche de transición y madura, alcanzando porcentajes del 70,8% y del 60%, respectivamente, del total de las muestras. Según diversos investigadores es interesante establecer la relación entre las concentraciones de DDT y su metabolito DDE, de tal modo que valores bajos en el cociente DDT/DDE indican una exposición crónica y antigua al pesticida (Ahlborg, 1995; Botella, 2000). Los datos que arroja este trabajo de investigación corroboran que muchas de las madres lactantes del sur peninsular español sufren una contaminación crónica al DDT, ya que, calculando el citado cociente para las muestras analizadas, se obtiene una media de 0,106 (mínimo=0; máximo=1,10; desviación estándar= 0,191).

El *metoxicloro* aparece en leche con escasa frecuencia, sobre todo en calostro, donde apenas contamina al 12% de las muestras estudiadas. Su concentración tampoco sufrió modificaciones significativas a lo largo del tiempo. Se trata de un PO similar en su estructura química al DDT, diferenciándose de éste en un grupo *cloro* que es sustituido por un grupo *metoxi*, convirtiéndose así en una sustancia más metabolizable por el organismo, aunque a la vez más estrogénica.

Si analizamos las correlaciones existentes para los distintos PO analizados en las muestras de leche materna entre sí, encontramos hallazgos interesantes. Las asociaciones encontradas se deben a varios motivos: en unos casos, unos PO son productos metabólicos de otros (v.g. aldrín con dieldrín; endosulfán alfa y beta con sus metabolitos); en otras ocasiones, esos PO correlacionados se encuentran en el mercado formando mezclas de varios de ellos que se venden conjuntamente (v.g. DDT y DDD). El clordano, sin embargo, tiene muchos isómeros y por tanto su presencia está garantizada en las muestras así como su relación con otros PO de distintos tipos. En cuanto al DDE es, en los mamíferos superiores, el producto final del metabolismo de los PO del grupo del DDT, motivo por el que es el más frecuente en todas las muestras analizadas, indicando así mismo exposición crónica al DDT (Tabla XXIX).

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones realizadas por los científicos se centran en el análisis de un número bastante reducido de pesticidas en leche, suero y/o tejido adiposo. Generalmente se determinan DDT y sus metabolitos, junto con algún PCB, y en algunas ocasiones se han reseñado lindano, dieldrín o endosulfán. Recientes estudios revelan la movilidad de estos pesticidas organoclorados desde las reservas de grasa del organismo al torrente circulatorio, en situaciones tales como las pérdidas de peso (Pelletier, 2002). Se sabe que la presencia de pesticidas organoclorados en la leche materna depende de muchos factores, entre los que claramente se relacionan la edad, la paridad, la duración de la lactancia previa, la movilización de los depósitos maternos endógenos y la época de la lactancia (Harris, 2001).

Los valores obtenidos en este trabajo experimental se encuentran en el mismo rango de concentraciones que el resto de los autores indistintamente de cual sea el pesticida analizado. Los resultados obtenidos confirman la alta exposición de la población estudiada a sustancias químicas medioambientales con reconocido efecto estrogénico (Bates, 2003; Burke, 2003; Polder, 2003).

El hecho, ampliamente demostrado a lo largo de este trabajo de investigación, de que los distintos PO apenas sufren modificaciones en cuanto a sus concentraciones conforme avanza la lactancia (a excepción de endosulfán lactona, que aumenta), nos lleva a la conclusión inequívoca de la *continuada* exposición a la que son sometidos los bebés lactados al pecho en nuestra área geográfica.

El concepto de tóxico equivalente (TEQ) facilita la valoración del riesgo que una muestra contaminada puede suponer, tanto para humanos como para animales, y ayuda al control legislativo de las distintas sustancias que se utilizan. Las moléculas consideradas habitualmente en la bibliografía, por su contribución a este parámetro, son los PCBs pues, en general, se encuentran junto a PCDD/Fs en la mayoría de las matrices y producen efectos tóxicos similares. Se olvidan de los pesticidas organoclorados que se encuentran en igual concentración o superior a los PCBs en los mismos medios y que se diferencian casi exclusivamente de ellos por su utilidad al ser la herramienta de lucha contra las plagas. Esto lleva a suponer una cierta inercia de la comunidad científica a no considerarlos en el mismo rango de riesgo que a los PCBs (moléculas sintetizadas voluntariamente y sin aplicación tecnológica actual) o a las Dioxinas (moléculas sintetizadas de forma involuntaria en procesos industriales). Ante la impregnación del ser vivo y su riesgo para la salud, no deben hacerse estas distinciones. Quizás esta sea la causa de no disponer más que de un parámetro TEQ establecido para PCDD/Fs y PCBs y no para moléculas organocloradas que presentan valores de toxicidad aguda menores que las dioxinas. Como consecuencia del vacío que existe para establecer un nivel máximo de exposición a pesticidas organoclorados, habría que seguir el mismo método para establecer una relación entre lo marcado en TEQ y los valores de pesticidas organoclorados determinados en los distintos medios biológicos que se analicen en el ser humano.

Teniendo en cuenta lo anterior, no sólo han quedado expuestas las concentraciones de los pesticidas en las muestras analizadas, sino que éstas han sido percentiladas; se trata de conocer, no sólo hasta qué punto un determinado número de muestras están contaminadas sino, sobre todo, a partir de qué nivel la contaminación por un pesticida resulta peligrosamente elevada (Tabla XII). Tal y como se refleja en las tablas correspondientes, se han encontrado niveles muy dispares, que van desde el límite de detección (L.D.) hasta concentraciones 200 veces superiores.

Desde el año 1985, la PAN (Pesticides Action Network) trabaja para evitar el uso indiscriminado de pesticidas, a través de sus cinco oficinas regionales: Asia, América del Sur, América del Norte y Europa. Junto con las OMS, ha sido una de las organizaciones que más ha apoyado la denominada “Campaña contra la Docena Sucia”, concebida como un instrumento de educación popular sobre los riesgos del uso de

plaguicidas. Esta “docena sucia” la componen las siguientes moléculas: aldrín, PCB, clordano, DDT, dieldrin, dioxinas, endrina, furanos, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y toxafeno.

La mencionada campaña tiene como objetivos hacer primar la salud humana y la calidad medioambiental frente al uso y comercialización de los pesticidas. Pretende asimismo acabar con el uso de estos doce productos en los países donde no existan condiciones adecuadas de protección al ser humano. Para ello se considera básica la información técnica y el apoyo a la investigación, con el fin de encontrar otros métodos de control de plagas menos nocivos.

En febrero de 1997, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente pidió que se convocara un Comité Intergubernamental de Negociación con el mandato de elaborar un instrumento internacional jurídicamente vinculante para la aplicación de medidas internacionales respecto de ciertos Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP o POP: *Pollution Organics Persistants*). Los primeros COP en eliminarse eran los conocidos como la “docena sucia”. Tras cinco reuniones, se logró acordar un texto de Convenio que se firmó el 23 de Mayo de 2001 en Estocolmo. Este Convenio insta a las multinacionales químicas a adoptar el llamado *principio de precaución*, para que adopten medidas preventivas hacia la población sin que exista una completa certeza científica acerca de la toxicidad de una sustancia. Se derivó asimismo el compromiso de ayudar a los países en desarrollo a financiar los costes de su cumplimiento. Se deja la puerta abierta para la adición de nuevos contaminantes al Convenio, que cumplan requisitos indispensables como *persistencia, bioacumulación, potencial de transporte a larga distancia y efectos adversos demostrados*.

En 1990 la OMS propuso una ingesta diaria tolerable (TDI) de 10 pg TCDD/Kg/día. Pero si consideramos que la vida media de eliminación PCDD/Fs es de 7,5 años y que la fracción absorbida de la dosis ingerida para los humanos equivale a 0,5 se estima que el ser humano ingiere entre 14-37 pg TEQ/Kg/día. Así que aplicando un factor de incertidumbre de 10 se establece la TDI. En revisiones posteriores y ante nuevos datos toxicológicos la OMS ha establecido un margen de TDI entre 1-4 pg TEQ/Kg/día (OMS, 1999). Se constata que los niños pequeños pueden sufrir una exposición mayor a PCDD/Fs y compuestos similares debido a la lactancia materna. *La ingesta diaria por Kg de peso es 50 veces mayor en el lactante que en el adulto*. Los seis primeros meses de lactancia materna supone un acúmulo de PCDD/Fs y PCBs

equivalente a 25 años de vida del individuo expuesto a una alimentación con niveles de contaminantes organoclorados dentro de los límites actualmente permitidos. Por tanto, queda claro que, el recién nacido y el niño lactado al pecho *heredan una carga de moléculas organocloradas que se transmitirá de generación en generación*. El efecto tóxico potencial provocado por el largo período de latencia y la naturaleza no claramente establecida de los procesos patológicos es objeto de estudio por numerosos investigadores. Se ha demostrado que las concentraciones de pesticidas organoclorados, encontrados en la leche de madres lactantes de todo el mundo, siguen superando el límite TEQ establecido por la OMS (Craan, 1998; Nunes, 1998; Torres-Arreola, 1999; Noren, 2000).

Si a partir de los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación se realiza una estimación de la ingesta media de pesticidas por día, se superan los valores establecidos en el TEQ por la OMS. Este hecho lo denuncian numerosos autores en sus estudios (Vartiainen, 1998; Hooper, 1998). De aquí se desprende la necesidad de establecer un TEQ de acuerdo con el producto al que está realmente expuesto el individuo. Son preocupantes los probables efectos deletéreos a largo plazo, muchos de los cuales quedan aún por conocer; y sobre todo dado que no se han establecido niveles tóxico-equivalentes para la mayoría de estas sustancias con alta capacidad de disrupción endocrina.

1.1. Relación de la dieta y la presencia de PO en leche materna.

La mayoría de las moléculas organocloradas de alta persistencia y contaminantes medio ambientales se pueden encontrar en la leche de los mamíferos como consecuencia de la cadena alimentaria, es el caso del DDT, que se ha hallado en la leche materna de mujeres procedentes de áreas en las que se ha utilizado sin control en la agricultura, mientras que en mujeres de los países industrializados el contenido es menor (Olzyna-Marzys, 1978). Los pesticidas organoclorados con los que se ha encontrado relación en nuestro trabajo son los que realmente se podría esperar por su ubicuidad.

Los alimentos estimados como fuente de moléculas organocloradas han sido los alimentos ricos en grasa y los vegetales, primer alimento en contacto directo con los pesticidas organoclorados.

En el momento actual se están utilizando, para los cultivos tempranos, varias fórmulas comerciales en las que se encuentran como principio activo moléculas organocloradas tales como endosulfán, lindano, vinclozolina, etc. (Stresser, 1998). En la bibliografía se ha encontrado con alta frecuencia la relación entre pesticidas contenidos en leche materna y consumo de pescado por las madres (Vartiainen, 1998; Nakagawa, 1999).

En la actualidad hay más control y restricción en el empleo de algunos pesticidas organoclorados en agricultura. Esto debería traducirse en menores niveles de exposición que en el pasado. Sin embargo, quizás por la elevada persistencia de estas moléculas y el uso indiscriminado que se hace de ellas, el grado de impregnación en los seres vivos es excesivo, hasta el punto que la transmisión de estos productos en la cadena trófica es un riesgo tal como se muestra en estos resultados por la exposición del lactante a través de la leche. Además, cabe suponer que la movilización de los pesticidas acumulados en el tejido adiposo de la madre pueden llegar al feto a través del torrente sanguíneo. Por tanto, ante estos hechos, el principio de precaución debe de ser tenido en cuenta, ante el uso y exposición a moléculas organocloradas, persistentes y muchas de ellas con efecto disruptor endocrino.

La FDA (FDA, 1994) y otros organismos internacionales permiten la presencia de cantidades mínimas de pesticidas organoclorados en los alimentos, pero debido al uso abusivo de los plaguicidas se pueden encontrar cantidades significativas de residuos de pesticidas en los productos alimenticios. En función del alimento y el tipo de molécula de que se trate, se han encontrado concentraciones dispares (OMS, 1991; Dillon, 1995; Gunderson, 1995a; Li, 1998).

La gran liposolubilidad de los pesticidas organoclorados y su metabolismo asociado a los lípidos integran una hipótesis que parece verse refrendada en este trabajo de investigación. Se han podido constatar correlaciones significativas y directas entre la cantidad de grasa contenida en la dieta (y algunos de los ácidos grasos que las componen) y la presencia de estos xenobióticos en la leche materna. Es llamativo que los AGPI de la dieta no se correlacionan con ningún PO, excepto con el endosulfán beta ($r:0.54$, $p=0.018$), lo cual podría significar que las otras correlaciones halladas en leche entre ambas moléculas podrían obedecer a su metabolismo conjunto dentro del organismo humano. El metoxicloro y el endosulfán lactona son los PO más frecuentemente vinculados con las grasas de la dieta, presentando

ambos idénticas correlaciones (Tabla XXXIV). Estos datos corroboran los publicados recientemente por Solomón et al. (Solomón, 2002).

El metoxicloro es un pesticida con actividad estrogénica reconocida, que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza por su extenso uso y, consiguientemente, contamina los alimentos. Por tanto, no es de extrañar que aparezca excretado en la leche materna, que será ingerida posteriormente por el niño lactante (Hu, 2003; Ueno, 2003; Yuan, 2003).

2. RESPECTO AL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN LAS MUESTRAS DE LECHE ESTUDIADAS PROCEDENTES DE MADRES ESPAÑOLAS.

En las tablas XIII, XIV y XV se recogen los valores correspondientes al mínimo, máximo y media de las concentraciones de AGPI en los análisis de leche. Tras la medición de las concentraciones de los AGPI de cadena larga, en los distintos momentos de la lactancia, se ha confirmado en el presente estudio que el ácido linolénico aumenta en la leche de transición y madura respecto al calostro. El ácido linoleico no experimenta una variación significativa en los tres períodos estudiados. Por el contrario y, al igual que han comprobado otros autores, las concentraciones en leche materna de los AGPI de larga cadena (AA y DHA) disminuyen conforme avanza la lactancia, observándose que el calostro contiene una alta concentración de éstos (Figura 4). Sin embargo, la cantidad total de AGPI-CL se mantiene estable (Tablas XXIII y XXIV) (Luukkainen, 1994; Chen, 1997).

En las figuras 3 y 4 se muestra el descenso, con el avance de la lactancia, del cociente linoleico/linolénico, debido a la citada elevación de éste último. En cuanto a este cociente, se estableció que sus valores deseables en las fórmulas infantiles estuvieran entre el rango 5/1 y 15/1 (ESPGHAN, Committee In Nutrition, 1991). La relación entre ambos ácidos grasos esenciales tiene una gran importancia debido a que ambos compiten por el mismo enzima para la síntesis de los AGPI-CL (Hernell, 1990). Sin embargo, estudios posteriores, realizados tanto en ratas como en recién nacidos a término, han demostrado tras la administración de altos niveles de AL no se frenaba la conversión de ALA en DHA (Sheaff, 1995; Sauerwald, 1996).

Se ha demostrado que los índices AL/ALA y AA/DHA son marcadores del estado nutricional de AGPI-CL de la serie n-3. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran AL/ALA y AA/DHA: calostro: 16.38/0.36 (46.15) y 0.69/0.49 (1.43); leche de transición: 15.74/0.65 (27.14) y 0.65/0.50 (1.42); y, leche madura: 17.55/0.82 (25.79) y 0.54/0.38 (1.55), respectivamente (Tablas XIII, XIV, XV y XXIII). Teniendo en cuenta que estos cocientes se consideran marcadores del estado nutricional en n-6 y n-3 y del consumo de estos ácidos grasos a lo largo del embarazo (Matorras, 1998; Jensen, 2000), cuanto más bajos son estos índices mejor estado nutricional en la serie n-3 tendría la mujer lactante. Estos resultados muestran como las madres españolas presentan un índice AL/ALA muy por encima del 15:1, lo que sugiere un cambio en la ingesta de grasa con mayor presencia de ácido linoleico en la dieta en detrimento del ácido linolénico, tal y como viene ocurriendo y se ha demostrado en los últimos años en otros países europeos.

Estos resultados concuerdan con la idea de que conforme avanza la edad del recién nacido se produce una maduración de los sistemas enzimáticos de las Δ -desaturasas, por lo que progresivamente el bebé es capaz de sintetizar DHA y AA a partir de los ácidos grasos poliinsaturados precursores; este hecho lo prevé la naturaleza incrementando de forma progresiva el aporte de linoleico y linolénico (índice AL/ALA), y disminuyendo el aporte de AA y DHA.

Ya han sido descritas las funciones atribuidas al DHA, tanto en el desarrollo de la memoria, el aprendizaje y la visión, por lo que actualmente se tiende a suplementar las fórmulas infantiles con este AGPI. En los ensayos clínicos sobre prematuros, la suplementación con DHA sí mejora la función retiniana (medida mediante electroretinografía y potenciales evocados visuales) y la agudeza visual (Uauy, 1990), siendo más controvertida esta suplementación en recién nacidos a término, debido a la diversidad de hallazgos encontrados (Makrides, 1993; Jorgensen, 1996; Neuringer, 2000).

Debe resaltarse la importancia del equilibrio entre AGPI de la serie n-3 y n-6, entre otros motivos, porque los primeros poseen demostradas acciones antiinflamatorias y los últimos participan en fenómenos reguladores de la respuesta atópica (Chan, 1993; Ohtsuda, 1997; Alexander, 1998; Calder, 1998). Un correcto balance AA y DHA en la ingesta parece ser pues un factor crítico para un desarrollo psicomotor global adecuado en los lactantes. Sin embargo, los factores

ambientales diferentes a la nutrición también influyen de forma relevante en el grado de desarrollo cerebral y por tanto, la posibilidad de que estos factores sean capaces de compensar los efectos atribuibles a una deficiencia en AGPI-CL, puede ser una hipótesis a considerar (García-Fuentes, 2002).

Estudios realizados en ratas han determinado la importancia de los lípidos de la dieta y, más concretamente de los ácidos grasos poliinsaturados, en la adquisición de funciones como el aprendizaje o la memoria (Cadwell, 1996; Greenwood, 1990) Así, cuando los roedores ingerían una dieta carente de AGPI de la serie n-3, se producían trastornos en su capacidad de aprendizaje, que se revertían con el aporte de un aceite rico en esos ácidos grasos (Kameyama, 1996; Okaniwa, 1996; Redondo, 2002). Las tablas XIII, XIV y XV muestran de forma ostensible que el AGPI más abundante en todas las épocas de la lactancia es el ácido linoleico, lo cual está en consonancia con otros estudios previos realizados en Europa (Genzel-Boroviczeny, 1997; Serra, 1997). La mayoría de los análisis realizados en leche materna concluyen que los AGPI de larga cadena más frecuentes en este medio son, por este orden, el AA y el DHA (con un nivel que oscila entre un 0.4-0.6% y un 0.2-0.4% del total de grasa, respectivamente, según datos de Koletzko et al.) (Koletzko, 1992). En nuestro estudio, los datos acerca de estos ácidos grasos son coincidentes; a saber: AA entre 0.54 y 0.69% y DHA entre 0.38 y 0.50% (Tabla XXIII); incluso el % de DHA resultó más alto, lo que corrobora los datos aportados en otros estudios (Jensen, 1992; Ballabriga, 2001) referentes al mejor estado nutricional en DHA de las madres lactantes españolas y de países consumidores de dieta mediterránea, respecto a otros países del norte de Europa con una ingesta dietética inferior de AGPI-CL de la serie n-3.

2.1. Dieta y AGPI en leche materna

No es de extrañar que un mayor aporte de grasas en la dieta se correlacione directamente con un mayor aporte de los tres tipos de ácidos grasos: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, siendo éstos últimos los más relevantes por su ulterior excreción a la leche materna (Tabla XXXI).

El contenido de grasa existente en la leche materna es muy variable y depende de la influencia de muchos factores, entre los que destacan la dieta, la duración de la lactancia, la paridad y la etapa de la lactancia de que se trate. De todos ellos, el que mejor explica las

diferencias geográficas es la ingesta dietética materna (Jensen, 1992; Rodríguez, 1999).

Durante la etapa neonatal, el recién nacido tiene una alta demanda tanto de nutrientes esenciales como de un aporte energético adecuado. En la leche humana, y en la mayoría de las leches de fórmula, el 50% de las calorías son suministradas por la grasa, y más del 98% de ésta, en forma de triglicéridos, que contienen grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas (Small, 1991; Giovannini, 1995; Manson, 1997). Es necesario que cada tipo de ácido graso sea aportado en unas cantidades compensadas, con el fin de obtener una óptima maduración y desarrollo del sistema nervioso (Agostoni, 1995; Makrides, 1995) y una adecuada producción de eicosaenoides (Bjerve, 1987; Sellmayer, 1999; Uauy, 2000).

De todos los ácidos grasos presentes en la leche humana, los AGPI-CL se ha demostrado que son condicionalmente esenciales en el periodo neonatal, acumulándose en el tejido cerebral hasta dos años después del nacimiento (Martínez, 1992). Los niveles de DHA en leche materna, por ejemplo, son muy altos en mujeres con una alta ingesta de productos marinos (Koletzko, 1992; Chulei, 1995; Innis, 1998) o huevos enriquecidos con AGPI-CL de la serie n-3 (Cherian, 1996). Por el contrario, la dieta no parece influir notablemente sobre las concentraciones de AA en la leche materna (Finley, 1985; Koletzko, 1992; Sanders, 1992; Hamosh, 1998; Villanpando, 1998). Los análisis realizados en mujeres egipcias, malasias y chinas indican un aumento del AA en leche materna frente a las de países occidentales (Chen, 1997), debido probablemente a una mayor ingesta de ácidos grasos *trans* de éstas últimas. Estos ácidos grasos *trans* actúan inhibiendo la desaturación y elongación de los AGPI.

De los estudios comentados hasta ahora se deriva la necesidad de un aporte equilibrado de los AGPI-CL de la serie n-3 y n-6, para que su presencia en la leche materna satisfaga las altas necesidades del recién nacido alimentado al pecho en los primeros meses de vida.

Estudios recientes sostienen que el estilo de vida de los países occidentales, con un alto consumo de AGPI, tiene un papel preponderante en el aumento de la incidencia de sensibilización atópica (Simopoulos, 1991; Duchon, 1998). Las dietas occidentales contienen entre 10 y 25 veces más AL que ALA, que posteriormente originarán los AGPI-CL de sus respectivas series. Se ha demostrado en los últimos

años que los eicosaenoides derivados del AA (serie n-6) participan en fenómenos inflamatorios responsables de la respuesta atópica (Chan, 1993; Ohtsuda, 1997). En contraposición, aquellos derivados de la serie n-3 poseen demostradas acciones antiinflamatorias (Alexander, 1998; Calder, 1998).

Los recién nacidos alimentados exclusivamente al pecho se benefician de una determinada protección frente a la enfermedad atópica (Oddy, 1999). Sin embargo, esta protección es muy variable y depende, a su vez, de la ingesta dietética materna. Algunos autores estiman que una elevada ingesta materna de AGPI n-6 o reducida en n-3 podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de atopía (Hodge, 2001; Kankaanpää, 2001). Otros estudios también recientes no apoyan la hipótesis anterior, considerándola algo todavía en controversia (Koletzko, 2000; Duchon, 2001). En el presente estudio más de un 40% de las madres lactantes presentaron una ingesta de grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas por debajo de la RDA de 2002. Según se muestra en la tabla correspondiente, no se han encontrado correlaciones entre la grasa total, los AGS, AGM o AGPI de la dieta y los AGPI de la leche materna, indicando así una movilización de éstos desde las reservas maternas, ya que se trata de mujeres bien nutridas (Tabla XXXI).

3. RESPECTO A LA PRESENCIA DE LAS VITAMINAS A Y E EN LECHE DE MADRES ESPAÑOLAS

La presencia de las vitaminas liposolubles tanto en suero como en la leche materna presenta variaciones geográficas importantes, ya que la dieta juega un papel primordial (Canfield, 1995; Lammi-Keefe, 1995; Canfield, 1997; Olafsdottir, 2001; Lietz, 2001). En este sentido, la concentración de vitamina E en leche humana, también depende de los hábitos tóxicos maternos, puesto que está demostrado que descende en las mujeres lactantes fumadoras (Kelly, 1990; Ortega, 1998b). En cuanto a la excreción de vitamina A en leche materna, se requiere la integridad del funcionamiento del enzima ARAT, que esterifica en retinol, que posteriormente aparecerá en la leche.

El contenido en vitaminas en leche materna debe adecuarse a los requerimientos del niño lactante y sus valores dependen del estado de nutrición y el aporte exógeno maternos (Picciano, 1995). Atendiendo a las vitaminas liposolubles A y E, sus niveles han sido determinados en numerosos estudios, ofreciendo un rango entre cuyos valores se

encuentra la normalidad. Así, la concentración de vitamina E puede variar alrededor de 0.18 mg/dL (Kobayashi, 1975; Lammi-Keefe, 1995); la vitamina A, por su parte oscila entre 0.015 y 0.065 mg/dL (Ajans, 1965; Dostalova, 1984; Chappell, 1985; Hussein, 1987). Las tablas XXV y XXVI muestran el descenso, estadísticamente significativo, de las concentraciones de las vitaminas A y E desde la leche calostrala a la madura, datos que coinciden con los aparecidos recientemente en la literatura científica (Thomas, 1981; Anderson, 1985; Fomon, 1995; Pajaron, 1995; Barbas, 1998). Este descenso constituye una pérdida de la capacidad antioxidante frente a los xenobióticos presentes en ella y que serán ingeridos por el recién nacido lactado al pecho. Thomas et al. publica unos valores para la vitamina A en leche calostrala de 2014 $\mu\text{g/L}$; en leche de transición, de 1107 $\mu\text{g/L}$ y, en leche madura, de 773 $\mu\text{g/L}$, cifras que concuerdan con las obtenidas en el presente trabajo (Thomas, 1981).

El descenso de la vitamina E conforme avanza la lactancia es muy significativo, llegando a ser, en este estudio 3,6 veces inferior en la leche madura frente al calostro. Estos datos coinciden con los publicados por Anderson et al. que observan unas cifras de vitamina E que van desde 1.5 ± 0.9 mg/dL en calostro, 0.46 ± 0.19 mg/dL en leche de transición, hasta 0.33 ± 0.15 mg/dL en leche madura (Anderson, 1985).

Las fórmulas lácteas artificiales intentan asemejarse en lo posible a la composición de la leche materna y las vitaminas A y E no son una excepción. Así pues, el contenido de vitamina A en las fórmulas para prematuros debe estar comprendido entre 90 y 150 $\mu\text{g}/100$ Kcal. Es conocido que para el recién nacido de bajo peso afecto de broncodisplasia es necesario suplementar su alimentación con esta vitamina, ya que participa en la regeneración de los tejidos epiteliales pulmonares (American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition, 1985). Para la vitamina E, debe cumplirse que el cociente entre ésta y los AGPI sea mayor de 0.9 mg/g (o también, 0.5 mg/g de AL y 0.75 mg/g de ALA) (ESPGHAN Committee on Nutrition, 1998).

3.1. Dieta y vitaminas liposolubles en leche materna

El contenido de vitaminas hidrosolubles en leche materna está vinculado fuertemente al estado nutricional y a la dieta materna, aunque no siempre ocurre lo mismo con las vitaminas liposolubles. En este trabajo de investigación, no se ha encontrado relación significativa entre

la ingesta de vitamina A y E y su presencia en las muestras de leche materna (Tabla XXXI). A pesar de haberse demostrado fehacientemente la carencia dietética de vitamina E, puede observarse que la cantidad de ésta existente en las muestras de leche materna recogidas alcanza valores similares a los descritos por otros autores (Kobayashi, 1975; Lammi-Keefe, 1995) (Tablas XVI, XVII y XVIII). Los valores medios sobrepasan la cifra de 1 mg/dl en leche de calostro, aunque descienden significativamente hasta la leche madura. Esto podría significar que, mientras el recién nacido alimentado al pecho recibe un aporte correcto de vitamina E, la madre estaría padeciendo ese grave déficit, derivándose así una menor protección antioxidante frente a los pesticidas que ingiere.

En cuanto a la vitamina A, sus niveles en la leche materna se ven influenciados claramente por la dieta, como indican otros estudios realizados en nuestro país (Martínez, 1997). En caso de que las mujeres no ingieran la cantidad suficiente de vitamina A durante la lactancia, puede suplementarse su dieta, beneficiándose tanto la madre como el niño lactante durante varios meses (Underwood, 1994; Canfield, 1998). En el presente trabajo de investigación, se observa que la concentración de vitamina A en leche materna está directamente relacionada con la de vitamina E y viceversa, tal y como se muestra en la Figura 12. En la dieta materna, también aparecen correlacionadas estas vitaminas, lo cual es lógico, debido a su liposolubilidad, de tal forma que una mayor ingesta de la primera se acompaña obligadamente de unos mayores ingresos de la segunda (Tabla XXXI). Los valores medios encontrados en leche materna son los adecuados, seguramente debido al adecuado aporte exógeno de vitamina A través de la dieta en la mayoría de las mujeres estudiadas (Tabla XXXIII). En este sentido, podemos afirmar que los niños alimentados al pecho raramente padecen un déficit de vitamina A, que tendría consecuencias en cuanto al déficit de antioxidantes y otras muchas funciones atribuidas a esta vitamina, incluyendo la alteración del sistema inmune, con descenso de linfocitos T y de anticuerpos frente a determinadas bacterias (Kramer, 1996; Ross, 1996).

Se ha demostrado una correlación inversa entre la cantidad de grasa ingerida en la dieta, los ácidos grasos tanto saturados como monoinsaturados y la presencia de vitamina E en la leche materna (Figura 9); también resultan significativas las correlaciones inversas existentes entre los ácidos grasos saturados de la dieta y la vitamina A en la leche (Figura 10). Estos datos sugieren que tanto los AGS y como los

AGM de la dieta (ácidos grasos con un alto potencial de peroxidación lipídica) influirían negativamente en la excreción de estas vitaminas en la leche de mujer.

4. RESPECTO A LA LIBERACIÓN CONJUNTA DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS Y VITAMINAS LIPOSOLUBLES A TRAVÉS DE LA LECHE HUMANA.

Actualmente son numerosos los documentos bibliográficos que relacionan la presencia de los compuestos organoclorados con alteraciones en el metabolismo lipídico, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. Estos acontecimientos se creen estrechamente ligados a la toxicidad y carcinogenicidad de estas sustancias.

Ya ha sido indicada anteriormente la alta relación que existe entre la presencia de pesticidas organoclorados y el metabolismo celular de moléculas que intervienen en procesos redox (Tithof, 1996, 1998, 2000). Paralelamente, algunos autores han realizado estudios *in vivo* administrando a ratas gestantes una mezcla de compuestos entre los que se encontraban moléculas organocloradas. En ellos se evidencia el aumento en la cantidad de grasa corporal en los recién nacidos hijos de madres tratadas frente a los controles. Por el contrario, el contenido lipídico fetal no experimentó cambios, lo cual podría implicar que reciben una mayor carga de pesticidas en la época neonatal (a través de la leche materna) que durante la gestación, gracias al papel protector de la placenta (Chen, 2002).

Los acontecimientos ligados a alteraciones en el metabolismo lipídico han sido en los últimos años achacados a trastornos enzimáticos, sobre todo en la acetil-coenzima A (CoA) carboxilasa, la sintetasa de ácidos grasos y la hidroximetil-glutaril (HMG) CoA reductasa (Lakshman, 1989). Más recientemente, otros autores han demostrado que los compuestos organoclorados pueden originar, *in vitro*, la liberación de ácido araquidónico mediada por la fosfolipasa A2 (Tithof, 1996, 1998, 2000; Wang, 2001; Olivero, 2002). En otro estudio reciente, otro enzima, la tirosin-kinasa estaría implicada en la liberación de ión superóxido cuando los neutrófilos son expuestos a una mezcla de PCBs (Tithof, 1997). Otros autores han demostrado que pesticidas organoclorados como el lindano son capaces de incrementar las concentraciones de AMPc e inhibir las contracciones uterinas en ratas

(Criswell, 1999), explicando así alguno de sus efectos como disruptor endocrino. Estos autores concuerdan con Bae et al (Bae, 1999), Tithof et al. (Tithof, 2000) y Wang et al. (Wang, 2001), en que estos pesticidas son capaces de producir la liberación de ácido araquidónico mediada por fosfolipasa A2. Otros efectos demostrados *in vitro* incluyen el bloqueo de receptores gabaérgicos por parte del lindano, endosulfán alfa y dieldrín (Vale, 2003). Ante estos antecedentes, cabe preguntarse si existe algún tipo de relación entre los pesticidas organoclorados en leche materna, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y los antioxidantes que se están eliminando en este medio (v.g. vitaminas A y E). En este trabajo se han encontrado algunas correlaciones entre ambos tipos de compuestos que serán comentados a continuación. Las correlaciones constatadas de algunos pesticidas organoclorados con el ácido linolénico y con los ácidos grasos derivados de la serie n-3, sugieren un campo de investigación de máximo interés, pues, como es sabido, el DHA es componente primordial de las membranas celulares de todos los tejidos incluido el sistema nervioso central; por tanto, los efectos patológicos y deletéreos derivados de esta relación deberían ser investigados en profundidad. En el análisis de correlación por etapas de lactancia, el DHA es el AGPI-CL con mayor número de correlaciones demostradas (un total de 7), cuya liberación conjunta queda demostrada con pesticidas como lindano, dieldrín, mirex, clordano, endosulfán lactona, endosulfán diol y metoxicloro (Tabla XXVII).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo hacen muy sugerente la idea de la liberación de ácido araquidónico mediada por fosfolipasa A2 y estimulada por grandes cantidades de pesticidas organoclorados que, junto a otros xenobióticos con capacidad de disrupción endocrina, proceden de la liberación a partir del tejido adiposo que acontece al final de la gestación, durante el parto y durante la lactancia. Este hecho explicaría alguna de las correlaciones demostradas entre pesticidas como aldrín, endosulfán diol, p,p'DDD, o,p'DDT y p,p'DDT con la serie n-6. Sin embargo, se han observado mayor número de correlaciones con los ácidos grasos de la serie n-3 que con la n-6 (Tabla XXVII y XXVIII).

Las correlaciones establecidas en este estudio demuestran la liberación conjunta de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y pesticidas organoclorados, hecho que debe ser profundamente investigado en el futuro para entender mejor el metabolismo de los xenobióticos dentro del organismo humano.

Recientemente, un estudio realizado en animales ha demostrado una correlación negativa entre los niveles de algunos de los contaminantes orgánicos persistentes (vg. DDT, PCB) y las reservas endógenas de vitamina A (Nyman, 2003).

Las tablas XXV y XXVI muestran el descenso, estadísticamente significativo, de las concentraciones de las vitaminas A y E desde la leche calostrual a la madura, datos que coinciden con los aparecidos recientemente en la literatura científica (Thomas, 1981; Fomon, 1995; Pajaron, 1995; Barbas, 1998). Este descenso constituye una pérdida de la capacidad antioxidante frente a los xenobióticos presentes en ella y que serán ingeridos por el recién nacido lactado al pecho.

Han quedado claras distintas correlaciones entre la presencia de pesticidas y vitaminas liposolubles en leche materna. En concreto, tal y como se expone en la Tabla XXX se evidencia una correlación negativa entre las concentraciones de endosulfán lactona y las de vitamina E en las muestras de leche analizadas. Este hallazgo sugiere una acción protectora de esta vitamina, de acción claramente antioxidante, frente al pesticida en cuestión.

Si se analiza, por una parte, la ingesta de vitaminas liposolubles A y E y su relación con los niveles de PO en leche materna, se concluye que no hay ninguna correlación entre ambos, excepto para la vitamina A y el endosulfán diol ($r:0.67$, $p=0.001$). Este hecho podría significar la imposibilidad de modificar cuantitativamente la presencia de PO en la leche humana mediante una ingesta de antioxidantes en forma de vitaminas de este tipo (Tabla XXXV).

5. INTERPRETACIÓN DE LA EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA Y COMPARACIÓN FRENTE A LAS RECOMENDACIONES DIARIAS ADMISIBLES (RDA)

El interés que nos lleva a evaluar la dieta de las madres lactantes en este trabajo se enfoca fundamentalmente en el hecho de que muchos autores están comprobando como la dieta y los hábitos de vida de la población están relacionados con los niveles de pesticidas organoclorados contenidos en la leche materna y otros medios biológicos.

Los estudios retrospectivos individuales son altamente útiles para estimar la ingesta en un tiempo pasado aunque deben ser frecuentemente

modificados en función del consumo y composición de la dieta de acuerdo con la población objeto de estudio (Willet, 1994; Stram, 1995). Se considera que únicamente son necesarios de cuatro a cinco cuestionarios de recuerdo de 24 horas para la obtención de datos fiables en la mayoría de los nutrientes, incluyendo aquí algunos micronutrientes como son las vitaminas A, D, Niacina y algún mineral como Fe o Ca. Se ha demostrado que se pueden percibir cambios en la dieta altamente reproducibles con este número limitado de encuestas por sujeto (Tsubono, 1995). Basándonos en las referencias publicadas por otros autores que trabajan en este mismo campo, se ha considerado adecuado la evaluación de las encuestas repartidas en tres períodos distintos de lactancia (primeros días tras el parto, en los días 6 y 12 postparto, y finalmente entre los 13-32 días postparto). Esto supone nueve encuestas alimentarias por mujer repartidas en las tres etapas. Se ha elaborado una encuesta alimentaria de recuerdo de 24 horas dividida en cinco partes: desayuno, media mañana, almuerzo, merienda y cena, en la que se recogió cada uno de los platos e ingredientes con los que se elaboraron las comidas. La evaluación nos interesa tanto por la contribución de nutrientes de la dieta como por la posible influencia de los alimentos en el aporte de pesticidas organoclorados. En caso de que las encuestas estuviesen incompletas respecto a las cantidades de alimento ingerido en cada ración, se recurre a la información bibliográfica publicada para los hábitos alimentarios españoles que recogen valores medios estandarizados para cada ración y el modo de elaboración de los platos. De esta manera se conocen los valores de energía, macronutrientes y micronutrientes consumidos por cada mujer.

Los resultados del análisis de dichas encuestas reflejan que la *ingesta media diaria de energía* por las mujeres corresponde a 2225.44 ± 351.78 Kcal, encontrándose en muchos de los casos (93.8%) por debajo de lo recomendado (2700 Kcal/día) (Tabla XXXII y XXXIII).

Respecto a la *ingesta media diaria de macronutrientes* (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), queda demostrado que, en esta población estudiada, la dieta de la mayoría de las madres (92.2%) excede la cantidad de glúcidos y proteínas, según la RDA 2002. Cuando se han buscado estudios similares realizados en otras poblaciones, cabe destacar el realizado por Mullerova, donde presentan una ingesta diaria de hidratos de carbono y proteínas similar al presente estudio, ya que se sitúa en 280.0 ± 112 g/día y $75,4 \pm 18$ g/día respectivamente (Mullerova, 1998).

Los lípidos aportados en la dieta no alcanzan, en más de la mitad de los casos (59.4%) las cifras recomendadas, así como tampoco cubren el porcentaje recomendado respecto al total de energía (35% del total calórico diario) (Tabla XXXIII). Dentro de la cantidad total de grasa, el 30% deber ser aportado en forma de AGPI, lo cual debe ser tenido en cuenta debido a las importantes funciones ya descritas a lo largo de este trabajo. La comparación establecida entre lo ideal y lo ingerido por las madres muestra un déficit de aporte dietético para estos AGPI en el 40,6% de ellas. Estos porcentajes quizás sean aceptables en esta población, ya que hay que situarla en unos hábitos de consumo muy específicos, los del sur peninsular, donde el consumo mayoritario es aceite de oliva, rico en ácidos grasos monoinsaturados.

Es notable también que el colesterol procedente de la ingesta sobrepasa lo recomendado en la mayoría de los casos. Sólo el 14,1% de los casos ingieren menos de 300 mg/día de colesterol, frente al 67.8% cuyos ingresos superan los 350 mg/día. El resto (el 18,1%) ingiere lo recomendado (300 a 350 mg/día). El rango de valores para el colesterol es muy amplio (169,33 y 1152.48 mg/día) (Tabla XXXIII).

En cuanto a la *ingesta diaria media para los micronutrientes* (Tabla XXXIII), se debe resaltar la gravedad de la falta de ingesta suficiente de hierro, ya que ninguna de las encuestadas alcanzó el nivel recomendado. El aporte exógeno de hierro en los alimentos debe guardar un paralelismo con la ingesta total de energía (según la RDA, 27 mg de hierro para un total de 2700 Kcal; ó lo que es igual, 10 mg por cada 1000 Kcal). En las mujeres de nuestro estudio, tampoco se cumple esta relación, pudiendo observarse que por cada 1000 Kcal de la dieta sólo se consumían una media de 6 mg de hierro al día. Así pues, esta población se encuentra con un riesgo elevado de padecer anemia ferropénica o deficiencia de hierro, por lo que debería modificar sus hábitos alimentarios o bien valorar la posibilidad de la suplementación farmacológica con hierro. Lo mismo ocurre cuando se cuantifica la ingesta diaria de cinc, ya que en el 85,9% de los casos son deficitarias las encuestas dietéticas recogidas. No hay que olvidar que este mineral que participa de forma decisiva en la capacidad de cicatrización de heridas o en la percepción de los sabores. Los síntomas derivados de su déficit nutricional no suelen ser acusados en personas sanas, aunque en cuadros de malabsorción intestinal o en pacientes con insuficiencia renal o hepática puede aparecer como primer síntoma una dermatitis.

En lo que respecta a las vitaminas, casi ninguna mujer ingiere la cantidad recomendada de vitamina E (98.4%), lo cual indica un déficit considerable en los sistemas de antioxidación no enzimática natural. La media de ingesta diaria fue de 7.37 ± 1.94 mg, cifra muy por debajo de las recomendaciones del 2002 sobre ingesta diaria adecuada de esta vitamina (15 mg/día). Por otro lado, las necesidades diarias de vitaminas A y C sí son cubiertas por el 79,7% de las mujeres, con lo que podría contrarrestar el déficit nutricional de la vitamina E en cuanto a capacidad o potencial antioxidante dependiente de la dieta (Tabla XXXIII). Sin embargo, debe resaltarse que el mecanismo antioxidante de las vitaminas A y E es muy diferente: el grupo fenol existente en la molécula de vitamina E evita que los fenómenos de oxidación que sufre este compuesto se perpetúen y afecten a otras sustancias. La vitamina A, por el contrario, evita la peroxidación lipídica al oxidarse ella misma, pero se convierte en una sustancia inestable que puede dar lugar a más fenómenos oxidativos en cadena. En algunos de los trabajos experimentales realizados *in vitro* (ya descritos anteriormente) queda demostrado que la adición de este tipo de vitaminas es capaz de revertir los efectos adversos de alguno de los pesticidas, como es la liberación de AA de las membranas celulares (Krieger, 2001; Latchoumycandane, 2002). Por tanto, el déficit dietético de vitamina E encontrado en las mujeres de este trabajo, puede tener consecuencias negativas, tanto para la madre como para el niño lactante, que se encuentran desprotegidos frente a los efectos pro-oxidativos de los compuestos organoclorados.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es posible extraer una serie de conclusiones que se exponen a continuación.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1^a.- En el presente trabajo de investigación, ha quedado, una vez más, en evidencia la presencia de xenobióticos en concentraciones muy variables en leche humana de mujeres españolas. Se puede afirmar que los niños españoles alimentados al pecho, al igual que en otros países, están expuestos a estas sustancias de forma continuada mientras dura el periodo de lactancia, superando el límite TEQ establecido por la OMS y, por tanto, sometidos a sus efectos potencialmente tóxicos. Alguno de estos pesticidas se han encontrado en el 100% de las muestras analizadas tanto de calostro, de leche de transición como de leche madura, tal es el caso del p,p'DDE.

2^a.- Igual que existe un TEQ para moléculas persistentes (dioxinas o PCBs), debería establecerse un valor máximo de exposición a pesticidas organoclorados presentes en medios biológicos humanos. Sería muy útil conocer a partir de qué nivel la contaminación por un determinado pesticida "*puede resultar peligrosamente elevada*".

3^a.- El metoxicloro y el endosulfán lactona presentes en la leche de las madres estudiadas, son los pesticidas organoclorados vinculados más frecuentemente con las grasas de la dieta, tanto saturadas como insaturadas.

4^a.- El ácido linolénico aumenta en la leche de transición y madura respecto al calostro. El ácido linoleico no experimenta una variación significativa en los tres períodos estudiados. Las concentraciones en leche materna de los AGPI de larga cadena (AA y DHA) disminuyen conforme avanza la lactancia y la cantidad total de AGPI-CL se mantiene estable; estos resultados concuerdan con los efectos de la maduración de los sistemas enzimáticos a lo largo del primer mes de vida.

5^a.- Las correlaciones establecidas en este estudio demuestran la liberación conjunta a través de la leche humana de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y pesticidas organoclorados, hecho que debe ser profundamente investigado en el futuro para entender mejor el metabolismo de estos xenobióticos en el organismo humano y sus consecuencias. Asimismo, se demuestran claras correlaciones entre las

vitaminas liposolubles y la presencia de pesticidas organoclorados en leche materna.

6^a.- Los resultados del análisis de las encuestas reflejan que: 1) el 93.8% de las mujeres participantes en el estudio muestran una ingesta diaria de energía por debajo de las recomendaciones; y 2) en el 7.8% de las madres, la ingesta de glúcidos y proteínas excede las recomendaciones de la RDA 2002.

7^a.- Los lípidos aportados en la dieta no alcanzan, en más de la mitad de los casos (59.4%), las cifras recomendadas, así como tampoco cubren el porcentaje recomendado respecto al total de energía (35% del total calórico diario); el 40.6% de las madres lactantes no cubren el porcentaje recomendado de AGPI (30% del total de grasa); estos resultados concuerdan con el consumo mayoritario en nuestro medio de aceite de oliva, rico en ácidos grasos monoinsaturados. El 67.8% superan los 350 mg/día de colesterol recomendados como máximo por la RDA.

8^a.- Se detecta una clara deficiencia en la ingesta de hierro, pues ninguna de las mujeres encuestadas alcanzan las recomendaciones (según la RDA, 27 mg de hierro para un total de 2700 Kcal; ó lo que es igual, 10 mg por cada 1000 Kcal). Igualmente resultó deficitaria la ingesta diaria de zinc en el 85.9% de las madres participantes en el estudio.

9^a.- El 98.4% de las madres lactantes mostraron una ingesta media diaria de vitamina E de 7.37 ± 1.94 mg, deficitaria según las recomendaciones del año 2002 (15 mg/día). Este hecho puede tener consecuencias negativas tanto para la madre como para el niño lactante, que se encuentran desprotegidos frente a los efectos pro-oxidativos de los compuestos organoclorados. En contraposición, el 79.7% de las mujeres cubren las recomendaciones de ingesta diaria de vitaminas A y C.

10^a.- El descenso estadísticamente significativo de las concentraciones de vitaminas A y E desde la leche calostrual a la madura, sugiere la necesidad de suplementar a las madres lactantes para enriquecer la leche materna en estas vitaminas y mejorar la capacidad antioxidante en sus hijos, incluso frente a los xenobióticos que les aporta la propia leche.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

AGOSTONI C, RIVA E, BELLU R, TROJAN S, LUOTTI D, GIOVANNINI M: Effects of diet on the lipid and fatty acid status of full-term infants at 4 months. *J Am Col Nutr.* 1994. Vol 13. N° 6, 658-664.

AGOSTONI C, TROJAN S, BELLU R, RIVA E, GIOVANNINI M: Neurodevelopmental quotient of healthy term infants and feeding practice: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pediatr Res.* 1995^a; 38:262-266.

AGOSTONI C, RIVA E, TROJAN S, BELLU R, GIOVANNINI M: docosahexaenoic acid status and developmental quotient of healthy term infants. *Lancet.* 1995^b; 346:868.

AGOSTONI C, TROJAN S, BELLU R, RIVA E, BRUZZESE MG, GIOVANNINI M: Early association between membrane fatty acid composition and neurodevelopmental performance is not predictive of performance at two year follow up, irrespective of a link with current fatty acid status. *Arch Dis Child.* 1997 (in press).

AAP. COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL HEALTH. PCBs in breast milk. *Pediatrics* 1994; 94:122-123.

ABELSON PH. Chlorine and organochlorine compound. *Science* 1994; 265:1155.

AHLBORG UG, LIPWORTH L, TITUS-ERNSTOFF L. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol.* 1995; 25:463-531.

AJANS ZA, SARRIF A, HUSBANDS M. Influence of vitamin A on human colostrum and early milk. *Am J Clin Nutr.* 1965 Sep;17(3):139-42.

AKHTAR N, KAYANI SA, AHMAD MM, SHAHAB M. Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. *J Appl Toxicol.* 1996; 16(5):397- 400.

ALBERT L. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna y riesgo para la salud. Bol Off Sanit Panam. 1981; 91:15-29.

ALBERT LA, ALPUCHE L, BÁRCENAS C, RENDÓN JA Survey of Organochlorine Pesticide Residues in Cheese Samples from Three Mexican Regions. Environmental Pollution 1990; 65:119-126.

ALCORIZA J, DE COS AI, GÓMEZ AM, LARRAÑAGA J, GARGALLO M, SOLA D, VÁZQUEZ C. Raciones estándar de materias primas y recetas culinarias para uso en encuestas alimentarias. Nutrición Clínica 1990; 10:60-65.

ALEXANDER JW. Immunonutrition: the role of n-3 fatty acids. J Nutr 1998; 14: 627-633.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON NUTRITION: nutritional needs of low birthweight infants. Pediatrics 1985;75:976-86.

ANDERSEN KB, KVAM L, NILSSON A, NORUM KR, BLOMHOFF R: Mobilization of retinol from stellate cells. J Biol Chem 1992; 267: In Press.

ANDERSON DM, PITTARD WB 3RD. Vitamin E and C concentrations in human milk with maternal megadosing: a case report. J Am Diet Assoc. 1985 Jun;85(6):715-7.

ARANDA JV, CHEMTOB S, LAUGDIGNON N and SASYNIUK BI: Furosemide and vitamin E. Two problem drugs in neonatology. Ped Clin North 1986; 33: 583-602.

ARANDA FJ, COUTINHO A, BERBERAN-SANTOS MN, PRIETO MJE, GOMEZ-FERNANDEZ JC: Fluorescence study of the location and dynamics of α -tocopherol in phospholipid vesicles. Biochim Biophys Acta 1989; 985: 26-32.

ARITA M, SATO Y, MIYATA A: Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. Biochem J 1995; 306: 437-443.

ARMSTRONG B, DAVIS RE, NICOL DJ y col. Hematological vitamin B₁₂ and folate studies on Seventh-Day Adventist vegetarians. *Am J Clin Nutr*. 1974; 27:712-718.

ARNOLD SF, KLOTZ DM, COLLINS BM, VONIER PM, GUILLETTE LJ Jr, McLACHLEN JA. Synergistic Activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 1996; 272:1489-1492.

ASCHERIO A, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, RIMM EB, LITIN L, WILLETT WC: Correlations of vitamin A and E intakes with the plasma concentrations of carotenoids and tocopherols among American men and women. *J Nutr* 1992; 122: 1792-1801.

ASPLUND L, SVENSSON BG, NILSSON A, ERIKSSON U, JANSSON B, JENSEN S, WIDEQUIST U, SKERFING S. PCB, p,p'-DDT and p,p'-DDE in human plasma related to fish consumption. *Arch Environ Health* 1994; 49:477-486.

ATUMA SS, HADSSON L, JOHNSON H, SLORACH S, DE WIT CA, LINDSTROM G. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and dioxins in human milk from Swedish mothers. *Food Addit Contam*. 1998; 15(2):142-150.

AZZI A, BOSCOBOINIK D, MARILLEY D, OZER NK, STAUBLE B y TASINATO A: Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62(suppl): 1337S-1346S.

BACH AC, BABAYAN V. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr*. 1982; 950-962.

BAILEY JM, DUNHAR LM: Essential fatty acid requirements of cells in tissue culture. A review. *Exp Molecul Path*. 1973; 18:142-161.

BAJAJ JS, MISRA A, RAJALAKSHMI M, MADAN R. Environmental release of chemicals and reproductive ecology. *Environ Health Perspect*. 1993; Suppl.101,2:125-130.

BALLABRIGA A, MARTINEZ M, GALLART-CATALA A. Composition of subcutaneous fat depot in prematures in relationship with fat intake. *Helv Paediat Acta* 1972; 27:91-8

BALLABRIGA A, MARTINEZ M. Changes in erythrocyte lipid stroma in the premature infant according to dietary fat composition. *Acta Paediatr Scand.* 1976; 65:705-9.

BALLABRIGA A: Which is the role of long-chain polyunsaturated fatty acids in infants nutrition?. In: Ghraf R, Falkner F, Kleinman R, Koletzko B, Morán J (eds): *New perspectives in infants nutrition.* Ediciones Ergon, S.A. Madrid, 1994; pp. 237-247.

BALLABRIGA A, CARRASCOSA A. *Nutrición en la infancia y adolescencia.* Ed ERGON. 2ª edición. Madrid. 2001.

BARBAS C, HERRERA E. Lipid composition and vitamin E content in human colostrum and mature milk. *J Physiol Biochem.* 1998 Sep;54(3):167-73.

BARBERA C. *Pesticidas agrícolas.* Ed. Omega. 40 edición. Barcelona. 1989.

BARKUE PP, MISRA V, BHATNAGAR P. Residue of organochlorine insecticides in fish from Mahala water, Jaipur, India. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1990; 45:394-398.

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.* 1998; 20:279-282.

BARUA AB, OLSON JA: Retinoyl β -glucuronide: an endogenous compound of human blood. *Am J Clin Nutr* 1986; 43: 481-485.

BASU TK, DONALD EA, HARGREAVES JA, THOMPSON GW, CHAO E, PETERSON RD: Seasonal variation of vitamin A (retinol) in older men and women. *J Am Coll Nutr* 1994; 13: 641-645.

BATES MN, HANNAH DJ, BUCKLAND SJ, TAUCHER JA, MAANEN T. Chlorinated organic contaminants in breast milk of New Zealand Women. *Environ Health Perspect.* 1994; Suppl.102,1:211-217

BATES MN, THOMSON B, GARRETT N. Reduction in organochlorine levels in the milk of New Zealand women. *Arch Environ Health* 2002 Nov-Dec;57(6):591-7.

BAVIK CO, ERIKSSON U, ALLEN RA, PETERSON PA. Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. *J Biol Chem* 1991;266(23):14978-85.

BAYES R, NARBONA E, MALDONADO J, NÚÑEZ DEL CARRIL J, MUÑOZ A, RODRÍGUEZ J: Déficit de vitamina E en recién nacidos y lactantes. Premios de Nutrición infantil. 1985. Barcelona; Ed. Nestlé AEPA S.A. 1986; pp: 331-382.

BEARD AP, BARTLEWSKI PM, RAWLINGS NC. Endocrine and reproductive function in ewes exposed to the organochlorine pesticides Lindane or Pentachlorophenol. *J Toxicol Environ Health* 1999; 56(1):23-46.

BEHRENS WA, THOMPSON JN, MADERE R: Distribution of α -tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 691-696.

BEHRENS WA, MADERE R: Transport of α - and γ -tocopherol in human plasma lipoprotein. *Nutr Res* 1985; 5: 167-174.

BEIJERS RJ, SCHAAFSMA A: Long-chain polyunsaturated fatty acid content in Dutch preterm breast milk; differences in the concentrations of docosahexaenoic acid and arachidonic acid due to length of gestation. *Early Hum Dev* 1996 Mar 22;44(3):215-23.

BENITO J, RUIZ J, AQUINO J, PIJOÁN J, SASIETA M, SANJURJO P. Perfil de ácidos grasos a los dos meses de vida en niños alimentados con lactancia materna frente a varias fórmulas artificiales disponibles comercialmente en España. *An Esp Pediatr* 2002; 57(2):163-9.

BENZIE IFF: Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Internat J Food Sci Nutr* 1996; 47: 233-261.

BERN HA. Diethylstilbestrol (DES) Syndrom: Present Status of Animal and Human Studies. *Homonal Carcinogenesis*. 1992; 1-8.

BERRY MR. Strategy for a dietary exposure research program. *J Exp Anal Environ Epidemiol*. 1992; Suppl.1:97-110.

BHALLA P, AGRAWAL D. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. *Hum Exp Toxicol*. 1998 Nov;17(11):638-42.

BIANCHI ML, CRUZ A, ZANETTI MA, DOREA JG: Dietary intake of selenium and its concentration in breast milk. *Biol Trace Elem Res* 1999 Dec;70(3):273-7.

BIERI JG: Kinetics of tissue alpha-tocopherol depletion and repletion. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 203: 181-191.

BIERI JG, EVARTS RP: α -Tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *Am J Clin Nutr* 1974; 27: 980-986.

BIERI JG: Dietary role of vitamin E, In: Horisberger and Bracco (eds): *Lipids in modern nutrition. Netslé Nutrition*. New York. Raven Press 1987: 123-131.

BIRCH EE, BIRCH DG, HOFFMAN DR, UAUY R. Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33:3242-3253.

BJERVE KS, FISHER S, ALME K. Alpha-linolenic acid deficiency in man: effect on ethyl linolenate on plasma and erythrocyte fatty acid composition and biosynthesis of prostanoids. *Am J Clin Nutr* 1997;46:570-6.

BJORNEBOE A, BJORNEBOE GA, BODD E, HAGEN BF, KVESETH N, DREVON CA: Transport and distribution of alpha-tocopherol in lymph, serum and liver cells in rat. *Biophys Biochim Acta* 1986; 889: 310-315.

BJORNEBOE A, SOYLAND E, BJORNEBOE GA, PAJKA G, DREVON CA: Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1987; 117(4): 463-469.

BJORNEBOE A, BJORNEBOE GA, DREVON CA: Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 1990; 120: 233-242.

BLANER WS: Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 1989; 10: 308-316.

BLANER WS, VAN BENNEKUM AM, BROUWER A, HENDRIKS HFJ: Distribution of lecithin-retinol acyltransferase activity in different types of rat liver cells and subcellular fractions. *FEBS Lett* 1990; 274: 89-92.

BLANER WS, OLSON JA: Retinol and retinoic acid metabolism. In: Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS (eds). *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*. New York. Raven Press 1994; pp. 229-255.

BLOMHOFF R, HELGERUD P, RASMUSEN M, BERG T, NORUM K: In vivo uptake of chylomicron (^3H) retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7326-7330.

BLOMHOFF R, HOLTE K, NAESS L, BERG T: Newly administered (^3H) retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp Cell Res* 1984; 150: 186-193.

BLOMHOFF R, ESKILD W, KINDBERG GM, PRYDZ K, BERG T: Intracellular transport of endocytosed chylomocron (^3H)retinyl ester in rat liver parenchymal cells. Evidence for translocation of a (^3H)retinoid from endosomes to endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1985; 260: 13566-13570.

BLOMHOFF R, GREEN MH, GREEN JB, BERG T, NORUM KR: Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol Rev* 1991; 71: 951-990.

BLOMHOFF R, GREEN MH, NORUM KR: Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 37-57.

BLOMHOFF R: Overview of vitamin A metabolism and function. In : *Vitamin A in Health and Disease* (Blomhoff r. ed). Marcel Dekker Inc. New York 1994a; pp: 1-35.

BLOMHOFF R: Transport and metabolism of vitamin A . *Nutr Rev* 1994b; 52: 13-23.

BLOOMGARDEN Z: Antioxidant and diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20 (4): 670-673.

BLUMBERG JB: The role of vitamin E in immunity during aging. En: M Mino, H Nakamura, AT Diplock, HJ Kayden, eds. *Vitam. E-Its Usefulness in Health and in Curing Diseases*, Jpn Sci Soc Press Press and Karger: Tokyo. Japan and Basel 1993; 219-229.

BOATELLA J, RAFECAS M, CODONY R y col. Trans fatty acid content of human milk in Spain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; 13:155-163.

BOTELLA ORTS B. Pesticidas organoclorados en mujeres afectas de cáncer de mama: Evaluación del efecto estrogénico. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 2000.

BOURRE JM, PICIOTTI M, DUMONT O: Delta6 desaturase in brain and liver during development and aging lipids. 1990; 25: 354-356.

BRATTER P, BRATTER VE, RECKNAGEL S, BRUNETTO R: Maternal selenium status influences the concentration and binding pattern of zinc in human milk. *J Trace Elem Med Biol* 1997 Dec;11(4):203-9.

BRODY T: Vitamins. En: *Nutritional Biochemistry*. Academic Press Inc: San Diego. 1994.

BROUWER W, AHLBORG UG, VAN LEEUWEN FXR, FEELY MM. Report of the WHO working group on the assessment of health risks for humans infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere* 1998; 37:1627-1643.

BROWN JK, COCKBURN F, FORFAR JO. Clinical and chemical correlates in convulsions in the newborn. *Lancet* 1972;1:135-139.

BRUNETTO R, LEON A, BURGUERA JL, BURGUERA M. Levels of DDT residues in human milk of Venezuelan women from various rural populations. *Sci Total Environ.* 1996; 186(3):203-207.

BULL JJ, GUTZKE WHN, CREWS D. *Gem Com Endocrinol.* 1988; 70:425-428.

BURTON GW, CHEESEMAN KH, DOBA T, INGOLD KJ: Vitamin E as an antioxidant in vivo and vitro. En: *Biology of vitamin E*. Ciba Foundation Symposium 101. Pitman Press. London 1983; 4-18.

BURKE ER, HOLDEN AJ, SHAW IC. A method to determine residue levels of persistent organochlorine pesticides in human milk from Indonesian women. *Chemosphere*. 2003 Jan;50(4):529-35.

BURTON GW, WEBB A, INGOLD KU: A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids* 1985; 20(1): 29-39.

BURTON GW, INGOLD KU: Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570: 7-22.

BURTON GW, INGOLD KU, ZAHALKA H, DUTTON PM HUGHES L, FOSTER DO, BEHERENS WA: Biodiscrimination of tocopherols. En: M Mino, H Nakamura, AT Diplock, HJ Kayden, eds. *Vitam. E-Its Usefulness in Health and in Curing Diseases*, Jpn. Sci. Soc. Press Press and Karger: Tokyo, Japan and Basel, Switzerland 1993; 58-61.

BUSTOS S, DENEGRI JC, DÍAZ F, TCHERNITCHIN AN. p,p'-DDT is an estrogenic compound. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1988; 41:496-501.

CAJKA T, HAJŠLOVA J. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk from the locality Prague, Czech Republic: a comparative study. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2003 May;70(5):913-9.

CALDER PC. Fat chance of immunomodulation. *Immunol Today* 1998; 19:244-7.

CANADA FJ, LAW WC, RANDO RR, YAMAMOTO T, DERGUINI F, NAKANISHI K: Substrate specificities and mechanism in the enzymatic processing of vitamin A into 11-cis-retinol. *Biochemistry* 1990; 29: 9690-9697.

CANFIELD LM, GIULIANO AR, GRAVER EJ. Fat soluble vitamins in human milk I: vitamin K, vitamin A and the carotenoids. In: Jensen RG, ed. *Handbook of milk composition*. New York: Academic Press 1995; 693:705.

CANFIELD LM, GIULIANO AR, NEILSON EM y col. β -Carotene in breast milk and serum is increased after a single β -carotene dose. *The American Journal Clinical of Nutrition* 1997; 66:52-61.

CANFIELD LM, GIULIANO AR, NEILSON EM, BLASHIL BM, GRAVER EJ, YAP HH. Kinetics of the response of milk and serum beta-carotene to daily beta-carotene supplementation in healthy, lactating women. *Am J Clin Nutr* 1998;67:276-83.

CANFIELD LM, KAMINSKY RG, TAREN DL, SHAW E, SANDER JK: Red palm oil in the maternal diet increases provitamin A carotenoids in breastmilk and serum of the mother-infant dyad. *Eur J Nutr* 2001 Feb;40(1):30-8.

CANTOR KP, BOOZE CF. Mortality among aerial pesticide applicators and flight instructors: a reprint. *Archives of Environmental Health* 1991; 46:110-116.

CARLSON SE, RHODES PG, RAO VS, GOLDGAR DE: Effect of fish oil supplementaton on the omega-3 fatty acid content of red blood cell membranes in preterm infants. *Pediatr Res.* 1987; 21: 507-510.

CARLSON SE, COOKE RJ, PEEPLES JM, et al.: Docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoate (EPA) status of preterm infants: relationship to visual acuity in n-3 supplemented an unsupplemented infants. *Pediatr Res.* 1989; 25: 285A

CARLSON SE, WERKMAN SH, RHODES PG, TOLLEY EA: visual acuity development in healthy preterm infants: effect of marine-oil supplementation. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 35-42.

CARLSON SE, FORD AJ, WERKMAN SH, PEEPLES JM: Visual acuity and fatty acid status of term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoate and arachidonate from egg yolk lecithin. *Ped Res.* 1996; 39: 1-7.

CHAN AC: Vitamin E and the arachidonic acid cascade. En: M mino, ed. *Vitam. E-Its Usefulness in Health and in Curing Diseases.* Jpn. Sci. Soc. Press: Tokyo, Japan 1993; 197-207.

CHAN SC, KIM JW, HENDERSON WR, HANIFIN JM. Altered prostaglandin E2 regulation of cytokine production in atopic dermatitis. *J Immunol* 1993;151:3345-52.

CHAPELL JE, CLANDININ MT, KEARNEY-VOLPE C. Trans fatty acids in human milk lipids: influence of maternal diet and weight loss. *Am J Clin Nutr.* 1985; 42:49-56.

CHAPELL JE, FRANCIS T, CLANDININ M. Vitamin A and E content of human milk at early stages of lactation. *Early Hum Dev* 1985;11:157-67.

CHATELAIN E, BOSCOBOINIK D, BARTOLI GM: Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1176: 83-89.

CHEN CC, HELLER J: Uptake of retinol and retinoic acid from serum retinol-binding protein by retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 1977; 252; 5216-5221.

CHEN LH: Interaction of vitamin E and ascorbic acid. *In Vivo* 1989; 3: 199-209.

CHEN ZY, KWAN KY, TONG KK, RATNAYAKE WM, LI HQ, LEUNG SS. Breast milk fatty acid composition; a comparative study between Hong Kong and Chongqing China. *Lipids* 1997;32(10):1061-7.

CHEN ZY, HAMM JT, HASS JR, ALBRO PW, BIRNBAUM LS. A mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and non-ortho polychlorinated biphenyls (PCBs) changed the lipid content of pregnant Long Evans rats. *Chemosphere* 2002.;46:1501-4.

CHERIAN G, SIM J. Changes in the breast milk fatty acids and plasma lipids of nursing mothers following consumption of n-3 polyunsaturated fatty acid enriched eggs. *Nutrition* 1996;12:8-12.

CHO SH, CHOI YS. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 1994; 29:47-52.

CHOW CK: Vitamin E in plasma, erythrocytes and erythrocytes membranes. *Biol Synth Membr* 1989; 445-451.

CHULEI R, XIAOFANG L, HONGSENG M. Milk composition in women from five different regions of China: The great diversity of milk fatty acids. *J Nutr* 1995; 125:2993-98.

CHUNG SN, DHAWAN R, AGRAVAL N, MAHAJAN SK. Endosulfan poisoning in Northern India: a report of 18 cases. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998; 36(9):474-477.

CHYTIL F, ONG DE: Cellular retinol- and retinoid acid-binding proteins in vitamin A action. *Fed Proc* 1979; 38: 1510-1514.

CHYTIL F, ONG DE: Cellular retinoid-binding proteins. In: en: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds): *The retinoids*. Nueva York. Academic Press. Vol 2, 1984; pp.89-123.

CLAMON GH, SPORN MB, SMITH JM, SAFFIOTTI U: Alpha and beta-retinyl acetate reverse metaplasias of vitamin A deficiency in hamster trachea in organ culture. *Nature (London)* 1974; 250: 64-66.

CLANDININ MT, CHAPPELL JE, VAN AERDE JEE: Requirements of newborn infants for long-chain polyunsaturated fatty acids. *Acta Paediatr Scand.* 1989; Suppl. 351: 63-71.

CLARK KE y col. Environmental contaminants associated with reproductive failure in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) eggs in New Jersey. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1998; 61(2):247-254.

CLAWITTER J, TROUT WE, BURKE MC, ARAGHI S, ROBERTS RM: A novel family of progesterone-induced, retinol-binding proteins from uterine secretions of the pig. *J Biol Chem* 1990; 265: 3248-3255.

COCCO P, FIGGS L, DOSEMEDI M, HAYES R, LINET MS, HSING AW. Case-control study of occupational exposures and male breast cancer. *Occup Environ Med.* 1998; 55(9):599-604.

COHN WJ, BOYLAN JJ, BLANKE RV, FARRIS MW, HOWELL JR, GUZELIAN PS. Treatment of kepone toxicity with cholestyramine results of a controlled clinical trial. *N Engl J Med.* 1978; 298:243-248.

COHN W, GROSS P, GRUN H, LOECHLEITER F, MULLER DPR, ZULAUF M: Tocopherol transport and absorption. Proc Nutr Soc 1992; 51: 179-188.

COHN W, KUHN. The role of the low density lipoprotein receptor for alpha-tocopherol delivery to tissues. Ann N Y Acad Sci 1989; 570:61-71.

COLANTUONI V, CORTESE R, NILSSON M, LUNVALL J, BAVINK CO, ERIKSSON U, PETERSON PA, SUNDELIN J: Cloning and sequencing of a full length cDNA corresponding to human cellular retinol-binding protein. Biochem Biophys Res Commun 1985; 130: 431-439.

COLBORN T, CLEMENT C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human Connection. Princenton Scientific Publishing. 1992.

COLBORN T, SMOLEN MJ, ROLLAND R. Environmental neurotoxic effects: the search for new protocols in functional teratology. Toxicol Ind Health 1998; 14(1-2):9-23.

COLE DC, SHEESHKA J, MURKIN EJ, KEARNEY J SCOTT F, FERRON LA, WEBER JP. Dietary intakes and plasma organochlorine contaminant levels among Great Lakes fish eaters. Arch Environ Health. 2002 Sep-Oct;57(5):496-509.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Report of the Scientific Committee for Food (SCF). (Thirty-first Series) Nutrient and Energy Intakes for the European Community. Office for Official Publications of the EC, Luxembourg. 1993.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Strategy for a Chemicals Policy (White paper, 2001).

CONDE C. Compuestos organoclorados en la leche humana. Endocrinología 1989; 36:386-388.

CONCHELLO MP, HERRERA A, ARIÑO A, PEREZ-ARQUILLUE MC. Estado actual de la contaminación por residuos de plaguicidas organoclorados (HCB, HCHs y clorociclodienos) en piezas comerciales de la canal de ovino. Rev Esp Cienc Tecnol Aliment. 1992; 32(1):33-46.

CONON JM. Food Toxicology Contaminants and Additives. 1988; B:1167.

CONSTANTINESCU A, HAN D, PACKER L: Vitamin E recycling in human erythrocytes membranes. J Biol Chem 1993; 15: 10906-10913.

COSCOLLA, R. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Mundi-Prensa, Madrid. 1993; 205.

CRAAN AG, HAINES DA. Twenty-five years or surveillance for contaminants in human milk. Arch Environ Contam Toxicol. 1998; 35(4):702-710.

CRANE FL, NAVAS P: The diversity of coenzyme Q function. Mol Aspects Med 1997; 18 suppl: 1S-6S.

CRAWFORD MA, HASSAM AG, STEVENS PA: Essential fatty acid requirements in pregnancy and lactation with special reference to brain development. In: Holman RT (ed): Progress in lipid research. Pergamon Press LTD. Oxford (England). 1983; pp. 31-40.

CRAWFORD MA, DOYLE W, DRURY P y col. N-6 y n-3 fatty acids during early human development. J Intern Med . 1989; 225 (suppl I): 159-69.

CRAWLEY H, SHERGILL BONNER R: The nutrient and food intakes of 16-17 years old female dieters in the UK. J Hum Nutr Diet 1995; 8: 25-34.

CRISWEL KA, LOCH CARUSO R. Lindane-induced inhibition of spontaneous contractions of pregnant rat uterus. Reprod-Toxicol 1999 Nov-Dec; 13(6): 481-90.

CULLINEY T, PIMENTEL D, PIMENTEL M. Pesticides and natural toxicants in foods. Agriculture, Ecosystems and Environment. 1992; 41:297-320.

CURLEY A, KIMBROUGH, R. Chlorinated hydrocarbon insecticides in plasma and milk of pregnant and lactating women. Arch Environ Health 1969; 1118:1156.

DAGNELIE PC, VAN STAVEREN WA, ROOS A.H. y col. Nutrients and contaminants in human milk from mothers on macrobiotic and omnivorous diets. *Eur J Clin Nutr.* 1992; 46:355-366.

DAMLI A, VON SCHENCK U, CLAUSEN U, KOLETZKO B: Long-chain polyunsaturateds (LCP) modulate early mental development of preterm infants. In: Abstracts book of the 16th International Congress of Nutrition. Montreal (Canada). Julio-Agosto, 1997. PW2.2:42.

DE COS AI. Propuesta de estandarización de raciones de alimentos y menús para la evaluación del consumo alimentario de poblaciones. *Nutr Clin.* 1991; 11, 3:21-29.

DECSI T, KOLETZKO B: Growth fatty acid composition of plasma lipid classes, and plasma retinol and alpha tocopherol concentrations in full-term infants fed formula enriched with w-6 and w-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Acta Paediatr* 1995; 84: 725-732.

DEL PRADO M, VILLALPANDO S, ELIZONDO A, RODRIGUEZ M, DEMMELMAIR H, KOLETZKO B: Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. *Am J Clin Nutr* 2001 Aug;74(2):242-7.

DERACHE, J. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ed. Omega S.A. Barcelona. 1990.

DEUTCH B, PEDERSEN HS, JORGENSEN EC, HANSEN JC. Smoking as a determinant of high organochlorine levels in Greenland. *Arch Environ Health.* 2003 Jan;58(1):30-6.

DEWALLY E, AYOTTE P, LALIBERTÉ C, WEBER JP, GINGRAS S, NANTEL AJ. Polychlorinated biphenyl (PCB) y dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) concentrations in breast milk of women in Quebec. *American Journal of Public Health* 1996; 86, 9:1241-1246.

DGE: Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr. 5th Revised Edition. Umschau-Verlag. Frankfurt. 1991.

DICTAMEN FAVORABLE DEL CFP, 28-9-1999. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DIEM K, LENTNER C: Tablas Científicas. En: Documentación Geigy 7ª Edición. Barcelona. Ed. Geigy División Farmacéutica 1975.

DILLON JC. Cah Nutr diét 1995; 30,5:294-299.

DIPLOCK AT: Vitamin E. En: AT Diplock, ed. Fat-soluble vitamins. Technomic Publishing Co: Lancaster. Pennsylvania. 1985; 154-224.

DO L 221 de 7-8-1986, pp. 37,43. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 186 de 30-6-1989, p. 23. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 224 de 18-8-1990, Última modificación el Reglamento 1570/98. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 350 de 14-12-1990, p. 71. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 290 de 24-11-1993, p. 14. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 64 de 14-3-1996, p. 18. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 335 de 24-12-1996, p. 54. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 184 de 12-7-1997, p. 33. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 337 de 9-12-1997, p. 14. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 205 de 22-7-1998, p. 10. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 128 de 21-5-1999, p. 25. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 172 de 8-7-1999, p. 40. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DO L 194 de 27-7-1999, p. 36. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

DOBA T, BURTON GW, INGOLD KU, MATSUO M: α -Tocopheroxyl decay: lack of effect of oxygen. *J Chem Soc Chem Comm* 1984; 461-462.

DOBA T, BURTON GW, INGOLD KU: Antioxidant and co-antioxidant effect of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analog, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 835: 298-303.

DOONG RA, LEE CY, SUN YC. Dietary intakes and residues of organochlorine pesticides in foods from Hsinchu, Taiwan. *J AOAC Int.* 1999; 82(3):667-82.

DOREA JG: Iron and copper in human milk. *Nutrition* 2000 Mar;16(3):209-20.

DORGAN JF, BROCK JW, ROTHMAN N, NEEDHAN LL, MILLER R, STEPHENSON HE, SCHUSSLER N, TAYLOR PR. Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis. *Cancer Causes Control* 1999; 10(1):1-11.

DOSTALOVA L. Vitamin status during puerperium and lactation. *Ann Nutr Metab.* 1984;28(6):385-408.

DRV: PANEL ON DIETARY REFERENCE VALUES, DEPARTMENT OF HEALTH: Dietary refernce values for food energy and nutrients for the United Kingdom. Report on Health and Social Subjects 41, HMSO, London. 1991.

DUCHEN K. Are human milk polyunsaturated fatty acids (PUFA) related to atopy in the mother and her child? *Allergy* 2001;56:587-92.

DUCHEN K, YU G, BJÖRKSTÉN B. Atopic sensitization during the first year of life in relation to long chain polyunsaturated fatty acids levels in human milk. *Pediatr Res* 1998;44:478-84.

DUPONT J, DOWD MK. Icosaenoid synthesis as a functional measurement of essential fatty acid requirement. *J Am Col Nutr.* 1990; 9:272-6.

DUTTA-ROY AK, LEISHMAN DJ, GORDON MJ, CAMPBELL FM, DUTHIE GG: Identification of a low molecular mass (14.2KDa) alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of rat liver and heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196(3): 1108-1112.

EDITORIAL. *The Lancet* 1995; 345, 8955: 933-935.

EGAN H, GOULDING R, ROBURN J, TATTON JOG. Organochlorine pesticide residues in human fat and human milk. *Br Med J.* 1965; 2:66.

EICHELE G: Retinoids in embryonic development. *Ann NY Acad Sci* 1992; 678: 22-36.

EJOBI F, KANJA LW, KYULE MN; NYEKO J, OPUDA-ASIBO J. Some factors related to sum-DDT levels in Uganda mothers' breast milk. *Public Health* 1998; 112(6):425-427.

ERIKSSON P. Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology* 1997; 18(3):719-726.

ERIN AN, SPIRIN NN, TABIDZE LV, KAGAN VE: Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids. A hypothetical mechanism of stabilization of biomembranes by vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1984; 774: 96-102.

ERIN AN, SKRYPIN W, KAGAN VE: Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids. Nature of complexes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 815: 209-214.

ERNEY RM, MALONE WT, SKELDING MB, MARCON AA, KLEMAN-LEYER KM, O'RYAN ML, RUIZ-PALACIOS G, HILTY MD, PICKERING LK, PRIETO PA: Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 Feb;30(2):181-92.

ESPGHAN COMMITTEE ON NUTRITION. Comments on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr Scand* 1991;80:887-96.

ESPGHAN COMMITTEE ON NUTRITION. Medical Position Paper: Comment on the vitamin E content in infant formulas, follow-on-formulas, and formulas for low birth weight infants. *JPGN* 1998;26:351-2.

ESTERBAUER H, GEBICKI J, PUHL H, JURGENS G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 341-390.

EURONUT SENECA INVESTIGATOR: Intake of vitamins and minerals. *Eur J Clin Nutr* 1991; 45(3): 121-138.

EVANS HM, BISHOP KS: On the existence of an hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 1922; 56: 650-651.

EVANS HM, EMERSON OH, EMERSON GA: The isolation from wheat germ oil of alcohol, alpha-tocopherol, having the properties of vitamin E. *J Biol Chem* 1936; 113: 319-332.

FAO/WHO EXPERT CONSULTATION: Requirements of vitamin A, Iron, Folate and Vitamin B12. *FAO Food and Nutrition Report Serie 41*. Rome. 1988.

FARQUHARSON J, COCK F, PATRICK WA y col. Infant cerebral cortex phospholipid fatty acid composition and diet. *Lancet* 1992; 340:810-13.

FARQUHARSON J. Infant cerebral cortex and dietary fatty acids. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48:S24-S26.

FARQUHARSON J, JAMIESON EC, ABBASI KA y col. Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch Dis Child* 1995; 72:198-203.

FARRELL PM, ZACHMAN RD, GUTCHER GR: Fat soluble vitamins A, E and K in the premature infant. En: TSANG R (ed): *Vitamin and mineral requirements in preterm infants*. New York. Ed. Marcel Dekker 1985; 63-98.

FARUQUI R, DE LA MOTTE C, DI CORLETO PE: Alpha-tocopherol inhibits agonist-induced monocytic cell adhesion to cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 592-600.

FEELEY RM, EITENMILLER RR, JONES JB Jr. y col. Copper, iron and zinc contents of human milk at early stages of lactation. *Am J Clin Nutr*. 1983; 37:443-448.

FERNANDEZ-BAÑARES F, GINES JJ, CABRE E, ABAD-LACRUZ A, ESTEVE-COMAS M, GONZALEZ-HUIX F, GASULL MA: Factors associated with low values of biochemical vitamin parameters in healthy subjects. *Int J Vit Nutr Res* 1993; 63: 68-74.

FERNHLOLZ E: On the constitution of alpha-tocopherol. *J Am Chem Soc* 1938; 60: 700-705.

FIDLER N, SALOBIR K, STIBILJ V: Fatty acid composition of human milk in different regions of Slovenia. *Ann Nutr Metab* 2000;44(5-6):187-93.

FEX G, JOHANNESSON G: Studies of the spontaneous transfer of retinol from the retinol:retinol-binding protein complex to unilamellar liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1987; 901: 255-264.

FINLEY DA, LÖNNERDAL B, DEWEY KG y col. Breast milk composition: fat content and fatty acid composition in vegetarians and non-vegetarians. *Am J Clin Nutr*. 1985; 41:787-800.

FILER LJ, RUMERY RE, MASON KE: Specific unsaturated fatty acids in the production of acid-fast pigment in the vitamin E deficient rat and the protective action of tocopherol. In: *Transactions of the First Conference on Biological Antioxidants*. New York: Josiah Macy, Jr Foundation 1946; 67-76.

FLY AD, UHLIN KL, WALLACE JP. Major mineral concentrations in human milk do not change after maximal exercise testing. *Am J Clin Nutr*. 1998; 68(2):345-349.

FORMAN SE, DURETAKI AJ, COHEN MV, OLOFSON RA. Conformational equilibria in cyclic sulfites and sulfates. The configurations of the two isomeric thiodans. *J Org Chem*. 1965; 30:169-175.

FRAGA CG, ZAMORA R, TAPPEL AR: Damage to protein synthesis concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices: effect of halogenated compounds: peroxides and vitamin E. *Arch Biochem Biophys* 1989; 270: 84-91.

FREI BB, AMES BN: Relative importance of vitamin E in antiperoxidative defenses in human blood plasma and low-density lipoprotein. En: *Vitamin E in Health and Disease*. Packer L y Fuchs J, eds. Marcel Dekker: New York, N.Y 1993; pp: 131-139.

FRIEDMAN Z, DANON A, LAMBERTH EK. Cord blood fatty acids composition in infants and in their mothers during the third trimester,. *J Pediatr*. 1978; 92: 461-466.

FRIEDMAN Z, SEYBERTH H, LAMBERTH EK y col. Decreased prostaglandin E turnover in infants with essential fatty acid deficiency. *Pediatr Res* 1978; 12:711-4.

FRIES A. y col. *Jour Of Agr and Food Chem*. 1969; 17:861.

FRITSMA GA: Vitamin E and autoxidation. *Am J Med Tech* 1983; 49: 453-456.

FROLIK CA: Metabolism of retinoids. In: *The Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds): The retinoids*. Orlando: Academic Press. Vol. 2. 1984; 2: pp.177-208.

FUKUZAWA K, IKETABA W, SOHMI K: Location, antioxidant and recycling dynamics of alpha-tocopherol in liposome membranes. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1993; 39: 9-22.

GALLI C, WHITE HB, PAOLETI R. Brain lipid modifications induced by essential fatty acid deficiency in growing male and female rats. *J Neurochem* 1970; 17:347-55.

GALLI C, TRZECIAK HI, PAOLETTI R. Effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of brain ethanolamine phosphoglyceride: reciprocal replacement of n6 and n3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Acta* 1971; 248:449-54.

GALLO-TORRES HE: Obligatory role of bile for the intestinal

absorption of vitamin E. *Lipids* 1970; 5: 379-384.

GALLO-TORRES HE, WEBER F, WISS O: The effect of different dietary lipids in the lymphatic appearance of vitamin E. 1971. *Int J Vitam Nutr. Res* 1971; 41: 504-515.

GARCIA-FERNANDEZ AJ, BAYOUMI AE, PEREZ-PERTEJO Y, ROMERO D, ORDONEZ C, REGUERA RM, BALANA-FOUCE R, ORDONEZ D. Changes in glutathione-redox balance induced by hexachlorocyclohexane and lindane in CHO-K1 cells. *Xenobiotica*. 2002 Nov;32(11):1007-16.

GARCIA-FUENTES E, GIL-VILLARINO A, ZAFRA MF, GARCIA-PEREGRIN E. Differential changes in the fatty acid composition of the main lipid classes of chick plasma induced by dietary coconut oil. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002 Oct;133(2):269-75.

GENZEL-BOROVICZENY O, WAHLE J, KOLETZKO B. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *Eur J Pediatr* 1997;156(2):142-7.

GERHART JM, HONG JS, TILSON HA. Studies on the mechanism of chlordecone-induced tremor in rats. *Neurotoxicology* 1985; 6:211-230.

GERLACH TH, ZILE MH: Metabolism and secretion of retinol transport complex in acute renal failure. *J Lipid Res* 1991; 32: 515-520.

GERSTER H: Vitamin A- Functions, dietary requirements and safety in humans. *Internat J Vit Res* 1997; 67: 71-90.

GIASUDDIN ASM, DIPLOCK AT: The influence of vitamin E and membrane lipids of mouse fibroblasts in culture. *Arch Biochem Biophys* 1981; 210: 348-362.

GIBSON RA, NEUMAN MA, MAKRIDES M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. *European Journal of Clinical Nutrition* 1997; 51:578-584.

GIOVANNINI M, RIVA E, AGOSTONI C. Fatty acids in pediatric nutrition. *Pediatr Clin N Am* 1995;42:861-77.

GIOVANNINI M, RIVA E, AGOSTONI C. The role of dietary PUFA during the first two years of life. *Early Hum Dev.* 1997a (in press)

GIOVANNINI M, RIVA E, TROJANS S, BANDERALI G, BRUZZESE MG, AGOSTONI C: Long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) status and developmental scores: results of a 24-month follow up in a pediatric population fed different diets in infancy. In: Abstracts book of the 16th International Congress of Nutrition. Montreal (Canada). Julio-Agosto, 1997 b; PW2.1:42.

GJOENT, BJERKELUND T, BLOMHOFF HK, NORUM KR, BERG T, BLOMHOFF R: Liver takes up retinol-binding protein from plasma. *J Biol Chem* 1987; 262: 10926-10930.

GLADEN BC, ROGAN WJ, HARDY P y col. Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene trans-placentally and through human milk. *J Pediatr.* 1988; 113:991-995.

GLOSSER JW, MURPHY FA, OSBURN BI. Ensuring food safety requires national effort. *California Agric.* 1994; 48:2.

GOLDING J. Unnatural constituents of breast milk-medication, lifestyle, pollutants, viruses. *Early Hum Dev.* 1997; 49 Suppl:S29-43.

GONZALEZ-CORBELLA MJ, LLOBERAS-BLANCH N, CASTELLOTE-BARGALLO AI, LÓPEZ-SABATER MC, RIVERO-URGELL M: Determination of α -tocopherol in plasma and erythrocytes by high-performance liquid chromatography. *J Chromat B* 1994; 660: 395-400.

GOODMAN DS, BLANER WS: Biosynthesis, absorption and hepatic metabolism of retinol. In: Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS (eds): *The Retinoids*. Orlando, Florida. Academic Press. Vol. 2; 1984: pp. 1-39.

GOODMAN DS: Vitamin A metabolism and the liver, in the liver, biology and pathology, 2nd Ed. Arias, I. M. y col. Eds. Raven Press, Nueva York. 1988; 467-474.

GORALCZYK K, LUDWICKI JK, STRUCINSKI P, CZAJA K. *Rocz Panstw Zakl Hig.* Levels of organochlorine insecticides in citrus fruits in 1996-1997. 1999; 50(1):25-31.

GREEN MH, UHL L, GREEN JB: A multicompartmental model of vitamin A kinetics in rats with marginal liver vitamin A stores. *J Lipid Res* 1985; 26: 806-818.

GREEN MH, GREEN JB: Multicompartmental analysis of whole body retinol dynamics in vitamin A-sufficient rats. *Fed Proc* 1987a; 46: 1011.

GREEN MH, GREEN JB, LEWIS KC: Variation in retinol utilization rate with vitamin A status in the rat. *J Nutr* 1987b; 117: 694-703.

GREENWOOD C. The role of diet in modulating brain metabolism and behavior. *Bol Asoc Med P R.* 1990 Jun;82(6):273-5.

HAGLUND O, LUOSTARINEN R, WALLIN R, WIBELL L, SALDEEN T. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *Journal Nutrition* 1991; 121:165-169.

HALLEGUE D, BEN RHOUMA K, KRICHAH R, SAKLY M. Dieldrin initiates apoptosis in rat thymocytes. *Indian J Exp Biol.* 2002 Oct;40(10):1147-50.

HAMOSH M, SALEM N JR: Long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biol Neonate* 1998;74(2):106-20.

HANSEN HS, JENSEN B: Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinic acid and α -linolenate. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 834:357-363.

HANSEN HS. *Linolenic acid: essential fatty acid and eicosanoid precursor* (Ph D. Thesis). University of Copenhagen. Copenhagen. Denmark 1989.

HARDING LE HARRIS ML STEPHEN CR ELLIOT JE. Reproductive and morphological condition of wild mink (*Mustela vison*) and river

otters (*Lutra canadensis*) in relation to chlorinated hydrocarbon contamination. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(2):141-147.

HARGRAVE BT; VASS WP; ERICKSON PE; FOWLER BR. Distribution of chlorinated hydrocarbon pesticides and PCBs, in the Arctic Ocean. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci.* 1989; 1644,224.

HARRIS CA, WOOLRIDGE MW, HAY AW. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticide residues to breastmilk. *Chemosphere* 2001 Apr;43(2):243-56.

HARRIS WS, CONNOR WE, LINDSEY S. Will dietary omega-3 fatty acids change the composition of human milk?. *Am J of Clin Nutr.* 1984; 40:780-785.

HARRISON G, GRAVER D, VARGAS M y col. Growth and adiposity of term infants fed whey-predominant or casein-predominant formulas or human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1987; 6:739-747.

HARZER G, HAUG M: Dependency of human milk lipids on length of the lactation period, time of day, nursing and maternal diet. *Z Ernahrungswiss* 1984 Jun;23(2):113-25.

HAYAT L, AL-SUGHAYER MA, AFZAL M: Fatty acid composition of human milk in Kuwaiti mothers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1999 Nov;124(3):261-7.

HELGERUD P, PETERSEN LB, NORUM KR: Acyl CoA: retinyl acyltransferase in rat small intestine: its activity and some properties of the enzymatic reaction. *J Lipid Res* 1982; 23: 609-618.

HELGERUD P, PETERSEN LB, NORUM KR: Retinol esterification by microsomes from the mucosa of human small intestine. *J Clin Invest* 1983; 71: 747-753.

HELLAND IB, SAAREM K, SAUGSTAD OD, DREVON CA: Fatty acid composition in maternal milk and plasma during supplementation with cod liver oil. *Eur J Clin Nutr* 1998 Nov;52(11):839-45

HELLER J: Interactions of plasma retinol-binding protein with its receptor. Specific binding of bovine and human retinol-binding protein

to pigment epithelium cells from bovine eyes. *J Biol Chem* 1975; 250: 3613-3619.

HENDRIKS HFJ, ELHANANY E, BROUWER A, DE LEEUW AM, KNOOK DL: Uptake and processing of (³H)retinoids in rat liver studied by electron microscopic autoradiography. *Hepatology* 1988; 8: 276-285.

HERBET J, CAVALLARO T, MARTONE R: The distribution of retinol-binding protein and its mRNA in the rat eye. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1991; 32: 302-309.

HERBST AL, ANDERSON D. Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix secondary to intrauterine exposure to diethylstilbestrol. *Sem Surg Oncol*. 1991; 6:343-346.

HERCBERG S, PREZIOSI P, GALAN P, DEVANLAY M, KELLER H, BOURGEOIS C: Vitamin status of a healthy French population; dietary intakes and biochemical markers. *Int J Vit Nutr Res* 1994 ; 64: 220-232.

HERNELL G. The requirements and utilization of dietary fatty acids in the newborn infant. *Acta Paediatr Scand* 1990;365 (suppl):20-7.

HERRERA E, CASTRO M, LASUNCION MA, ENTRALA A: Metabolismo de la vitamina A y su relación con las lipoproteínas circulantes. *Nutrición clínica* 1989; 9 (5): 165-177.

HESEKER H, KOHLMEIER M, SCHNEIDER R, SPEITLING A, KUBLER W: Vitaminversorgung Erwachsener in der Bundesrepublik Deutschland. *Ernährungs-Umschau* 1991; 38: 227-233.

HEYMAN RA, MANGELSDORF DJ, DYCK JA, STEIN RB, EICHELE G: 9-cis- retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992; 68: 1-20.

HOLLANDER D, RIM E, MURALIDHARA KH: Mechanism and site of small intestinal absorption of alpha-tocopherol in the rat. *Gastroenterology* 1975; 68: 1492-1499.

HOLLANDER D: intestinal absorption of vitamins A, E, D and K. *J Lab Clin Med* 1981; 97; 449-462.

HONG CH-S, BUSH B, XIAO J. Isolation and determination of mono-ortho substituted PCBs (coplanar PCBs) in human milk by HPLC porous graphitic carbon and GC/ECD. *Chemosphere* 1992; 24:465-473.

HORINAKA M, MUROHISA T, TATEO K, HARADA T: Protection of cellular alpha-tocopherol by intracellular glutathione in human erythrocytes. *Dokkyo J Med Sci* 1992; 19: 75-85.

HORWITT MK, HARVEY CC, DAHM CH, SEARCY MT: Relationship between tocopherol and serum lipid levels for determination of nutritional adequacy. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 203: 223-236.

HORWITT MK, ELLIOT WH, KANJANANGGULPAN P, FITCH CD: Serum concentrations of alpha-tocopherol after ingestion of various vitamin E preparations. *Am J Clin Nutr* 1984; 40: 240-245.

HU Y, KUPFER D. Metabolism of the endocrine disruptor pesticide-methoxychlor by human P450s: pathways involving a novel catechol metabolite. *Drug Metab Dispos* 2002 Sep;30(9):1035-42.

HURA C, LEANCA M, RUSU L, HURA BA. Risk assessment of pollution with pesticides in food in the Eastern Romania area (1996-1997). *Toxicol Lett.* 1999; 107(1-3):103-107.

HUSSEIN L, DRAR A, HOREYAH AL. Lipid and retinol contents in the milk of egyptian mothers with normal and sick infants. *Int J Vitam Nutr Res* 1987;57:3-11.

INNIS SM, KUHNLEIN HV: Long-chain n-3 fatty acids in breast milk of Inuit women consuming traditional foods. *Early Hum Dev* 1998 Dec;18(2-3):185-9.

INNIS SM. Human milk and formula fatty acids. *J Pediatr.* 1992; 120:S56-S61.

INNIS SM. Tissue omega6 and omega3 fatty acid relationships during differing intakes of saturated, monounsaturated, omega6 and omega3 fatty acids from breast milk and formulae in the newborn. In: Sinclair Am, Gibson (eds). *Proceedings of Third International Congress on Essential Fatty Acids in Eicosanoids*. Champaign 11, Am Oil Chemists Society. 1993:183-91.

INNIS SM: Dietary fatty acids and trans, and N-6 and 3 fatty acids in matched maternal blood, breast milk and infant blood. In: Abstracts book of the 16th International Congress of Nutrition. Montreal (Canada). Julio-Agosto, 1997; PW7.1: 56.

ISCAN M, COBAN T, COK I, BULBUL D, EKE BC, BURGAZ S. The organochlorine pesticide residues and antioxidant enzyme activities in human breast tumors: is there any association? *Breast Cancer Res Treat* 2002 Mar;72(2):173-82.

ISHIMURA R, OHMURA M, MIYABARA Y, OHSAKO S, AOKI Y, NISHIMURA N, NOHARA K, SONE H, YONEMOTO J, TOHYAMA C. Abrupton of placental maturation by mid-pregnant exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat. *Toxicologist* 2000;54:135-6.

ISLER O: Developments in the field of vitamins. *Experientia* 1970; 26(3). 225-240.

ITO Y, OCHIAI J, SASAKI R, SUZULI S, KASUHARA Y, MORIMITSU Y: Serum concentrations of carotenoids, retinol, and α -tocopherol in healthy persons determined by high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1990; 194: 131-144.

IZQUIERDO A, VILADIU P, BORRAS J, GALCERAN J, BORRAS JM, DORCA J, VAYREDA J, MORENO V. The risk of breast cancer in Catalonia. *Med Clin (Barc)*.1996; 107(11):410-13.

JAGA K, DHARMANI C. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. *Int J Occup Med Environ Health* 2003;16(1):7-20.

JENSEN AA. Polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorodibenzo-p-dioxins (PCDD) and polychlorodibenzofurans (PCDF) in human milk, blood, and adipose tissue. *Sci Total Environ*. 1987; 64:259-293.

JENSEN RG, FERRIS AM, LAMMI-KEEFE CJ y col. Hypocholesterolemic human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1990; 10:148-150.

JENSEN RG, LAMMI-KEEFE CJ, HENDERSON RA, BUSH VJ, FERRIS AM: Effect of dietary intake of n-6 and n-3 fatty acids on the

fatty acid composition of human milk in North America. *J Pediatr* 1992 Apr;120(4 Pt 2):S87-92.

JENSEN CL, MAUDE M, ANDERSON RE, HERID WC. Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. *Am J Clin Ntr* 2000;71:292S-299S.

JIMÉNEZ CRUZ A, CERVERA ROL P, BACARDI GASCON M. Tabla de composición de los alimentos. Sandoz Nutrición. Barcelona. 1990.

JIMÉNEZ-TORRES M: Análisis de pesticidas organoclorados en medios biológicos de madres lactantes y su relación con la dieta. Tesis Doctoral. Universidad de granada. 2000.

JOBLING S, REYNOLS T, WHITE R, PARKER M, SUMPTER J. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Envirom Health Perspect*. 1995; 103(6):582-587.

JORGENSEN MH, HERNELL O, LUND P, HOLMER G, MICHAELSEN KF. Visual acuity and erythrocyte docosahexaenoic acid status in breast-fed and formula-fed term infants during the first four months of life. *Lipids*. 1996 Jan;31(1):99-105.

KAGAN VE, SERBINOVA EA, FORTE T, SCITA G, PACKER L: Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1992; 33: 385-397

KALLIO JT, SALMENPERA L, SIIMOS MA y col. Exclusive breast feeding and weaning: effect on serum cholesterol and lipoprotein concentrations in infants during the first year of life. *Pediatrics* 1992; 89:663-666.

KALRA RL, KAUR H, SHARMA S, KAPOORSK, CHAKRABORTYSS, KSHIRASAGAR RB y col. DDT y HCH residues in dairy milk samples collected from different regions of India: a multicentre study. *Food Addit Contam*. 1999; 16(10):411-417.

KAMEYAMA T, OHHARA T, NAKASHIMA Y, NAITO Y, HUANG MZ, WATANABE S, KOBAYASHI T, OKUYAMA H, YAMADA K,

- NABESHIMA T. Effects of dietary vegetable oils on behavior and drug responses in mice. *Biol Pharm Bull.* 1996 Mar;19(3):400-4.
- KANAI M, RAZ A, GOODMAN DS: Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1968; 47: 2025-2044.
- KANKAANPÄÄ P, NURMELA K, ERKKLLA A, KALLIOMAKI M, HOLMBERG-MARTTILA D, SALMINEN S, ISOLAURI E. Polyunsaturated fatty acids in maternal diet, breast milk and serum lipid fatty acids of infants in relation to atopy. *Allergy* 2001;56:633-8.
- KANNAN K, TANABE S, GIESY JP, TATSUKAWA E. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in foodstuffs from Asian and oceanic countries. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1997; 152:1-55.
- KAPHALIA BS, TAKROO R, MEHROTRA S, NIGAM U, SETH TD. Organochlorine pesticides residues in different indian cereals, pulses, spices, vegetables, fruit, milk, butter, deshi ghee and edible oils. *J Assoc Off Anal Chem.* 1990; 73,4:509-512.
- KAPLOWITZ N, YOSHIDA H, KUHLINKAMP J, SLITSKY B, REN I, STOLZ A: Tocopherol-binding proteins of hepatic cytosol. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570: 85-93.
- KARP WB, ROBERTSON AF: Vitamin E in neonatology. *Adv Pediatr* 1986; 33: 127-147.
- KARRA MV, KIRKSEY A, GALAL O y col. Effect of short term oral zinc supplementation on the concentration of zinc in milk from American and Egyptian women. *Nutr Res.* 1989; 9:471-478.
- KASEKI H, KIM EY, WHISLER RL, CORNWELL DG: Effect of an oral dose of vitamin E on the vitamin E cholesterol content of tissue of the vitamin E-deficiency rat. *J Nutr* 1986; 116: 1631-1639.
- KELLY FJ, RODGER WHANDEL J, SMITH S, HALL MA. Time course of vitamin E repletion. Premature infant. *Br J Nutr.* 1990; 63:631-638.

KENNTNER N, KRONE O, OEHME G, HEIDECKE D, TATARUCH F. Organochlorine contaminants in body tissue of free-ranging white-tailed eagles from northern regions of Germany. *Environ Toxicol Chem.* 2003 Jul;22(7):1457-64.

KINSELLA JE, BROUGHTON KS, WHELAN IW. Dietary unsaturated fatty acids: interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *J Nutr Biochem.* 1990; 1: 123-41.

KITAGAWA M, NAKAGAWA S, MINO M: Influence on plasma lipids and adiposity on red blood cell tocopherol level. *Eur J Pediatr* 1983; 140, 238-243.

KNOWLES JA. Excretion of drugs in milk a review. *J Pediatr.* 1965 66:1068.

KOBAYASHI H, KANNO C, YAMAUCHI K. Identification of α , β and δ -tocopherols and their contents in human milk. *Biochim Biophys Acta* 1975;381:282-90.

KOLETZKO B. Zufuhr, stoffwechsel und biologische wirkungen trans isomerer fettsäuren in der perinatalzeit. *Die Narhung.* 1991; 35: 229.

KOLETZKO B. Trans fatty acids may impair biosynthesis of long chain polyunsaturates and growth in man. *Acta Paediatr.* 1992a; 81: 302-306.

KOLETZKO B. Complementary foods and the development of food allergy. *Pediatrics* 2000;106:1285.

KOLETZKO B, MÜLLER L: Cis and trans isomeric fatty acids in plasma lipids of newborn infants and their mothers. *Biol Neonate.* 1990; 57: 172-178.

KOLETZKO B, RODRIGUEZ-PALMERO M, DEMMELMAIR H, FIDLER N, JENSEN R, SAUERWALD T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev* 2001 Nov;65 Suppl:S3-S18.

KOLETZKO B, SCHMIDT E, BREMER HJ, HAUG M, HARZER G. Effects of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on the essential fatty acid status of the premature infants. *Eur J Pediatr.* 1989; 148: 669-675.

KOLETZKO B, THIEL I, ABIODUM PO. The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. *J Pediatr* 1992.;120(4 Pt 2):62-70.

KOSTNER GM, OETTL K, JAUHAINEN M, EHNHOLM C, ESTERBAUER H, DIEPLINGER H. Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J* 1995; 15: 305 (2): 659-667.

KRAMER TR. Relationship between vitamin A status and T lymphocyte responsiveness. *J Nutr Immunol* 1996;4:77-85.

KRAUTHACKER B. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human serum collected from the General population from Zagreb (1985-1990). *Bulletin of Environ Contam and Toxicol.* 1993; 50:8-1.

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* 1998; 37(1):27-32.

KREBS NF, REIDINGER CJ, HARTLEY S. y col. Zinc supplementation during lactation: Effects on maternal status and milk concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61:1030-1036.

KRIEGER TR, LOCH-CARUSO R. Antioxidants prevent gamma-hexachlorocyclohexane-induced inhibition of rat myometrial gap junctions and contractions *Biol Reprod* 2001 Feb;64(2):537-47.

KRISHNAN AV, STARHIS P, PERMUTH SF, TOKES L, FELDMAN D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol.* 1993; 132:2279-2286.

KROGER M. Insecticide residues in human milk. *J Pediatr.* 1972; 80:401.

KUHLENKAMP J, RONK M, YUSIN M, STOLZ A, KAPLOWITZ N: Identification and purification of a human liver cytosolic tocopherol binding protein. *Prot Expr Pur* 1993; 4: 382-389.

LAKSHMAN MR, CHIRTEL SJ, CHAMBERS LL, COUTLAKIS PJ. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on lipid synthesis and lipogenic enzymes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:62-6.

LAMMI-KEEFE C. Vitamins D and E in human milk. In: Jensen R.G., ed. *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press 1995; 706-717.

LARQUE E, ZAMORA S, GIL A: Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Hum Dev* 2001 Nov;65 Suppl:S31-41

LASKEY MA, PRETINCE A, HANRATTY LA, JARJOU LM, DIBBA B, BEAVAN SR, COLE TJ. Bone changes after 3 mo of lactation: influence of calcium intake, breast-milk output, and vitamin D-receptor genotype. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(4):685-692.

LATCHOUMYCANDANE C, CHITRA KC, MATHUR PP. The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats. *Reprod Toxicol* 2002 Mar-Apr;16(2):161-72.

LEBENTHAL E: *Textbook of Gastroenterology and Nutrition in infancy*. Raven Press New York 1982.

LEBOULANGER J: Las vitaminas. Ed. Servicio Científico Laboratorios Roche. Madrid 1981; 61-68.

LEHMAN J, MARSHALL MW, JUDD JT: Effects of two levels of linoleic acid and known amounts of tocopherol levels of plasma, RBC, and platelets of adult men. *Fed Proc* 1984; 43: A487.

LEHMANN J, RAO DD, CANARY JJ, JUDD JT: Vitamin E and relationships among tocopherols in human plasma, platelets, lymphocytes and red blood cells. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 470-474.

LEMONS JA, MAISELS MJ: Vitamina E ¿Cuanto es demasiado?. *Pediatrics* (ed. esp.) 1985; 20: 215-217.

LEO MA, LIEBER CS: New pathway for retinol metabolism in liver microsomes. *J Biol Chem* 1985; 260: 5228-5231.

LEPAGE G, ROY CC: Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J LIPID RES* 1986; 27: 114-20.

LET T, SONDERGAARD H: Biological activity of all-rac-alpha-tocopherol and RRR-alpha-tocopherol determined by three different rat bioassays. *Int J Vitam Nutr Res* 1983; 53: 297-311.

LEVIN AA, STURZENBECKER LJ, KAZNER S, BOSAKOWSKI T, HUSELTON C, et al: 9-cis-retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXRa. *Nature* 1992; 355: 359-361.

LEWIS KC, GREEN MH, UNDERWOOD BA: Vitamin A turnover in rats as influenced by vitamin A status. *J Nutr* 1981; 111: 1135-1144.

LEWIS KC, GREEN MH, GREEN JB, ZERCH LA: Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J Lipid Res* 1990; 31: 1535-1548.

LI F, ROSSIPAL E, IRGOLIC KJ: Determination of selenium in human milk by hydride cold-trapping atomic absorption spectrometry and calculation of daily selenium intake. *J Agric Food Chem* 1999 Aug;47(8):3265-8.

LIE E, BERNHOFT A, RIGET F, BELIKOV SE, BOLTUNOV AN, DEROCHER AE, GARNER GW, WIIG O, SKAARE JU. Geographical distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in polar bears (*Ursus maritimus*) in the Norwegian and Russian Arctic. *Sci Total Environ*. 2003 May 1;306(1-3):159-70.

LIETZ G, HENRY CJ, MULOKOZI G, MUGYABUSO JK, BALLART A, NDOSSI GD, LORRI W, TOMKINS A: Comparison of the effects of supplemental red palm oil and sunflower oil on maternal vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 2001 Oct;74(4):501-9.

LINDER MC: Nutrición y metabolismo de las vitaminas. Vitamina E. En: LINDER MC (ed): Nutrición, aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos. EUNSA. Navarra 1985: 152-160.

LISTON J. Breastfeeding and the use of recreational drugs: alcohol, caffeine, nicotine and marijuana. *Breastfeed Rev*. 1998; 6(2):27-30.

LÓPEZ-CASTILLO L, TORRES-ARREOLA, L, TORRES-SÁNCHEZ L, ESPINOSA-TORRES F, JIMÉNEZ C, CEBRIÁN M,

WALISZEWSKI S, SALDATE O. Is DDT use public health problem in Mexico?. *Environ Health Perspect.* 1996; 104,6:91-96.

LUBRARO R, LUCIDI V, BELLI A, CARDILLE V, MANNARINO O, PANSERI C, STRAPPINI PM, CASTRO M, GIARDINI O: Assorbimento intestinale della vitamina E in bambini con atrofia della mucosa digiunale. *Minerv Pediatr* 1990; 42: 537-539.

LUOTAMO M, HESSO A, HÄMEILÄ M. Congener specific analysis of polychlorinated biphenyls in serum and adipose tissue. *Chemosphere* 1991; 23: 651-670.

LUUKKAINEN P, SALO MK, NIKKARI T. Changes in the fatty acid composition of preterm and term human milk from 1 week to 6 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18(3):355-60.

MacDONALD PN, ONG DE: Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J Biol Chem* 1988; 263: 12478-12482.

MACHLIN LJ: Vitamin E: A comprehensive treatise. Marcel Dekker. New York 1980.

MACLEAN WC, GRAHAM GG. Vegetarianism in children. *Am J Clin Nutr.* 1990; 51: 209-211.

MAGUIRE JL, KAGAN VE, PACKER L: Electron transport between cytochrome a and alpha-tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 190-197.

MAISEY S, LOUGHRIDGE J, SOUTHON S, FULCHER R: Variation in food group and nutrient intake with day of the week in an elderly population. *Br J Nutr* 1995; 73: 359-373.

MAKOVER A, SOPRANO DR, WYATT ML, GOODMAN DS: Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and in perinephric fat tissue. *J Lipid Res* 1989; 30: 171-180.

MAKRIDES M, SIMMER K, GOGGIN M, GIBSON RA: Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy, term infants. *Ped Res.* 1993; 33: 425-427.

MAKRIDES M, NEUMANN MA, BYARD R W, SIMMER K, GIBSON RA: Fatty acid composition of brain, retina and erythrocytes in breast- and formula- red infants. *Am J Clin Nutr.* 1994; 60: 189-194.

MAKRIDES M, NEUMANN M, SIMMER K, PATER J, GIBSON R: Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? *Lancet.* 1995; 345: 1463-1468.

MAKRIDES M, NEUMANN MA, GIBSON RA: Effect of maternal docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on breast milk composition. *Eur J Clin Nutr* 1996 Jun;50(6):352-7.

MANGELSDORF DJ, UMESONO K, KLIEWER SA, BORGMEYER U, ONG ES, EVANS RM: A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 1991; 66: 555-561.

MANSON WG, WEAVER WG. Fat digestion in the neonate. *Arch Dis Chil* 1997;76:F206-11.

MARTIN A, FOXALL T, BLUMBERG JB, MEYDANI M: Vitamin E inhibits low-density lipoproteins-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 429-436.

MARTIN-RUBI JC, YELAMOS-RODRÍGUEZ, LAYNEZ-BRETONES F. Poisoning casused by organophosphate insecticides. Suty of 506 cases. *Rev Clin Esp.* 1996; 196:145-149.

MARTINEZ M. Developmental profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain of normal infants and patients with peroxisomal diseases: severe deficiency of docohexaenoic acid in Zelweger's and Pseudo-Zellweger's syndromes. *World Rev Nutr Diet* 1991; 66:87-102.

MARTINEZ M: Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr.* 1992; 120: SI29-138.

MARTINEZ MP, ANGULOR, POZO R, JODRAL M. Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. *Food Chem Toxicol.* 1997; 35:621-624.

MARTINEZ RM, ORTEGA RM, ANDRES P. Vitamin A concentration in maternal milk: the effect of intake and serum levels of vitamin A during the third trimester of pregnancy *Med Clin (Barc)*. 1997 Nov 1;109(15):573-6.

MASSEY JB: Kinetic of transfer of alpha-tocopherol between model and native plasma lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1984; 793: 387-392.

MATESIC DF, BLOMMEL ML, SUNMAN JA, CUTLER SJ, CUTLER HG. Prevention of organochlorine-induced inhibition of gap junctional communication by chaetoglobosin K in astrocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2001;17(6):395-408.

MATHIAS PM, HARRIES JT, PETERS TS, MULLER DPR: Studies on the in vivo absorption on micellar solutions of tocopherol and tocopheryl acetate in the rat: demonstration and partial characterization of a mucosal esterase localized to the endoplasmic reticulum of the enterocyte. *J Lip Res* 1981; 22: 829-837.

MATORRAS R, PERTEAGUDO L, SANJURJO P. Biochemical markers of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid intake during pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25:135-138.

MATSUDA Y, KAGAWA R, KUROKI H, KURATSUNE M, YOSHIMURA T, TAKI I, KUSUDAM, YAMASHITA F, HAYASHI M. Transfer of polychlorinated biphenyls from mother to fetuses and infants. *Food Cosmet Toxicol*. 1978; 16(6):543-546.

MATSUDA Y, KAGAWA R, TOKUDOME S, KURATSUNE M. Transfer of polychlorinated biphenyls to the fetuses and offspring of mice. *Food Cosmet Toxicol*. 1978; 16:79-86.

MATSUMURA F. Toxicology of insecticides. Plenum Press, New York. 1985.

MAY JM, QU ZC, MORROW JD: Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol in resealed human erythrocyte ghost. Transmembrane electron transfer and protection from lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1996; 271: 10577-10582.

MEISTER A: Commentary on the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1905-1915.

MINO M, KASUGAI O, NAGITA A: Relationship between red blood cell and liver tocopherol concentration after the administration and depletion of vitamin E. *Int J Vitam Nutr Res* 1985a; 55: 47-51.

MINO M, KITAGAWA M, NAKAGAWA S: Red blood cells tocopherol concentrations in a normal population of Japanese children and premature infants in relation to the assessment of vitamin E status. *Am J Clin Nutr* 1985b; 41: 631-638.

MINO M: Vitamin status in pregnancy and newborn infant with respect to red blood cell tocopherol. En: Berger H ed. *Vitamin and minerals in pregnancy and lactation*. Raven Press: New York 1989; pp 59-60.

MITTENDORF R. Teratogen Update: Carcinogenesis and Teratogenesis Associated with Exposure to Diethylstilbestrol (DES) in Útero. *Teratology* 1995; 51:435-445.

MOHRHAUER H, HOLMAN RT. Alteration of the fatty acid composition of brain lipids by varying levels of dietary essential fatty acids. *J Neurochem* 1963; 10:523-30.

MOLINA JA, BAYES R: Déficits de vitamina E en recién nacidos lactantes. En: Cruz M y Jiménez R (eds): *Aspectos actuales de la Pediatría*. Barcelona. Ed Romargraf 1986; pp: 131-144.

MOLINA CARRASCO. Residuos de plaguicidas organoclorados en tejidos grasos de la población no expuesta de la región de Murcia. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. 1994.

MOON S, KIM J: Iodine content of human milk and dietary iodine intake of Korean lactating mothers. *Int J Food Sci Nutr* 1999 May;50(3):165-71.

MORERA S, CASTELLOTE A, CAMPOY C, LÓPEZ MC: Triacylglycerol composition in calostrum, transicional and mature human milk. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:878-882.

MORGADO N, SANHUEZA J, NIETO S, GALLEGUILLOS A, GARRIDO A, V ALENZUELA A: Effect of the degree of

hydrogenation of fish oil on the trans fatty acid content and on the enzymatic activity of rat hepatic microsomes. In: Abstracts book of the 16th International Congress of Nutrition. Montreal (Canada). Julio-Agosto, 1997; PM166: 114.

MORGAN BLG, ROSSO P: Nutrition and brain development. Quick reference to clinical nutrition. 2nd Edition. Halpem SL (ed.) Lippincott Company. 1987; pp. 413-419.

MORI TA, VANDONGEN R, MASAREI JR, STANTON KG, DUNBAR D: Dietary fish oils increase serum lipids in insulin-dependent diabetics compared with healthy controls. *Metabolism* 1989; 38(5): 404-409.

MORINOBU T, TAMAI H, TANABE T, MURATA T, MANAGO M, MINO M, HIRAHARA F: Plasma α -tocopherol, β -carotene, retinol levels in the institutionalized elderly individuals and in young adults. *Int J Vit Nutr Res* 1994 ; 64 :104-108.

MORISOT C: La vitamine E...aujourd'hui. *Med Infant* 1984; 6: 545-557.

MORIWAKI H, BLANER WS, PIANTEDOSI R, GOODMAN DS: Effect of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cell lipid droplets. *J Lipid Res* 1988; 29: 1523-1534.

MOYA M, JUSTE M, CORTES E, CARRATALA F: Fatty acid composition of mature breast milk according to the mothers diet during pregnancy. *Adv Exp Med Biol* 2000;478:405-6.

MUHILAL H, GLOVER J: The affinity of retinol and its analogues for retinol-binding protein. 1975; *Biochem Soc Trans* 1975; 3: 744-746.

MULLER DPR, HARRIES JT, LLOYD JK: The relative importance of the factors involved in the absorption of vitamin E in children. *Gut* 1974; 15: 966-971.

MULLER DPR, MANNING JA, MATHIAS PM, HARRIES JT: Studies on the hydrolysis of tocopherol esters. *Int J Vitam Nutr Res* 1976; 46: 207-210.

NAKAGAWA R, HIRAKAWA H, IIDA T, MATSUEDA T, NAGAYAMA J. Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J AOAC Int.* 1999; 82(3):716-724.

NAKATA H, KAWAZOE M, ARIZONO K, ABE S, KITANO T, SHIMADA H, LI W, DING X. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl residues in foodstuffs and human tissues from china: status of contamination, historical trend, and human dietary exposure. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2002 Nov;43(4):473-80.

NALECZ K, NALECZ M, AZZI A: Isolation of tocopherol-binding protein from the cytosol of smooth muscle A7R5 cells. *Eur J Biochem* 1992; 209: 37-42.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Pesticides in the diets of infants and children. Washington, DC: National Academy Press, 1993.

NEURINGER M, CONNOR WE: n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. *Nutr Rev.* 1986; 44: 285-294.

NEURINGER M. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jan;71(1 Suppl):256S-67S.

NEWMAN V. Vitamin A and breast-feeding: a comparison of data from developed and developing countries. *Food Nutr Bull* 1994;15:161-76.

NEWSOME WH, RYAN J.J. Toxaphene and other chlorinated compounds in human milk from northern and southern Canada: a comparison. *Chemosphere* 1999; 39(3):519-526.

NIKI E, KAWAKAMI A, YAMAMOTO Y, KAMIYAY: Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidilcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* 1985; 58: 1971-1975.

NIKI, NOGUCHI N, GOTOH N: Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 313-317.

NOREN K, MEIRONYTE D. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* 2000; 40(9-11):1111-1123.

NOY N, BLANER WS: Interactions of retinol with binding proteins- studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein. *Biochemistry* 1991; 30: 6380-6386.

NRC National Research Council: Commission on Life Sciences, Food and Nutrition Board. Recommended dietary allowances. 10th ed. Washington, DC. National Academy Press 1989.

NUNES MV, TAJARA EH. Delayed effects of organochlorine pesticides in man. *Rev Saude Publica* 1998; 32: 372-382.

NYMAN M, BERGKNUT M, FANT ML, RAUNIO H, JESTOI M, BENGS C, MURK A, KOISTINEN J, BACKMAN C, PELKONEN O, TYSKLIND M, HIRVI T, HELLE E. Contaminant exposure and effects in Baltic ringed and grey seals as assessed by biomarkers. *Mar Environ Res* 2003 Feb;55(1):73-99.

ODDY WH, HOLT PD, SLY PD, READ AW, LANDAU LI, STANLEY FJ, KENDALL GE, BURTON PR. Association between breast feeding and asthma in 6 y old children: findings of prospective birth cohort study. *Br Med J* 1999;319:815-9.

OGIHARA T, MIKI M, KITAGAWA M, MINO M: Distribution of tocopherol among human plasma lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1988; 174: 299-305.

OHTSUDA Y, YAMISHIRO Y SHIMIZU T, NAGATA S, IGARASHI J, SHINOHARA K OGUCHI S, YABUTA K. Reducing cell membrane n-6 fatty acids attenuates mucosal damage in food-sensitive enteropathy in mice. *Pediatr Res* 1997;42:835-9.

OKANIWA Y, YUASA S, YAMAMOTO N, WATANABE S, KOBAYASHI T, OKUYAMA H, NOMURA M, NAGATA Y. A high linoleate and a high alpha-linolenate diet induced changes in learning behavior of rats. Effects of a shift in diets and reversal of training stimuli. *Biol Pharm Bull.* 1996 Apr;19(4):536-40.

OLAFSDOTTIR AS, WAGNER KH, THORSDDOTTIR I, ELMADFA I: Fat-soluble vitamins in the maternal diet, influence of cod liver oil supplementation and impact of the maternal diet on human milk composition. *Ann Nutr Metab* 2001;45(6):265-72.

OLCOTT HS, MATTILL HA: The unsaponifiable lipids of lettuce. II Fractionation. *J Biol Chem* 1931; 93: 59-64.

OLEA N, MOLINA MJ, GARCÍA-MARTIN M., y cols. Modern agricultural practices: The human price. *Comments Toxicology* 1995; 5:455-4474.

OLIVERO J, BEZDECNY SA, GANEY PE. A molecular motif required for the activation of rat neutrophil phospholipase A(2) by organochlorine compounds. *Chem Res Toxicol* 2002 Feb;15(2):153-9.

OLMEDILLA B, GRANADO R, GIL-MARTINEZ E, BLANCO I, ROJAS-HIDALGO E: Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem* 1997; 43(6): 1066-1071.

OLSON JA: Vitamin A. In: Machlin L (ed): *The Handbook of vitamins*. Marcel Dekker. New York 1984.

OMAYE ST, CHOW FI: Distribution of vitamin A and vitamin E in blood and liver of rats depleted of vitamin A or vitamin E. *Lipids* 1986; 21: 465-469.

OMS. Chemical contaminants in foods in relation to human health. *Residues Review*, 1963; 4:3-81.

OMS. Assesment of the health risk of dioxins: Re-evaluation of the TolerableDaily Intake (TDI). WHO European Centre for Environment and Health-International Programme on Chemical Safety. 1999.

OMS. WHO/FSF/FOS/1997; 7. Informe de la Comisión al Consejo. Bruselas 01-03-2000.

ONG DE, CHYTIL F: Presence of novel retinoid acid-binding proteins in the lumen of rat epididymis. *Arch Biochem Biophys* 1988; 267: 474-478.

ORTEGA RM, LOPEZ-SOBALER AM, QUINTAS ME, MARTINEZ RM, ANDRES P: The influence of smoking on vitamin C status during the third trimester of pregnancy and on vitamin C levels in maternal milk. *J Am Coll Nutr* 1998a Aug;17(4):379-84

ORTEGA RM, LÓPEZ-SOBALER AM, MARTÍNEZ RM, ANDRÉS P, QUINTAS ME. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. *The American Journal Clinical of Nutrition* 1998b; 68:662-667.

ORTEGA RM, LÓPEZ-SOBATER AM, ANDRES P, MARTÍNEZ RM, QUINTAS ME. Supplementation with iron and folates during gestation: influence on zinc status in the mother and on zinc content in the maternal milk. *Med Clin*. 1998c; 111(8):281-285.

OTTONELLO S, PETRUCCO S, MARAINI G: Vitamin A uptake from retinol-binding protein in a cell-free system from pigment epithelial cells of bovine retina. *J Biol Chem* 1987; 262: 3975-3981.

OWEN CG, WHINCUP PH, ODOKI K, GILG JA, COOK DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*. 2002 Sep;110(3):597-608.

PACKER JE, SLATER TF, WILLSON RL: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; 278: 737-738.

PACKER L: Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 105S.

PACKER L: Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 271-276.

PACKER L: The vitamin E antioxidant cycle in health and disease. En: *New developments in lipid-protein interactions and receptors function*. NATO ASI Ser. Ser A 1993; 246: 297-308.

PARK Y, MCGUIRE MK, BEHR R, MCGUIRE MA, EVANS MA, SHULTZ TD: High-fat dairy product consumption increases delta 9c,11t-18:2 (rumenic acid) and total lipid concentrations of human milk. *Lipids* 1999 Jun;34(6):543-9

PARKER R. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J* 1996;10:542-51.

PATANDIN S, WEISGLAS-KUPERUS N, DE.RIDDER MAJ, KOOPMAN-ESSEBOOM C, VAN STAVEREN WA, VAN DER PAAUW CG, SAUER PJJ. Plasma polychlorinated biphenyl levels in dutch preschool children either breast-fed or formula-fed during infancy. *Am J Public Health* 1997; 87(10):1711-1714.

PATANDIN S, DAGNELEI PC, MULDER PGH, DE COUL EO, VAN DER PAAUW CG, WEISGLAS-KUPERUS N, SAUER PJJ. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: a comparasion between breast-feeding, Toddler, and long-term exposure. *Environ Health Persp.* 1999; 107(1):45-51.

PATTERSON DG, TODD GD, TURNER WE, MAGGIO V, ALEXANDER LR, NEEDHAM LL. Levels of non-ortho-substitud, mono and diortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo p-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue. *Environ Health Perspect.* 1994; Suppl. 102,1:195-204.

PAULOZZI LJ, ERICKSON JD, JACKSON RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* . 1997; 100:831-834.

PEARSON CK, BARNES MM: Absortion of tocopherols by small intestinal loops of the rat in vivo. *Int Z Vitaminforsch* 1970; 40: 19-22.

PELLETIER C, DOUCET E, IMBEAULT P, TREMBLAY A. Associations between weight loss-induced changes in plasma organochlorine concentrations, serum T(3) concentration, and resting metabolic rate. *Toxicol Sci* 2002 May;67(1):46-51.

PENTLAND AP, MORRISON AR, JACOBS SC, HRUZA LL, HEBERT JS, PACKER L: Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism via phospholipase inhibition. *J Biol Chem* 1992; 267: 15578-15584.

PICARD A, PALAVAN G, ROBERT S, PESANDO D, CIAPA B. Effect of organochlorine pesticides on maturation of starfish and mouse oocytes. *Toxicol Sci.* 2003 May;73(1):141-8. Epub 2003 Apr 15.

PICCIANO MF. Vitamins in milk. Watersoluble vitamins in human milk. En: *Handbook of milk composition.* Academic Press, San Diego 1995; 675-688.

PLIMMER R y col. Jour Of Agr and Food Chem. 1965; 13:461.

PODREKA S y col. The environmental contaminant DDE fails to influence outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas*. Environ Health Perspec. 1998; 106(4):185-188.

POLDER A, ODLAND JO, TKACHEV A, FOREID S, SAVINOVA TN, SKAARE JU. Geographic variation of chlorinated pesticides, toxaphenes and PCBs in human milk from sub-arctic and arctic locations in Russia. Sci Total Environ. 2003 May 1;306(1-3):179-95.

PONDER DL, INNIS SM, BENSON JD, SIEGMAN JS: Docosahexaenoic acid status of term infants red breast milk or infant formula containing soy oil or corn oil. Pediatr Res. 1992; 32: 683-688.

POTTER AR: Reducing vitamin A deficiency. B M J 1997 (February): 314-317.

POULIK MF, FARRAH D, MALEK GH, SHINNICK CJ, SMITHIES O: Low molecular weight urinary proteins. I. Partial amino acid sequences of the retinol-binding proteins of man and dog. Biochim Biophys Acta 1975; 412: 326-334.

PRENTICE A, JARJOU LMA, DRURY PJ y col. Breast milk fatty acids of rural Gambian mothers: Effects of diet and maternal parity. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1989; 8:486-490

PRENTICE A. Calcium requirements of breast-feeding mothers. MRC Dumm Nutrition Unir, Cambridge, UK. Nutr Rev. 1998; 56(4 Pt):124-127.

PUENTE-FRAGA JC, LOPEZ-APARICIO P, SENAR S, RECIO MN, PEREZ-ALBARSANZ, MA. Hexachlorocyclohexanes affect the arachidonic acid release from phosphatidylinositol but nor from other phospholipid classes in tubular cell cultures. Biosci Rep 1995 Aug;15(4):191-9.

PUTNAM JC, CARLSON SE, DEVOE PW, et al.: The effect of variation in dietary fatty acids on the fatty acid composition of erythrocyte phosphatidylcholine and phosphatidyl ethanolamine in human infant. Am J Clin Nutr. 1982; 36: 106-114.

QUINBY GE, ARMSTRONG JF, DURHAM WF. DDT in human milk. *Nature* 1965; 207:726.

RAMIREZ I, DESANTIAGO S, TOVAR AR, TORRES N: Amino acid intake during lactation and amino acids of plasma and human milk. *Adv Exp Med Biol* 2001;501:415-21.

RAMIREZ M, MALDONADO J, GARCIA JL, NARBONA E, GIL A: Plasma and red blood cell fatty acid composition in small for gestational age term infants fed human milk or formula. *Clin Nutr* 1998. 17: 177-183.

RANDOLPH RK, WINKLER KE, ROSS AC: Fatty acyl CoA-dependent and-independent retinol esterification by rat liver and lactating mammary gland microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 500-508.

RASK L, PETERSEN PA: In vitro uptake of vitamin A from the retinol-binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey's small intestine. *J Biol Chem* 1976; 251: 6360-6366.

RASK L, ANUNDI H, BOHME H, ERIKSSON U, RONNE H, SEGE K, PETERSEN PA: Structural and functional studies of vitamin A-binding proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 359: 79-90.

RATNAYAKE WM, CHEN ZY: Trans, n-3, and n-6 fatty acids in Canadian human milk. *Lipids* 1996 Mar;31 Suppl:S279-82.

RAUM E, SEIDLER A, SCHALAUD M, KNOLL A, WESSLING H, KURTZ K, SCHWARTZ FW, ROBBA BP. Contamination of human breast milk with organochlorine residues: a comparison between East and West Germany through sentinel practice network. *J Epidemiol Community Health* 1998; 52 Suppl 1:50S-55S.

REAL DECRETO 162/1991 de 8 de febrero, por el que se modifica el R.D. 3349/1983 (BOE nE40 de 15 de febrero de 1991).

REAL DECRETO 606/2003 de 23 de Mayo, por el que se modifica el R.D. 849/1986 (BOE n°135 de 6 de Junio de 2003).

RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 10th ed. National Academy Press, Washington 1989.

RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. National Academy Press, Washington 2002.

RIBAS-FITO N, CARDO E, SALA M, EULALIA DE MUGA M, MAZON C, VERDU A, KOGEVINAS M, GRIMALT JO, SUNYER J. Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics*. 2003 May;111(5 Pt 1):e580-5.

RITA P, REDDY PR, VENKATRAM RS. Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh. *Environmental Research* 1987; 44:1-5.

ROBERTS RB, KNIGHT ME: Pharmacology of vitamin E in the newborn. *Clin Perinatol* 1987; 14: 843-855.

ROCQUELIN G, TAPSOBA S, DOP MC, MBEMBA F, TRAISSAC P, MARTIN-PREVEL Y: Lipid content and essential fatty acid (EFA) composition of mature Congolese breast milk are influenced by mothers' nutritional status: impact on infants' EFA supply. *Eur J Clin Nutr* 1998 Mar;52(3):164-71

RODRIGUEZ M, KOLETZKO B, KUNZ C, JENSEN R. Nutritional and biochemical properties of human milk, part II. Lipids, micronutrients and active factors. *Clin Perinatol* 1999;26:335-59.

ROGAN WJ, GLADEN BJ. Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurotoxicol*. 1992; 13:27-36.

ROGAN WJ, GLADEN BC, McKINNEY JD y col. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects of maternal factors and previous lactation. *Am J Publ Hlth*. 1986; 76:172-177.

ROMERO D, VILLALBA MP, CAMACHO C, GONZALEZ F: Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *Ann Esp Pediatr* 1992; 36: 85-97.

ROSENTHAL MD, DOLORESCO MA: The effects of trans fatty acids on fatty acid *delta* 5 desaturation by human skin fibroblasts. *Lipids*. 1984; 19: 869-874.

ROSENTHAL D, LANCIOLLITTI F, DARWICHE N, SINHA R, DE LUCA LM: Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In: Eds: Blomhoff R (ed): *Vitamin A in Health and Disease*. New York. Marcel Dekker Inc. 1994; pp.425-450.

ROSS AC, TERNUS ME: Vitamin A as a hormone: Recent advances in understanding the actions of retinol, retinoid acid, and beta carotene. *J Am Diet Assoc* 1993; 1285-1290.

ROSS AC. Vitamin A status and the antibody response to bacterial antigens. *J Nutr Immunol* 1996;4:47-75.

SAARI JC, BREDBERG DL. Lecithinretinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes. *JBiol Chem* 1989 May 25;264(15): 8636-40.

SAITO M, NAKATSUGAWA K, OH-HASHI A, NISHIMUTA, KODAMA N: Comparison of vitamin E levels in human plasma, red blood cells, and platelets following varying intakes of vitamin E. *J Clin Biochem Nutr* 1992; 12: 59-68.

SALGADO J, VILLALAIN J, GOMEZ-FERNANDEZ JC: α -tocopherol interacts with natural micelle-forming single-chain phospholipids stabilizing the bilayer phase. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 368-376.

SANDERS TA, REDDY S. The influence of a vegetarian diet on the fatty acid composition of human milk and the essential fatty acid status of the infants. *J Pediatr* 1992;120:S71-7

SANDERS TA. Essential fatty acid requirements of vegetarians in pregnancy, lactation, and infancy. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70(3):555S-559S.

SANJURJO P, PERTEAGUDO L, MATORRAS R, RODRIGUEZ-ALARCON J: w3 fatty acid consumption during pregnancy and fetus/maternal levels. In: Ghraf R, Falkner F, Kleinman R, Koletzko B,

Morán J (eds.): New perspectives in infant nutrition. Ediciones Ergon, S.A. Madrid, 1994; pp. 213-225.

SANZ-GALLARDO I, GUALLAR E, VAN TVEER P, LONGNECKER MP, STRAIN JJ, MARTIN BC y col. Determinants of p,p-dichlorodiphenyldichloroethane (DDE) concentration in adipose tissue in women from five European cities. *Arch Environ Health* 1999; 54(4):277-283.

SARCINELLI PN, PEREIRA AC, MESQUITA SA, OLIVEIRA-SILVA JJ, MEYER A, MENEZES MA, ALVES SR, MATTOS RC, MOREIRA JC, WOLFF M. Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. *Environ Res.* 2003 Mar;91(3):143-50.

SASTRY PS. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res.* 1985;24(2):69-176.

SAUERWALD TU, DEMMELMAIR H, FIDLER N, KOLETZKO B: Polyunsaturated fatty acid supply with human milk. Physiological aspects and in vivo studies of metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2000;478:261-70.

SAUERWALD TU, HACHEY DL, JENSEN CL, CHEN H, ANDERSON RE, HEIRD WC. Effect of dietary linolenic acid intake on incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids into plasma phospholipids of term infants. *Lipids* 1996;31:S131-5.

SCHADE G, HEINZOW B. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk or mothers living in northern the levels or contamination. *Sci Total Environ* 1998; 215(1-2):31-39.

SCHNEIDER R, EBERHART W, HESEKER H, KUBLER W: Vitamin intake and vitamin status in Germany. *Bibl Nutr Dieta* 1995; 52: 116-127.

SCHRIJVER R, VERMEULEN D, VIAENE E. Lipid metabolism responses in rats fed beef tallow, native or randomized fish oil and native or randomized peanut oil. *J Nutr* 1991 Jul;121(7):948-55.

SCHWARZ KB, OLSON RE: Requirements and absorption of fat soluble vitamins during infancy. In: Leibel E (ed): *Textbook of*

Gastroenterology and Nutrition in Infancy. New York. Ed. Raven Press 1983 ; 563-584.

SCOPESE F, CIANGHEROTTI S, LANTIERI PB, RISSO D, BERTINI I, CAMPONE F, PEDROTTI A, BONACCI W, SERRA G: Maternal dietary PUFAs intake and human milk content relationships during the first month of lactation. *Clin Nutr* 2001 Oct;20(5):393-7.

SELLMAYER A, KOLETZKO B. Long chain PUFA and eicosanoids in infants –physiological and pathophysiological aspects and open questions. *Lipids* 1999;199-205.

SEMBA RD, DELANGE F: Iodine in human milk: perspectives for infant health. : *Nutr Rev* 2001 Aug;59(8 Pt 1):269-78.

SENOO H, STANG E, NILSSON A, KINDBERG GM, BERG T: Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of the rat liver. *J Lipid Res* 1990; 31: 1229-1239.

SERRA G, MARLETTA A, BONACCI W, CAMPONE F, BERTINI I, LANTIERI PB, et al. Fatty acid composition of human milk in Italy. *Biol Neonate* 1997;72(1):1-8.

SEVANIAN A, DAVIES KJA, HOCHSTEIN P: Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1129-1134.

SHARP GB, COLE P, ANDERSON D, HERBST AL. Clear cell adenocarcinoma of the lower genital tract. Correlation of mother's recall of diethylstilbestrol history with obstetrical records. *Cancer* 1990; 66:2215-2220.

SHARPE RM, SKAKKEBAEK NE. Are oestrogens involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* 1993; 34:1392-1395.

SHEAFF RC, SU HM, KESWICK LA, BRENNAN JT. Conversion of linolenate to docosahexaenoate is not depressed by high dietary levels of linoleate in young rats: tracer evidence using high precision mass spectrometry. *J Lip Res* 1995;36:998-1008.

SHEPHERD CK, POWER KG, CARTER H. Characteristics of responders and non-responders in an feeding study. Bridge of Allan Health Centro. J Public Health Med. 1998; 220(3):275-280.

SHIBAMOTO T, BJELDAMES LF. Introduction to food toxicology. Academic press. San Diego, California, USA. 1993.

SHINGLETON JL, SKINNER MK, ONG D: Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells by lecithin-retinol acyltransferase. Biochemistry 1989a; 28: 9641-9647.

SHINGLETON JL, SKINNER MK, ONG D: Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells by lecithin-retinol acyltransferase. Biochemistry 1989b; 28: 9647-9653.

SIERRA C, PASTOR MC, RAMON M: Liquid chromatography determination of α -tocopherol in erythrocytes. Clin Chim Acta 1992; 208: 119-126.

SIES SH, MURPHY ME, DI MASCIO P, STAHL W: Tocopherols, carotenoids and the glutathione system. En: Ong ASH y Parcker L, eds. Lipid-Soluble Antioxidants. Birkhaeuser: Basel 1992; 160-165.

SILBER R, WINTER R, KAYDEN HJ: Tocopherol transport in the rat erythrocyte. J Clin Invest 1969; 48: 2089-2095.

SIMOPOULOS AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am J Clin 1991;55:438-63.

SKAARE JU, POLDER A. Polichlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk of Norwegian women during lactation. Arch Environ Contam Toxicol. 1990; 19:640-645.

SKAKKEBAEK NE, RAJPERT-DE MEYTS E, JORGENSEN N, CARLSEN E, PETERSEN PM, GIWERCMAN A, ANDERSEN AG y col. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection?. APMIS 1998; 106(1):3-11discussion 12.

SKIBNIEWSKA KA. Diet monitoring for assessment of human exposure to environmental pollutants. *Environ Int.* 2003 Mar;28(8):703-9.

SMALL DM. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *A Rev Nutr* 1991;11:413-34.

SMIT E, KOOPMANN M, BOERSMA E, MUSKIET F. Effect of supplementation of arachidonic acid (AA) or a combination of AA plus docosahexaenoic acid on breastmilk fatty acid composition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Atty Acids* 2000; 62(6):335-40.

SMIT E, OELEN E, SEERAT E, MUSKIET F, BOERSMA E. Breast milk docosahexaenoic acid (DHA) correlates with DHA status of malnourished infants. *Arch Dis Child* 2000; 6:493-94.

SMITH FR, GOODMAN DS: The effects of diseases of the liver, thyroid, and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1971; 50: 2426-2436.

SMITH JE, BOREK C, GOODMAN DS: Retinol-binding protein metabolism in liver cells in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 359: 171-180.

SOLOMON GM, WEISS PM. Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability. *Environ Health Perspect* 2002 Jun;110(6):A339-47.

SOPRANO DR, PICKETT CB, SMITH JE, GOODMAN DS: Biosynthesis of plasma retinol-binding protein in liver as a larger molecular weight precursor. *J Biol Chem* 1981; 256: 8256-8258.

SOPRANO DR, SMITH JE, GOODMAN DS: Effect of retinol status on retinol-binding protein biosynthesis rate and translatable messenger RNA level in rat liver. *J Biol Chem* 1982; 257: 7693-7697.

SOPRANO DR, SOPRANO KJ, GOODMAN DS: Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* 1986; 27: 166-171.

SOTO AM, JUSTICIA H, WRAY JW, SONNENSCHNEIN C. p-Nonilphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect.* 1991; 92:167-173.

SOTO AM, CHUNG KL, SONNENSCHNEIN C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen sensitive cells. *Environ Health Perspect.* 1994; 102:380-383.

SPIRIC A, SAICIC. Monitoring chlorinated pesticides and toxic elements in tissues of food-producing animals in Yugoslavia. *AOAC Int.* 1998; 81(6):1240-1244.

SPORN MB, ROBERTS AB, GOODMAN DS: *The Retinoids*, vol 1 and 2. Academic Press. Orlando, Florida. 1984.

SRINIVASAN P, RUPALATHA M: Beneficial effects of increased levels of dietary α -linoleic acid on the structural and functional properties of synaptosomal membranes from rat brain. In: Abstracts book of the 16th International Congress of Nutrition. Montreal (Canada). Julio-Agosto, 1997; PT254: 225.

STACEWICZ M, BOWEN PE, KIKENDALL JW, BURGESS M: Simultaneous determination of serum retinol and various carotenoids: their distribution in middle-aged men and women. *J Micronut Anal* 1987; 3: 27-45.

STEINER M: Vitamin E supplementation and platelet function. En: Bendich A and Butterworth CE, eds. *Micronutrients in Health and in Disease Prevention*. Marcel Dekker: New York. Basel, Hong Kong 1991; 35-67.

STEINER M: Inhibition of platelet adhesion as functional test for vitamin E status. *Method Enzymol* 1997; 282: 264-271.

STOCKMAN JA: Anemia of prematurity. *Clin Perinatol.* 1977; 4: 239-257.

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.* 1998; 26(9):868-874.

STRUCINSKI P, LUDWICKI JK, GORALCZYK K, CZAJA K, OLSZEWSKI W, JETHON J, BARANSKA J, HERNIK A. Levels of organochlorine insecticides in Polish women's breast adipose tissue, in years 1997-2001. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2002;53(3):221-30

STRYER L: *Bioquímica*. 2ª Edición. Barcelona. Reverté S.A 1985.

SUÁREZ MP, RUIZ MD, OLEA MF. Tabla de raciones estándar para la interpretación de encuestas alimentarias rurales. *Alimentaria*. 1996; 270:43-46.

SUÁREZ MP, RUIZ MD, OLEA MF, LÓPEZ-MARTÍNEZ MC, FERNÁNDEZ, A. Evaluación informatizada. Encuestas nutricionales. Consejería de Cultura y Medio Ambiente. *J de Andalucía*. 1993: 477.

SUBRAMANIAN CS, MEAD: A relationship between essential fatty acid and vitamin E deficiency. *Lipids* 1986; 21: 603-607.

SULIK M, KEMONA A, SZYNAKA B, SULIK B, SULKOWSKA M, KISIELEWSKI W. Pathological changes in rats hepatocytes on acute lindane poisoning. *Rocz Akad Med Bialymst.* 1997; 42(1):156-167.

SUMPTER JP, JOBLIN S. 1995. *Environ Health Perspec.* 103(7); 173-178.

SUNDELIN J, ANUNDI H, TRAGARDH L, ERIKSSON U, LIND P, RONNE H, PETERSON PA, RASK L: The primary structure of rat liver cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem* 1985; 260: 6488-6493.

SUWALSKY M, NORRIS B, BENITES M. The toxicity of exposure to the organochlorine, dieldrin, at a sympathetic junction and on the skin of the frog, *Caudiverbera caudiverbera*. *Hum Exp Toxicol.* 2002 Nov;21(11):587-91.

SVENNERHOLM L, ALLING C, BRUCE A y col. Effects on offspring of maternal malnutrition in the rat. In: *A Ciba Foundation Symposium: Lipids, Malnutrition and the Developing Brain*. Elsevier, Amsterdam 1972:141.57.

SCHWARZ KB, OLSON RE: Requeriments and absorptin of fat soluble vitamins during infancy. In: *Lebenthal E (ed): Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy*. New York. Ed. Raven Press

1983 ; 563-584.

TAGLE MA. Nutrición. Edit. A. Bello. Chile. 1980; 120.

TAKAHASHI Y, URUNO K, KIMUR AS: Vitamin E binding proteins in human serum. *J Nutr Sci Vitaminol* 1979, 23: 201-209.

TAMARI Y, KIM ES: Longitudinal study of the dietary selenium intake of exclusively breast-fed infants during early lactation in Korea and Japan. *J Trace Elem Med Biol* 1999 Nov;13(3):129-33.

TANABE S, NIIMI S, MINH TB, MIYAZAKI N, PETROV EA. Temporal trends of persistent organochlorine contamination in Russia: a case study of Baikal and Caspian Seal. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003 May;44(4):533-45.

TEE ES, LIM CL, CHONG YJ: Carotenoid profile and retinol content in human serum-simultaneous determination by high-pressure liquid chromatography (HPLC). *Int J Food Sci Nutr* 1994; 45: 147-157.

THOMAS MR, PEARSONS MH, DEMKOWICZ M, CHAN IM, LEWIS CG. Vitamin A and vitamin E concentration of the milk from mothers of pre-term infants and milk of mothers of full term infants. *Acta Vitaminol Enzymol*. 1981;3(3):135-44.

THOMPSON B, SMITH A. Biosynthesis of fatty acids by lactating human breast epithelial cells. An evaluation of the contribution of endogenous to the overall composition of human milk fat. *Pediatr Res*. 1985; 19:139-143.

THURNHAM DI: Do higher vitamin A requirements in men explain the difference between the sexes in plasma provitamin A carotenoids and retinol? (Abstract). *Proc Nutr Soc* 1988; 47: 181.

TIGAS S, SUNEHAG A, HAYMOND MW.: Metabolic adaptation to feeding and fasting during lactation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Jan;87(1):302-7.

TITHOF PK, SCHIAMBERG E, PETERS-GOLDEN M, GANEY PE. Phospholipase A2 is involved in the mechanism of activation of

neutrophils by polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect* 1996 Jan; 104: 52-8.

TITHOF PK, WATTS S, GANEY PE. Protein tyrosine kinase involvement in the production of superoxide anion by neutrophils exposed to Aroclor 1242, a mixture of polychlorinated biphenyls. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:1833-43.

TITHOF PK, PETERS-GOLDEN M, GANEY PE. Distinct phospholipases A2 regulate the release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils. *J Immunol* 1998; 160:953-60.

TITHOF PK, OLIVERO J, RUEHLE K, GANEY PE. Activation of neutrophil calcium-dependent and -independent phospholipases A2 by organochlorine compounds. *Toxicol-Sci* 2000 Jan;53(1):40-7.

TORMA H, VAHLQUIST A: Vitamin A esterification in human epidermis: A relation to keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 132-138.

TORRES-ARREOLA L, LOPEZ-CARRILLO L, TORRES-SANCHEZ L, CEBRIAN M, RUEDA C, REYES R, LOPEZ-CERVANTES M. Levels of dichloro-dypheyl-trichloroethane (DDT) metabolites in maternal milk and their determinant factors. *Arch Environ Health* 1999; 54(2):124-129.

TRABER MG, KAYDEN HJ, GREEN JB, GREEN MH: Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in rats. *Am J Clin Nutr* 1986; 44: 914-923.

TRABER MG, KAYDEN HJ: Preferential incorporation of α -tocopherol vs γ -tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 517-526.

TRABER MG, INGOLD KU, BURTON GW, KAYDEN HJ: Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R-(α -tocopherol) in human lipoproteins. *Lipids* 1988; 23: 791-797.

TRABER MG, SOKOL RJ, BURTON GW, INGOLD KU, PAPAS AM, HUFFAKER JE, KAYDEN HJ: Impaired ability of patients with

familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J Clin*

TRAGARDH L, ANUNDI H, RASK L, SEFE K, PETERSEN PA: On the stoichiometry of the interaction between prealbumin and retinol-binding protein. *J Biol Chem* 1980; 255: 9243-9248.

TROTTER WJ, DICKERSON R. *J AOAC Int.* 1993; 76:1220-1225.

UAUY RD, BIRCH DG, BIRCH EE, et al.: Effect of dietary w-3 fatty acids on retina function of very low birthweight neonates. *Ped Res.* 1990; 28: 485-492.

UAUY R, BIRCH E, BIRCH D, HOFFMAN D: Significance of w-3 essential fatty acids supplied by breast milk for visual maturation of fullterm infants. *Pediatr Res.* 1992; 31: A 1762.

UAUY -DAGACH R, MENA P: Nutritional role of omega-3 fatty acids during the perinatal periodo In: Pereira GR, Georgieff MK (eds.): *Neonatal/Perinatal Nutrition.* *Clin Perinatol.* 1995; 22: 157-175.

UAUY R, MENA P, ROJAS C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc Nutr Soc* 2000;59:3-15.

UENO D, INOUE S, IKEDA K, TANAKA H, YAMADA H, TANABE S. Specific accumulation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Japanese common squid as a bioindicator. *Environ Pollut.* 2003;125(2):227-35.

UNDERWOOD BA, LOERCH JD, LEWIS KC: Effects of dietary vitamin A deficiency, retinoic acid and protein quantity and quality on serially obtained plasma and liver levels of vitamin A in rats. 1979; 109: 796-806.

UNDERWOOD BA: Vitamin a in animal and human nutrition, en: *The retinoid*, Srrpron, MB; Robert AB; Goodman DS. Eds. Vol 1, capítulo 6, Academic Press, Nueva York 1984; 281-392.

UNDERWOOD BA. Hypovitaminosis A: epidemiology of a public health problem and strategies of its prevention and control. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1994 Dec;117(6):496-505.

URANO S, KITAHARA M, YUKO K, HASEGAWA Y, MITSUYOSHI M: Membrane stabilizing effect of vitamin E: existence of a hydrogen bond between alpha-tocopherol and phospholipids in bilayer liposomes. *J Nutr Sci Vitaminol* 1990; 36: 513-519.

VAHLQUIST A: Metabolism of the vitamin A-transporting protein complex: turnover of retinol-binding protein, prealbumin and vitamin A in a primate (*Macaca Irus*). *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 30: 349-360.

VALE C, FONFRIA E, BUJONS J, MESSEGUER A, RODRIGUEZ-FARRE E, SUNOL C. The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclohexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* 2003;117(2):397-403.

VALVERDE MF, CODOCEO R, JARA P, ANCCIONES V, DIAZ MC, BESCANS A E, VAZQUEZ C: Deficiencia de vitamina E en la colestasis crónica de la infancia. Manifestaciones neurológicas. Premios de Nutrición Infantil. 1986. Barcelona. Ed. Nestlé AEPA 1987; pp: 9-56.

VAN BEUSEKOM CM, MARTINI IA, URTGERS HM y col. A carbohydrate rich diet not only leads to incorporation of medium-chain fatty acids (6:0-14:0) in milk triglycerides but also in each milk-phospholipid subclass. *Am J Clin Nutr.* 1990; 52:326-34.

VAN JAARSVELD PP, EDELHOCH H, GOODMAN DS ROBBINS J: The interaction of human plasma retinol-binding protein and prealbumin. *J Biol Chem* 1973; 248: 4698-4705.

VARTIAINEN T, JAAKKOLA JJ, SAARIKOSKI S, TUOMISTO J. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(2):61-66.

VATASSERY GT, KREZOWSKI AM, ECKFELDT JH: Vitamin E concentrations in human blood plasma and platelets. *Am J Clin Nutr* 1983; 37: 1020-1024.

VERDON CP, BLUMBERG JB: Influence of dietary vitamin E on the intermembrane transfer of alpha-tocopherol as mediated by an alpha-tocopherol-binding protein. *Anal Biochem* 1988; 169: 109-120.

VERGROSSEN AE, TENHOOR F, HORNSTRA G y col. Physiological function of essential fatty acids. In: HAWKINS W (ed) *the essential fatty acids*, Nutr Soc Canada, Miles Sym, Rexdale.Ontario. Canada 1975:5.

VILLANPANDO S, BUTTE N, FLORES-HUERTA S, THOTATHUCHERY M. Qualitative analysis of human milk produced by women consuming a maize-predominant diet typical of rural Mexico. *Ann Nutr Metab* 1998;42:23-32.

VON KRIES R, SHEARER M, MCCARTHY PT, HAUG M, HARZER G, GOBEL U: Vitamin K1 content of maternal milk: influence of the stage of lactation, lipid composition, and vitamin K1 supplements given to the mother. *Pediatr Res* 1987 Nov;22(5):513-7

VUILLEUMIER JP, KELLER HE, GYSEL D, HUNZIKER J: Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. *Int J Vit Nutr Res* 1983; 53: 265-272.

VUORI E, MAKINEN SM, KARA R y col. The effects of the dietary intakes of copper, iron, manganese and zinc on the trace element content of human milk. *Am J Clin Nutr.* 1980; 33:227-231.

WALISZEWSKI SM, INFANZON RM, HART MM..Differences in persistent organochlorine pesticides concentration between breast adipose tissue and blood serum. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2003 May;70(5):920-6.

WALISZEWSKI, SM, VILLALOBOS-PIETRINI R, GOMEZ-ARROYO S, INFANZON RM. Persistent organochlorine pesticides in Mexican butter. *Food Addit Contam* 2003 Apr;20(4):361-7.

WALKER CH. Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. *Ecotoxicology.* 2003 Feb-Aug;12(1-4):307-16.

WANG XD, TANG GW, FOX JX, KRINSKY NI, RUSSELL RM: Enzymatic conversion of β -carotene into β -apo carotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 8-16.

WANG XD, KRINSKY NI, BENOTTI PN, RUSSELL RM: Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- β -carotene. *Arch Biochem Biophys* 1994; 313: 150-155.

WANG CT, PETERS-GOLDEN M, LOCH-CARUSO R. A calcium-independent phospholipase activity insensitive to bromoenol lactone mediates arachidonic acid release by lindane in rat myometrial cells. *Life-Sci* 2001 Dec 14; 70 (4):453-70.

WASSERMAN M, NOGUEIRA DP, TOMATIS L, MIRRA AP, SHIBATA H, ARIE G, CUCOS S, WASSERMAN D. Organochlorine compounds in neoplastic and adjacent apparently normal breast tissue. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1976; 15:478-484.

WAUBEN I, GIBSON R, ATKINSON S. Premature infants fed mothers' milk to 6 months corrected age demonstrate adequate growth and zinc status in the first year. *Early Hum Dev*. 1999; 54(2):181-194.

WEISER H, VECCHI M, SCHLACHTER M: Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. IV. USP units and alpha-tocopherol equivalents of all-rac-2-ambo and RRR-alpha-tocopherol evaluated by simultaneous determination of resorption-gestation, myopathy and liver storage capacity in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1986; 56: 45-56.

WESTIN JB, RICHTER E. The Israeli breast cancer anomaly. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990; 609:269-279.

WHITE HB, TURNER MD, TURNER AC, et al.: Blood lipid alterations in infants receiving intravenous fat-free alimentation. *J Pediatr*. 1973; 83: 305-313.

WHITMORE RW, IMMERMANN FW, CAMANN D, BOND AE, LEWIS RG, SCHAUM JL. Non-occupational exposures to pesticides for residents of two sites. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1994; 26:47-59.

WHITNEY EN, HAMILTON EMN, BOYLE MA: Understanding nutrition. West publ. Co, St. Paul. 1987.

WHO: Control of vitamin A deficiency and xerophthalmia. Report of a joint WHO/UNICEF/USAID/Hellen Keller International/IVAGG Meeting. WHO Tech Report Series 672. Geneva: WHO 1982.

WILLETT LB, O'DONNELL AF, DURST HI, KURZ MM. Mechanisms of movement of organochlorine pesticides from soils to cows via forages. *Journal of Dairy Science* 1993; 76:1635-1644.

WILLIAMS DT, LEBEL GL. Coplanar polychlorinated biphenyl residues in human adipose tissue samples from Ontario Municipalities. *Chemosphere* 1991; 22:1019-1028.

WILLIAMS C, BIRCH EE, EMMETT PM, NORTHSTONE K: Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team: Stereoacuity at age 3.5 y in children born full-term is associated with prenatal and postnatal dietary factors: a report from a population-based cohort study. *Am J Clin Nutr* 2001 Feb;73(2):316-22

WINDERBAUER F: Versuche mit Weizenkeimol (Vitamin E) bei der Aufzucht von Frühgeburten. *Z Kinderheilkd* 1938; 60: 216-221.

WINTERS D, CLEVERLY D, LORBERM, MEIER K, DUPUY A, BYRNE C, DEYRUP C, ELLIS R, FERRARIO J, LEESE W y col. Coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) in a national sample of beef in the United States: preliminary results. *Organohalogen Compounds*. 1996; 28:350-354.

WOLFF G: The intracellular vitamin A-binding proteins: an overview of their function. *Nutr Res* 1991; 49: 1-12.

WOLFF MS, FISCHBEIN A, SELIKOFF IJ. Changes in PCB serum concentrations among capacitor manufacturing workers. *Environ Res*. 1992; 59(1):202-216.

WOLFF MS, TONIOLO PG, LEE EW, RIVERA M, DUBIN N. Blood levels of organochlorine pesticide residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85:648-652.

WONG CK, LEUNG KM, POON BH, LAN CY, WONG MH. Organochlorine hydrocarbons in human breast milk collected in Hong Kong and Guangzhou. *Arch Environ Contam Toxicol* 2002 Oct;43(3):364-72.

WOODWELL GM. Toxic substances and ecological cycles. *Sci Amer*. 1967; 216(3):24.

WOODWELL GM, WURSTER CF JR, ISAACSON PA. DDT residues in an east coast estuary: a case of biological concentration of a persistent insecticide. *Science* 1967; 156:821.

YAKUSHIJI T, WATANABE I, KUWABARA K, TANAKA R, KASHIMOTO T, KUNITA N, HARA I. Postnatal transfer of PCBs from exposed mothers to their babies: influence of breast-feeding. *Arch Environ Health* 1984; 39(5):368-375.

YAMADA M, BLANER WS, SOPRANO DR, DIXON JL, KJELDBYE HM, GOODMAN DS: Biochemical characteristic of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* 1987; 7: 1224-1229.

YOSHIDA S, NAKAMURA A. Studies on a metabolite of PCB (methyl-sulfone PCB) in mother milk. *J Food Hyg Jpn.* 1977; 18:387-388.

YUAN X, WANG Y, CHEN J, SUN C, XU N. Organochlorine residues of sediments in Taihu Lake and its risk evaluation. *Huan Jing Ke Xue.* 2003 Jan;24(1):121-5.

ZACHARA BA, PILECKI A: Daily selenium intake by breast-fed infants and the selenium concentration in the milk of lactating women in western Poland. *Med Sci Monit* 2001 Sep-Oct;7(5):1002-4.