

MÁSTER EN AVANCES EN RADIOLOGÍA
Y MEDICINA FÍSICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two lions. The shield is surrounded by a circular border containing Latin text. The text includes 'UNIVERSITATIS GRANATENSIS' at the top and 'CAROLVS' on the right side. The seal is rendered in a light, semi-transparent style.

**EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES PERSISTENTES Y
NO PERSISTENTES EN SANGRE MENSTRUAL Y SU
RELACIÓN CON PATRONES DE SANGRADO UTERINO**

TRABAJO FIN DE MÁSTER
ELENA SALAMANCA FERNÁNDEZ

Granada, Julio 2014

Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Hipótesis	9
4. Objetivo.....	9
5. Metodología.....	10
6. Plan de trabajo	20
7. Resultados preliminares.....	22
8. Conclusiones preliminares	23
9. Plan de futuro	24
Anexo I	29
Anexo II	31
Anexo III	42
Anexo IV.....	43

1. Resumen

En el medio ambiente existen en la actualidad miles de sustancias químicas, exógenas al organismo humano, que pueden suponer un riesgo para la salud de las personas. Destacan, entre ellas, los plaguicidas organoclorados, de naturaleza lipofílica y con una elevada persistencia en el medio ambiente y en los organismos, lo que les confiere un gran potencial de bioacumulación en los seres vivos y de biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. Otros compuestos, como los parabenos parecen no acumularse, pero su presencia como contaminantes en productos de uso cotidiano es tan frecuente que la exposición en el día a día está asegurada. Algunas de estas sustancias se comportan como disruptores endocrinos (DEs) xenoestrogénicos interfiriendo con los patrones de síntesis y regulación de las hormonas sexuales.

El objetivo del presente trabajo es cuantificar la exposición humana a una serie de contaminantes ambientales, tanto persistentes como no persistentes (COPs y parabenos), a través de su medida en sangre menstrual, así como establecer su relación con alteraciones en el sangrado menstrual.

Para ello hemos desarrollado una metodología analítica que permite cuantificar las concentraciones de estos compuestos en sangre menstrual. Nuestros hallazgos indican que la metodología es viable y reproducible. Los resultados preliminares muestran valores positivos para parabenos en todas las muestras analizadas.

Abstract

Currently there are thousands of chemicals in the environment exogenous to the human body, which may be a risk to human health. One of the most important groups is organochlorines pesticides, which have lipophilic nature and high persistence in the environment and in organisms, giving them great potential to bioaccumulate in living organisms and biomagnification along the food chain. Other compounds such as parabens seem not to accumulate in human body, but their presence as pollutants in the environment is so prevalent that the daily exposure is secured. Some of these substances behave as endocrine disruptors (EDs) interfering with synthesis patterns and sex hormones regulation.

The aim of this study is to quantify the exposure to a range of environmental pollutants, both persistent and non-persistent (POPs and parabens) in menstrual blood and set its relationship with changes in menstrual bleeding patterns.

We have developed an analytical methodology to quantify the concentrations of these compounds in menstrual blood. Our findings indicate that the methodology is feasible and reproducible. Preliminary results show positive values for parabens in all tested samples.

2. Introducción

En el medio ambiente existen miles de sustancias químicas que han sido sintetizadas por el ser humano desde la revolución industrial hasta nuestros días, casi todos ellos generados en los últimos 60 años. En la actualidad se estiman en más de 150.000 las sustancias químicas registradas en Europa para su uso comercial, y se registran cientos de sustancias nuevas cada año (Goldman, 2002). En 2001, las principales industrias estadounidenses asumieron haber liberado al aire, al agua y en vertederos, cerca de 2.795 millones de kilogramos de sustancias químicas (EPA, USA, 2005), lo que conlleva una gran capacidad de diseminación en el medio ambiente. La aparición de estas nuevas sustancias, exógenas al organismo humano, ha originado nuevos riesgos, pudiendo suponer una nueva amenaza para la salud de las personas. Además, la exposición a estos compuestos se produce tanto de forma conocida y programada, como no intencionada, accidental o simplemente inadvertida (Olea & Pazos, 1998).

Prácticamente la totalidad de la población mundial, en la actualidad, presenta concentraciones detectables de contaminantes ambientales en su organismo (Porta & Puigdomènech, 2008). La información sobre exposición humana a estos contaminantes es relativamente reciente, y demuestra que ésta es muy variable en su magnitud, con implicaciones clínicas, sanitarias, ambientales y sociales conocidas sólo parcialmente (Porta et al., 2002)

Entre tales contaminantes destacan por su ubicuidad los compuestos orgánicos persistentes (COPs), sustancias químicas de naturaleza lipofílica (solubles en grasa) y con una elevada estabilidad química (**persistencia**) en el medio ambiente y en los organismos. Estas propiedades les confieren un gran potencial de **bioacumulación** en los seres vivos y de **biomagnificación** a lo largo de la cadena trófica. La principal ruta de exposición humana a COPs es la cadena alimentaria, aunque en individuos expuestos ocupacionalmente, la vía inhalatoria y transdérmica también pueden ser importantes (Brauner et al., 2012).

Los COPs incluyen una gran variedad de productos químicos. Entre ellos destacan los plaguicidas organoclorados (DDT, endosulfán, aldrín), utilizados en actividades agrícolas para el control de plagas y vectores desde la década de 1950 hasta la década de 1980, cuando la mayoría de ellos fueron prohibidos o su uso restringido en la mayor parte de los países industrializados, por la sospecha de efectos adversos derivados de su exposición (Porta et al., 2002). Otro grupo importante de COPs lo constituyen los bifenilos policlorados (polychlorinated biphenyls, PCBs), que han sido empleados a nivel mundial en numerosas aplicaciones industriales y comerciales, como fluidos de intercambio de calor y dieléctrico, entre otras (WHO, 2000).

La evidencia científica acumulada durante las últimas décadas indica que la exposición humana a COPs puede estar relacionada con alteraciones de diversos procesos biológicos y con un mayor riesgo de padecer enfermedades como diabetes y obesidad, con cambios en la actividad inmunitaria o incluso cáncer (Arrebola et al., 2013a; Arrebola et al., 2013b; Doll & Peto, 1981; Mercado et al., 2013). Los COPs pueden también interferir con el desarrollo fetal normal, con funciones cerebrales, o con la fertilidad (Bonde et al., 2008; Gregoraszczyk, 2013; Olea, 2007).

Se ha demostrado que muchos COPs son disruptores endocrinos (Endocrine Disrupters) (Colborn & Clement, 1992). El término «disruptor endocrino» abarca un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso, representado, entre otros, por compuestos con propiedades estrogénicas y/o antiestrogénicas (mimetizadores o antagonistas de la acción de estradiol), androgénicas y/o antiandrogénicas (mimetizadores o antagonistas de la acción de los andrógenos), o mimetizadores o antagonistas de las hormonas tiroideas, entre otros. Muchos de ellos presentan gran estabilidad y a su vez inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen las características óptimas para haber sido, y ser, empleados en grandes cantidades y con gran libertad, sin especial protección medioambiental. En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido efecto biológico alguno. La hipótesis de disrupción endocrina como

causa de enfermedad sugiere que los disruptores endocrinos se comportan como hormonas, alterando la homeostasis hormonal y originando un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas (Miller & Sharpe, 1998), lo que resultaría en problemas de desarrollo y de funcionalidad de los sistemas hormonales.

Algunos COPs, como por ejemplo DDT, se comportan como xenoestrógenos, (Fernandez et al., 2008) interfiriendo con la acción de las hormonas sexuales femeninas, imitando o bloqueando su acción natural en el organismo (Axmon et al., 2004; Axmon, 2006; Buck Louis & Iglesias Rios, 2011; Cooper et al., 2005; Toft et al., 2008; Vasiliu & Muttineni, 2004). A este respecto, la exposición humana a disruptores endocrinos con actividad hormonal/anti-hormonal, podría conducir a alteraciones en la salud reproductiva de la mujer, resultando en enfermedades diversas que van desde modificaciones de los niveles hormonales, alteraciones del ciclo menstrual, endometriosis, o mayor frecuencia de cáncer hormono-dependiente como, por ejemplo, el cáncer de mama (Fernandez et al., 2007; Kortenkamp, 2006). Así, por ejemplo, algunos estudios epidemiológicos han observado una reducción de los niveles de estrógenos y de progesterona tras la exposición a *p,p'*-DDE y PCB (Arrebola et al., 2010; Windham & Lee, 2005).

Se ha evidenciado también que los disruptores endocrinos son capaces de interferir, tanto en la morfogénesis mamaria como durante la formación el aparato genital masculino y femenino. Es precisamente durante el periodo en el que ocurre este desarrollo crítico, cuando la exposición a disruptores endocrinos puede determinar la aparición de efectos irreversibles, generalmente no manifestados hasta la edad adulta. Aunque sutiles, estos efectos pueden derivar en graves consecuencias para el individuo y para la población general. Estas características particulares hacen a los disruptores endocrinos distintos a otros tóxicos medioambientales, y condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad buscada entre exposición y enfermedad (Colborn et al., 1993; Fernandez et al., 1998).

Como disruptores endocrinos también se encuentran compuestos que parecen no acumularse, pero su presencia como contaminantes en el entorno (agua, aire, alimentos, utensilios) es tan frecuente que la exposición en el día a día está asegurada (Olea & Olea-Serrano, 1996; Porta & Ballester, 2006; Swan, 2008). Entre este tipo de contaminantes no persistentes encontramos a los parabenos, que se utilizan como conservantes en una amplia gama de productos cosméticos.

Los parabenos pertenecen a la familia de alquil-ésteres del ácido parahidroxibenzoico, donde el grupo éster se localiza en la posición C-4 del anillo benzoico. Los más utilizados son metil-, etil-, propil-, butil- y bencilparaben (Figura 1).

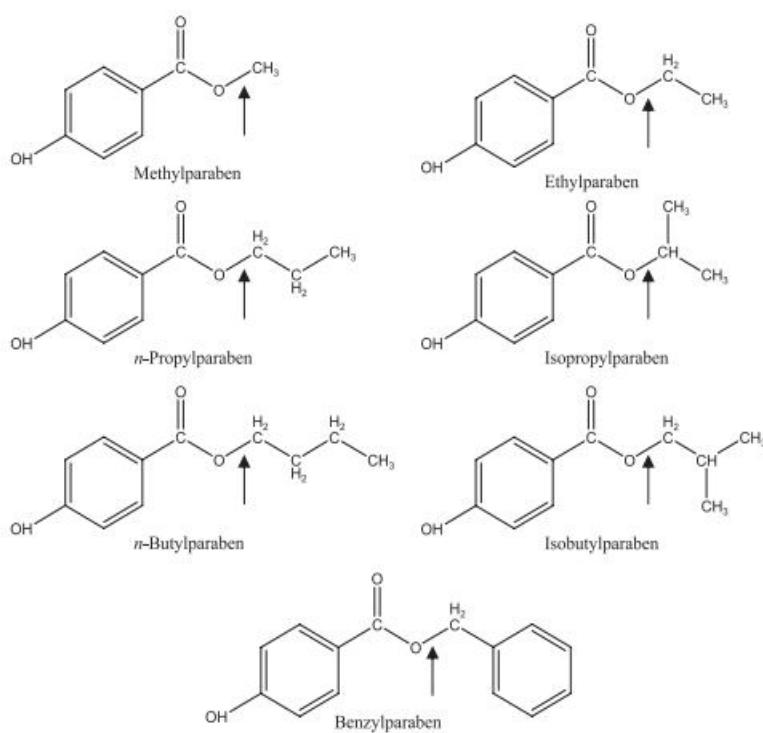


Figura 1. Estructura química de los parabenos más utilizados.

Se trata de moléculas inodoras, incoloras, no volátiles, económicas y eficaces en un amplio rango de pH. Estas características permiten que los parabenos se empleen como conservantes (antimicrobianos), para prolongar la vida de los productos a los que se añaden. Su efecto antimicrobiano fue descrito por primera vez en 1926 por Sabalitschka (Sabalitschka, 1926). Desde entonces

se utilizan en una amplia gama de productos cosméticos, artículos de aseo, fármacos, productos para niños, e incluso algunos están permitidos, en cantidades limitadas en alimentos, como por ejemplo metil- y etil-paraben (Fransway, 1991).

Una vez absorbidos, los parabenos tienen un tiempo de metabolización y excreción muy inferior al de los COPs, sin embargo, el hecho de que estén presentes en productos de uso cotidiano, hace que los seres humanos estén expuestos de forma continua a estos contaminantes.

Actualmente existe una gran preocupación debido a los altos niveles de exposición a estos compuestos en la población general, lo que podría producir efectos indeseables en la salud de los sujetos expuestos. Darbre et al., describieron la presencia de parabenos en tejido mamario procedente de 20 pacientes con cáncer de mama, encontrando una concentración media de $26,6 \pm 4,2$ ng/g de tejido de todos los parabenos, y el éster encontrado en mayor concentración fue el metil-paraben (Darbre & Aljarrah, 2004). La detección de pequeñas cantidades de parabenos, no metabolizados, en el tumor de mama humano puede sugerir que estas sustancias podrían acumularse y, con el tiempo, provocar efectos tóxicos (Golden & Gandy, 2005; Terasaka & Inoue, 2005). Estudios recientes han encontrado parabenos en muestras de orina de individuos sanos, confirmando su absorción sistémica (Ye et al., 2006). Los compuestos encontrados podrían derivar de la aplicación tópica de productos cosméticos (Harvey, 2004), ya que se ha demostrado que los parabenos pueden penetrar a través del sistema circulatorio desde una única aplicación tópica cosmética (Janjua & Mortensen, 2007).

Cuando la absorción se produce vía dérmica, los parabenos son metabolizados por esterasas de la piel, aunque algunos escapan a su acción, encontrándose intactos en orina (Lee & Peart, 2005). Una vez absorbidos, los parabenos y sus metabolitos son conjugados y excretados por la orina y la bilis. Los principales metabolitos son el ácido parahidroxibenzoico y el ácido parahidroxihipúrico (Boberg & Taxvig, 2010). Cuando la exposición es oral,

éstos compuestos son metabolizados por esterasas en intestino e hígado, y aunque la principal vía de excreción es la urinaria, también se excreta una pequeña proporción por bilis y heces.

Algunos parabenos actúan como disruptores endocrinos, presentando una moderada actividad estrogénica y anti-androgénica y pudiendo alterar las concentraciones de hormonas sexuales (Boberg & Taxvig, 2010). La actividad estrogénica de los parabenos se relaciona con la longitud del grupo éster, siendo mayor para aquellos con una mayor longitud de la cadena (Blair & Fang, 2000; Gomez, 2005; 2008). Así, estudios in vitro con líneas celulares que contienen el receptor de estrógenos (por ejemplo células MCF-7) han demostrado que la exposición a parabenos incrementa la proliferación celular. En cuanto a la actividad anti-androgénica, estudios experimentales con ratas macho jóvenes, han observado efectos adversos en los niveles de producción de esperma y de testosterona después de la exposición oral a parabenos de cadenas laterales más largas, como por ejemplo butil-propil-paraben (Kang & Che, 2002; Oishi, 2001; Oishi, 2002a; Oishi, 2002b; Oishi, 2004).

Por otra parte, durante los últimos 50 años también han ocurrido cambios importantes en hábitos y estilos de vida en los países desarrollados, como es el caso de la alimentación y la actividad física. Estos cambios han provocado un aumento alarmante de la prevalencia de obesidad, que alcanza proporciones epidémicas en muchas partes del mundo. Además, las mujeres occidentales experimentan en la actualidad, en promedio, tres veces más periodos menstruales que las mujeres que continúan viviendo como nuestros ancestros con una media de 450 ovulaciones en su vida reproductiva (Eaton, 1999; Strassmann, 1996a; Strassmann, 1996b; Strassmann, 1999). También, las mujeres occidentales contemporáneas tienen la menarquia a edades más tempranas (12 años), dan a luz mucho más tarde (primer nacimiento a los 31; INE), tienen menos meses de lactancia materna (con una media de tres meses), completan su familia con uno o dos hijos y la edad media de la menopausia es más tardía (a los 50 años). Además, todos estos cambios se han producido en un periodo muy corto de tiempo.

Hasta el día de hoy, todos los estudios epidemiológicos que han investigado la relación entre niveles de exposición humana a contaminantes persistentes o no persistentes con alteraciones en el sangrado, se han basado en la cuantificación de los contaminantes en sangre periférica. No existen investigaciones previas de la exposición a estos compuestos en sangre menstrual. Por lo tanto, la medida de estos compuestos químicos xenoestrogénicos en esta matriz biológica proporcionaría una mejor estimación de su contribución al microambiente hormonal uterino y facilitaría la estimación de posibles efectos sobre la salud derivados del mismo

3. Hipótesis

Algunos contaminantes ambientales -disruptores endocrinos- con actividad xenoestrogénica, interfieren con los patrones de síntesis y regulación de las hormonas sexuales femeninas y, en consecuencia, provocan alteraciones en el ciclo menstrual que se manifiestan en alteración de los parámetros que caracterizan la menstruación.

4. Objetivo

Objetivo principal: Cuantificar los niveles de exposición a una serie de COPs y parabenos con actividad xenoestrogénica en sangre menstrual y periférica, en una muestra de mujeres fértiles, así como estudiar su relación con alteraciones en el sangrado menstrual.

Como **objetivos específicos** se plantean los siguientes:

- Desarrollar una metodología químico-analítica para la extracción y cuantificación de contaminantes persistentes [COPs: Hexaclorobenzeno (HCB), β -Hexaclorociclohexano (β -HCH), Endosulfán-éter (E-éter), Endosulfán-lactona (E-lactona), Endosulfán α (E- α), Endosulfán β (E- β), Heptacloro, Vinclozolina, Aldrin, Mirex, Diclorodifenildicloroetileno (*p,p'*-DDE), diclorodifeniltricloroetano (*o,p'*-DDT), Bifenilos policlorados (PCB 153, PCB 138 y PCB 180)] y no

persistentes [Parabenes: Metil- (MPB), Etil- (EPB), propil- (PPB) y butilparabén (BPB)] en muestras de sangre menstrual y periférica.

- Estudiar la relación entre los niveles de contaminantes en sangre menstrual y los presentes en sangre periférica.
- Estudiar la relación entre los niveles de exposición (frecuencia y concentración) y los patrones de sangrado menstrual.

5. Metodología

Diseño del estudio epidemiológico: Estudio transversal en mujeres fértiles durante un ciclo menstrual.

Ámbito de estudio: El área de estudio se corresponde con la provincia de Granada. Las participantes se reclutarán en el Servicio de Ginecología del Hospital Universitario San Cecilio (Granada).

Población de estudio potencialmente elegible: mujeres en edad fértil y residentes en la provincia de Granada.

- Criterios de inclusión:
 - Rango de edad entre 18 y 50 años
 - Mujeres que tengan la menstruación de forma regular (ciclos de entre 24 y 38 días)
- Criterios de exclusión:
 - Embarazada en el momento del estudio
 - Usaria de anticoncepción hormonal

A las mujeres participantes se les informará acerca del estudio (Anexo I), se solicitará la firma del consentimiento informado (Anexo III) sin la cual no podrán participar en el estudio, se les instruirá acerca de cómo recoger la sangre durante la menstruación (Anexo IV) y de cómo rellenar el cuestionario de recogida de la muestra (Anexo II). Además de preguntas específicas sobre las características de su menstruación y de la información sobre la recogida de sangre menstrual con las copas menstruales, cada participante se le administrará un cuestionario previamente validado, donde se recogerán las

características socio-demográficas y de estilo de vida. Las mujeres recogerán la sangre menstrual durante todo el periodo de una **única** menstruación. La sangre se conservará refrigerada y se remitirá en menos de 24 horas al Biobanco del Hospital Universitario San Cecilio, donde éstas serán congeladas de forma inmediata a -86°C.

La obtención de la sangre periférica se realizará en los Centros de Salud durante la primera fase del ciclo menstrual (entre el 1º día y el 5º día del ciclo) y serán remitidos al Biobanco.

Tamaño muestral: Se pretende obtener una muestra final de 100 participantes. Al ser un estudio piloto y debido a que no hay estudios previos en los que se midan contaminantes en sangre menstrual, no podemos calcular un tamaño muestral concreto, ya que no conocemos la variabilidad que pueden tener las concentraciones de estos contaminantes; según sean los resultados se podrá ampliar posteriormente la muestra.

5.1 Variables de estudio

A. Variable dependiente:

Características del ciclo menstrual y cuantificación del volumen menstrual.

- Cantidad de sangrado (ml)
- Tiempo entre las reglas (días)
- Dolor menstrual (cuestionario)
- Edad de menarquia (años)
- Regularidad/variabilidad del periodo a lo largo de la vida fértil (días). Para ello se emplea la fórmula menstrual, dividiendo los días de sangrado entre los días del ciclo.

Se considerará un sangrado uterino anormal cuando la frecuencia del ciclo está por debajo de 24 días o por encima de 38, ya que el ciclo normal estaría entre 24 y 38 días, con un sangrado comprendido entre 5 y 80 ml y una

duración del sangrado entre 4,5 y 8 días (Fraser & Critchley, 2011; Fraser & Critchley, 2007). Se considerarán las alteraciones de los parámetros menstruales:

- Amenorrea: falta del sangrado ≥ 90 días
- Sangrado menstrual infrecuente: ciclos mayores de 38 días y menores de 90 días
- Sangrado menstrual frecuente: ciclos menores de 24 días

En cuanto al volumen y duración del sangrado uterino, se considerará anormal cuando:

- Aumenta la cantidad de sangrado, mayor de 80 ml (sangrado menstrual abundante)
- Aumenta la duración del sangrado menstrual por encima de 8 días (sangrado menstrual prolongado, asociado frecuentemente a sangrado menstrual abundante)
- Ocurren sangrados fuera del ciclo (sangrado uterino anormal intermenstrual)

B. Variables independientes

- Concentraciones de contaminantes persistentes y no persistentes en sangre menstrual y periférica.
- Parámetros sociodemográficos y antropométricos (obtenidos mediante cuestionario): edad (años), peso (Kg), talla (metros), nivel de estudios, ocupación actual, historial de embarazos, edad de menarquia, número de hijos, tiempo acumulado de lactancia, uso de anticonceptivos hormonales, otros tratamientos hormonales, consumo de alcohol y cafeína, consumo de tabaco, ejercicio físico, consumo de alimentos (Cuestionario epidemiológico en Anexo II).
- Medidas de hormonas sexuales en sangre periférica en primera fase del ciclo menstrual: estradiol, progesterona, FSH y LH.

5. 2 Metodología químico-analítica

La metodología implicará la optimización de las condiciones instrumentales adecuadas para la determinación de estos compuestos a bajas concentraciones, así como el desarrollo del método de extracción en esta matriz biológica. Se emplearán los siguientes recursos:

Instrumental: El material a utilizar para el tratamiento de la muestra se compondrá de los siguientes elementos:

- *Cámara fría y congeladores*: Para el almacenamiento de reactivos y tampones se utiliza una cámara frigorífica con temperatura regulada a 4°C, además de frigoríficos y congeladores convencionales. Para el almacenamiento de muestras se utiliza un congelador con temperatura fijada a -86°C.
- *Pipetas automáticas*: Para manipular los reactivos se usarán pipetas con succión y expulsión automática de fluido. Para la realización de los ensayos químicos y bioquímicos se emplearán pipetas de volumen variable de 0-10 µl y 20-100 µl. Para la preparación de las muestras se utilizará una micropipeta de volumen variable: entre 0 y 100 µl.
- *Balanzas*: Se usará una balanza de precisión con capacidad de medición hasta la centésima y décima de miligramo.
- *Disolventes*: Se utilizará n-hexano, metanol, 2-isopropanol, acetonitrilo, acetona y ácido acético.
- *Compuestos químicos patrones*: Como compuestos químicos patrones se utilizarán: HCB, β-HCH, E-éter, E-lactona, E-α, E-β, Heptacloro, Vinclozolina, Aldrin, Mirex, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, PCB 153, PCB 138, PCB 180, MPB, EPB, PPB, BPB *p,p'*-diclorobenzofenona.
- *Otro material*: Se emplearán diversos equipos de laboratorio entre los

que cabe destacar: pipetas de vidrio de diferente volumen, tubos de ensayo, embudos de vidrio, matraces, agitadores mecánicos y otros.

Conservación de las muestras

Las muestras de sangre recogidas en las copas menstruales se pasarán a unos tubos de plástico de 20 ml, previamente suministrados a las participantes, para su conservación. Estos tubos han sido previamente testados para conocer las sustancias que puedan contaminar la muestra, con resultados siempre negativos.

En cuanto a la sangre periférica, una vez recogida se trasladará al biobanco donde se obtendrá el suero mediante centrifugación, que se almacenará congelado a -80°C hasta su análisis.

Instrumentaciónquímico-analítica:

Cromatografía de gases (para el análisis de compuestos organoclorados)

El análisis de los analitos se llevará a cabo mediante un cromatógrafo de gases (Varian 3800 CP GC) con detector de captura de electrones (DCE) refrigerado con Nitrógeno, auto-inyector de vaporización de temperatura programable, compartimento termostatzado de columna. El gas portador es Helio. La cromatografía gaseosa es una técnica de separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija y otra móvil. En cromatografía gaseosa, la fase móvil es un gas que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.

La separación cromatográfica se realiza utilizando una columna analítica Bruker BR-5ms (FS 30m, 0.25 mm ID y 0.25 μm df) con un flujo de 1 ml/min y a una rampa de temperaturas de 130°C a 260°C . El volumen de inyección es de 1 μl . El DCE trabaja a una temperatura de 300°C y con un voltaje de 115 mV. El software utilizado para el análisis de los cromatogramas es el Galaxy.

La extracción de las muestras se realiza en columna con lavados de hexano, previo a la inyección de los patrones y las muestras.

Cromatografía de líquido-masas (para el análisis de parabenos)

Se realizó el análisis mediante un HPLC-MS/MS Acquity UPLC™ H-Class de Aguas. Un espectrómetro de masas cuadrupolar en tándem Xevo TQS (Waters) equipado con una fuente de ionización ortogonal electrospray Z™.

Se utilizó como columna cromatográfica un HPLC Acquity BEH C18® (100mm x 2,1mm; 1,7 µm de tamaño de partícula) de Waters para la separación cromatográfica de los analitos objetivo. Un evaporador de centrifuga de vacío se utiliza para concentrar muestras. Para el análisis de los cromatogramas se utilizó el software Statgraphics Plus versión 5.0.

Los compuestos fueron separados utilizando un gradiente de fase móvil que consta de una solución de formiato de amonio acuoso (pH = 9), 0,1% (v/v) como disolvente A y otra de amoniaco en metanol 0,1% (v/v) como disolvente B. Las condiciones de gradiente eran como siguen: 0,0 a 4,0 min, al 40% de B; 4,0-6,0 min al 90% de B; 6,0 a 6,1 min del 90 al 100% de B; de 6.1 a 7.5 min, a 100% de B y de nuevo a 40% en 0,5 min. Después, 5 min para el acondicionamiento de la columna. El tiempo total es de 13,0 min. El caudal es de 300µl/min y el volumen de inyección de 10 µl. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C.

La ionización de electrospray se realizó en modo de iones positivos y negativos. El espectrómetro de masas en tándem se utilizó en modo MRM (monitorización de reacciones múltiples) y los cuadrupolos Q1 y Q3 se fijaron en resolución de masa unidad. Las condiciones de espectrometría de masas se optimizaron para cada analito por infusión continua de soluciones concentradas estándar (1 µg/ml). La temperatura de la fuente de iones se mantuvo a 150°C. Otros parámetros del instrumento son los siguientes: tensión capilar, 0,60 kV; temperatura de la fuente, 150°C; temperatura de desolvatación, 500°C; flujo de gas del cono, 150L/h; flujo de gas de desolvatación, 500L/h; flujo de gas de

colisión, 0,15 ml/min y el flujo de gas nebulizador, 7,0 bar. Se utilizó Nitrógeno (99,995%) como gas de desolvatación, y Argón (99,999%) como un gas de colisión. Los tiempos de permanencia se fijaron en 25 ms. La energía de colisión (CE) y los voltajes de cono (CV) se optimizaron para cada analito.

Purificación de muestra y análisis químico

El equipo ha desarrollado y validado una metodología analítica para el tratamiento y análisis de las muestras de sangre menstrual, para la cuantificación de los residuos de COPs y parabenos, basada en los métodos de Quechers (Kiyotaka Usui & Yoshie Hayashizaki, 2012; Luzardo & Ruiz-Suárez, 2013).

A) Análisis de sangre menstrual

Método de extracción QuEChERS:

La palabra QuEChERS es un acrónimo de las palabras “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe”, que significan que es un método rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (Anastassiades & Lehotay, 2002). El procedimiento QuEChERS proporciona además recuperaciones altas para una amplia gama de compuestos con diferentes estructuras químicas.

El objetivo de esta etapa es aislar los analitos de interés de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que la extracción sea lo más eficiente posible.

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra y una etapa crítica en el proceso analítico, debido a que su optimización conlleva una serie de dificultades como consecuencia de la complejidad de la matriz y la baja concentración que suelen presentar los contaminantes objeto de estudio.

En primer lugar la muestra se homogeniza en una emulsionadora, de tal forma que tengamos una mezcla homogénea de dicha muestra. A continuación, se lleva a cabo el proceso de extracción mediante el procedimiento QuEChERS que implica las siguientes etapas:

Análisis de Organoclorados

Previa homogenización de la muestra se procede a:

1. Pesar 2.5 g de muestra y doparla con 100 µl de Patrón Interno (PCDBF) a 200 ppb.
2. Adicionar 1.5 mL de agua miliQ + 15 mL de acetona acidificada al 1% con ácido acético.
3. Sonicar 10 min
4. Centrifugar 3 min a 4000 rpm.
5. Separar de las fases resultantes la Acetona y adicionar la siguiente mezcla de sales (Q1):
 - 6 g de sulfato de magnesio anhidro MgSO₄
 - 1.5g de Acetato de sodio anhidro AcNa
6. Agitar vigorosamente 3 min
7. Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
8. Separar de las fases resultantes la Acetona y adicionar la siguiente mezcla de sales (Q2):
 - 100 mg de PSA
 - 50 mg de C18
 - 150 mg de sulfato de magnesio anhidro MgSO₄
9. Agitar 3 min
10. Centrifugar durante 3 min a 4000 rpm
11. Separar de las fases resultantes la Acetona y secar en la corriente de Nitrógeno.
12. Composición del extracto: se añaden 200µl de hexano al residuo seco y se le da vortex para homogenizar. Se pasan a viales eppendorf.
13. Centrifugar los viales 15 min
14. Se pasan a un vial de cromatografía

Análisis de Parabenos

Previa homogenización de la muestra se procede a:

1. Pesar 2.5 g de muestra y doparla con 100 µl de Patrón Interno (BPA-d16) a 500 ppb.

2. Adicionar 1.5 mL de agua miliQ + 15 mL de acetonitrilo.
3. Sonicar 10 min
4. Centrifugar 3 min a 4000 rpm.
5. Separar de las fases resultantes la Acetona y adicionar la siguiente mezcla de sales (Q1):
 - 6 g de sulfato de magnesio anhidro $MgSO_4$
 - 1.5g de Acetato de sodio anhidro $AcNa$
6. Agitar vigorosamente 3 min
7. Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
8. Separar de las fases resultantes la Acetona y adicionar la siguiente mezcla de sales (Q2):
 - 100 mg de PSA
 - 50 mg de C18
 - 150 mg de sulfato de magnesio anhidro $MgSO_4$
9. Agitar 3 min
10. Centrifugar durante 3 min a 4000 rpm
11. Separar de las fases resultantes la Acetona y secar en la corriente de Nitrógeno.
12. Composición del extracto: se añaden 200µl de hexano al residuo seco y se le da vortex para homogenizar. Se pasan a viales eppendorf.
13. Centrifugar los viales 15 min
14. Se pasan a un vial de cromatografía líquida.

Después de la centrifugación de la muestra (etapa 7) se obtienen dos fases separadas debido a la adición de sulfato de magnesio y acetato de sodio. La adición de dichas sales induce la partición/separación de las dos fases y que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica obteniéndose recuperaciones muy altas. La fase acuosa se encuentra en la parte inferior mientras que la orgánica la encontramos en la parte superior, y es en esta fase donde se encuentran por tanto los analitos de interés.

El procedimiento QuEChERS además implica una etapa de limpieza, ya que en ocasiones en el análisis de residuos y contaminantes a niveles trazas puede haber interferentes que pueden ser co-extraídos junto con los analitos

durante la extracción. Una vez realizado el procedimiento indicado anteriormente, se procede al análisis de la muestra. Dicho análisis como se ha indicado anteriormente se realiza mediante cromatografía de gases con detector de electrones.

Optimización del método:

Durante la puesta a punto del método descrito anteriormente se han optimizado los siguientes puntos:

- Tipo de disolvente a utilizar (acidificado con ácido acético)
- Volumen de disolvente
- Cantidad de muestra (sangre menstrual) a emplear
- Tiempo de agitación
- Comparación de recuperación con y sin ultrasonidos
- %de recuperación
- Optimización de la cantidad de sales en los Q1 y Q2
- Límite de detección

Los métodos de análisis de COPs y parabenos son muy similares, exceptuando el tipo de disolvente a utilizar (acetonitrilo para parabenos y acetona para organoclorados) y el sistema cromatográfico (los parabenos se analizan en LC:MS y los COPs con cromatografía de Gases).

B) Análisis de sangre periférica

Para el análisis de la sangre periférica se utiliza un método basado en el procedimiento descrito por (Turci et al., 2010), el cual comienza con una centrifugación de la sangre para separar el suero. Al suero se le añaden 2ml de metanol y se agita durante 30 segundos. Se realiza una extracción de fase orgánica con 10 ml de éter de etilo/hexano (1:1, v/v) y se separa la fase orgánica, la cual se evapora bajo una corriente de nitrógeno hasta un volumen de 500µL. Este residuo se purifica con a través de un cartucho Bond Elut PCB, el cual se acondiciona previamente con 1 ml de hexano. El extracto obtenido se eluye con 3 ml de hexano y después con 3 ml de hexano: éter etílico (1:1, v/v).

Se recogen los eluidos y se secan en una corriente de nitrógeno. Estos residuos secos se vuelven a disolver en 100 μ L de hexano, y se analizan a continuación mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG-DCE).

6. Plan de trabajo

Este trabajo se realiza en la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Para la realización de este trabajo fin de Máster, se han llevado a cabo las actividades que se describen a continuación.

1. En primer lugar se ha realizado una búsqueda bibliográfica mediante la consulta en diferentes artículos y páginas web con el objetivo de conocer los antecedentes y el estado actual de la determinación de estos compuestos en nuestra matriz biológica.
2. En segundo lugar se han seleccionado los compuestos objeto de estudio en base a la frecuencia y uso de dichos compuestos en diferentes matrices. También se ha consultado en la bibliografía diferentes artículos que nos muestran las técnicas más aplicadas para la determinación de los analitos seleccionados.
3. Por último se ha llevado a cabo la validación del método, mediante el cálculo de los siguientes parámetros de validación: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y límites de detección (LODs).

Se pretende la consecución del proyecto en un plazo de 6 meses. En el siguiente cronograma se detallan las fases del estudio:

Actividades/Tareas	1º mes	2º mes	3º mes	4ºmes	5º mes	6º mes
Tiempo para la puesta a punto de la metodología						
Reclutamiento						
Digitalización de encuestas						
Extracción y análisis de muestras						
Análisis de datos						

Protección de datos

Para que todos los datos de carácter personal obtenidos en este estudio se ajusten a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99, estarán dentro de la protección y seguridad que tienen las muestras que se depositan en el Biobanco.

Las encuestas son conservadas con un código, sin los datos de filiación de las participantes. Los resultados de las mismas y la identificación de los códigos con las participantes quedarán registrados en un archivo Excel con acceso identificado únicamente para los investigadores del estudio para garantizar la confidencialidad.

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Granada.

7. Resultados preliminares

El método Quechers ha resultado viable para la detección de COPs y parabenos en las muestras de sangre menstrual dopadas.

De las cuatro muestras blancas (sin dopar artificialmente con patrones de contaminantes) analizadas para parabenos, todas ellas contenían parabenos. Sin embargo, el blanco del material también dio positivo, por eso se han integrado las áreas, de modo que nos permitiera comprobar si las muestras problema eran significativas o no.

A continuación se muestra la tabla de resultados, destacando en color los positivos (una vez corregido el área del blanco).

	MPB	EPB	PPB	BPB
Blanco:	2464	4176	2449	Negativo
Muestra1	7160	5532	3672	Negativo
Muestra2	18742	8164	17148	Negativo
Muestra3	31192	7382	50613	Negativo
Muestra4:	14130	4899	4818	Negativo

Tabla 1: Resultados de parabenos en muestras problema.

Por ejemplo, en el caso de la muestra número 3 pudimos comprobar como, tras cuantificar el área del blanco de material, esta muestra problema daba positivo para metil-, etil- y propil-parabén (Figura 2).

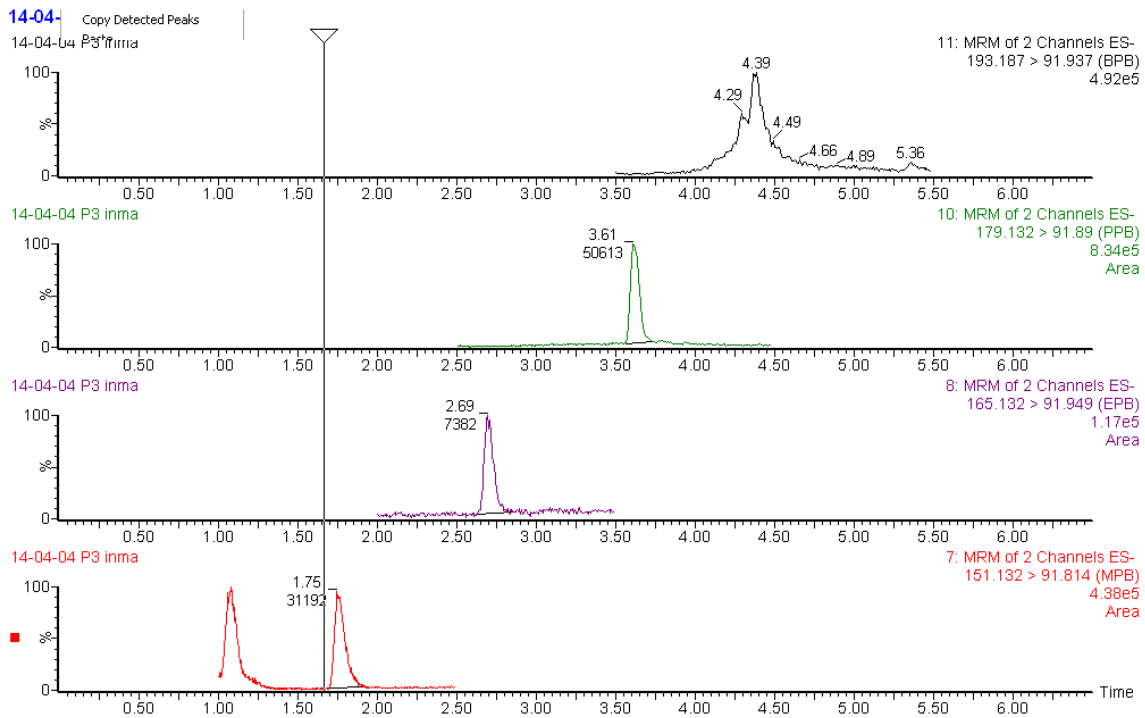


Figura 2. Muestra positiva en metil-, etil- y propil-parabén

8. Conclusiones preliminares

Las principales conclusiones analíticas obtenidas a partir de la elaboración del presente trabajo fin de máster son las siguientes:

- En base a la revisión bibliográfica, se concluye que no existen trabajos publicados sobre análisis de COPs o Parabenes en sangre menstrual, así como de su significado biológico en relación a los niveles en otras matrices como sangre periférica.
- Se ha desarrollado un método rápido y de bajo coste para el análisis de 16 plaguicidas organoclorados y 4 parabenes en matriz de sangre menstrual humana,
- La extracción de los analitos de las matrices se ha realizado utilizando dos métodos basados en la extracción QuEChERS.
- Para el análisis de los plaguicidas en los extractos se ha optimizado utilizado un método de purificación de muestra y análisis mediante cromatografía de gases con captura de electrones, siendo el tiempo total de análisis para cada muestra de 55 minutos.

- Para el análisis de los parabenos en los extractos se ha optimizado utilizado un método de LC acoplada a detector MS de triple cuadrupolo, siendo el tiempo total de análisis para cada muestra de 13 minutos.
- El método puesto a punto se ha validado en términos de linealidad, sensibilidad, exactitud, precisión y límites de cuantificación. Los resultados obtenidos en la validación del método son adecuados para su aplicación al análisis de residuos de plaguicidas y parabenos.

9. Plan de futuro

Los primeros resultados obtenidos permiten predecir que es plausible encontrarnos con muestras positivas en parabenos y en COPs, y que éstos pudieran estar implicados en determinados desórdenes del ciclo menstrual que, en la actualidad representa uno de los principales motivos de consulta ginecológica. Se pretende estudiar el significado biológico de las concentraciones de contaminantes en sangre menstrual en relación a las encontradas en sangre periférica.

Completar nuestro estudio significará recibir las muestras oportunas entre las mujeres que acuden al Servicio de Ginecología por sangrado uterino anormal y comparar los resultados con los de mujeres con ciclos menstruales normales. En principio, cabe esperar que la recepción de muestras se produzca en los próximos seis meses, se realice el análisis simultáneo de las mismas y la valoración y el estudio estadístico en los siguientes cuatro meses.

Bibliografía

Anastassiades M, Lehotay SJ, *et al.* Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. European Pesticide Residues Workshop, EPRW, 2002. Rome, Book of Abstracts.

Arrebola JP, Fernandez MF, Porta M, *et al.* Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ Int* 2010; 36: 705-713.

Arrebola JP, Fernandez MF, Olea N, *et al.* Human exposure to p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) in urban and semi-rural areas in southeast Spain: a gender perspective. *Sci Total Environ* 2013a; 458-460: 209-216.

Arrebola JP, Pumarega J, Gasull M, *et al.* Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ Res* 2013b; 122: 31-37.

Axmon A. Menarche in women with high exposure to persistent organochlorine pollutants in utero and during childhood. *Environ Res* 2006; 102: 77-82.

Axmon A, Rylander L, Stromberg U, *et al.* Altered menstrual cycles in women with a high dietary intake of persistent organochlorine compounds. *Chemosphere* 2004; 56: 813-819.

Blair RM, Fang H, Branham WS, *et al.* The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sciences* 2000; 54: 138-153.

Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, *et al.* Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 2010; 30(2): 301-312.

Bonde JP, Toft G, Rylander L, *et al.* Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect* 2008; 166(3): 269-277.

Brauner EV, Raaschou-Nielsen O, Gaudreau E, *et al.* Predictors of adipose tissue concentrations of organochlorine pesticides in a general Danish population. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2012; 22: 52-59.

Buck Louis GM, Iglesias Rios L, McLain A, *et al.* Persistent organochlorine pollutants and menstrual cycle characteristics. *Chemosphere* 2011; 85: 1742-1748.

Colborn T, Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. Princetown Scientific Publishing, Princetown (NY), 1992.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 378-384.

Cooper GS, Klebanoff MA, Promislow J, *et al.* Polychlorinated biphenyls and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology* 2005; 16: 191-200.

Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol* 2004; 24: 5-13.

Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.

Eaton SB. Breast Cancer in Evolutionary Context. In: *Evolutionary Medicine*. Trevathan W, (Ed.) Oxford University Press, Oxford, 1999; 429-442.

Fernandez MF, Aguilar-Garduno C, Molina-Molina JM, *et al.* The total effective xenoestrogen burden, a biomarker of exposure to xenoestrogen mixtures, is predicted by the (anti)estrogenicity of its components. *Reprod Toxicol* 2008; 26: 8-12.

Fernandez MF, Pedraza V, Olea N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection? *Cancer J* 1998; 11: 11-7.

Fernandez MF, Santa-Marina L, Ibarluzea JM, *et al.* Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: A biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1290-1299.

Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol* 2008; 27(4): 1-82.

Fransway AF. The problem of preservation in the 1990s: III. Agents with preservative function independent of formaldehyde release. *Am J Contact Dermat* 1991; 2: 145-174.

Fraser IS, Critchley HOD, *et al.* The FIGO Recommendations on terminologies and definitions for normal and abnormal uterine bleeding. *Semin Reprod Med* 2011; 29(5): 383-390.

Fraser IS, Critchley HOD, *et al.* A process designed to lead to international agreement on terminologies and definitions used to describe abnormalities of menstrual bleeding. *Fertil Steril* 2007; 87(3): 466-476.

Golden R, Gandy J, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *CRC Crit Rev Toxicol* 2005; 35: 435-458.

Goldman LR. Preventing pollution? US toxic chemicals and pesticides policies and sustainable development. *Environ Law Report News Analysis* 2002; 32:11018-41.

Gomez E, Pillon A, Fenet H, *et al.* Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *J Toxicol Environ Health* 2005; 68: 239-251.

Gregoraszczyk EL, Ptak A. Endocrine-disrupting chemicals: some actions of POPs on female reproduction. *Int J Endocrinol* 2013; 12: 828532.

Harvey PW, Darbre P. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in bodycare cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *J Appl Toxicol* 2004; 24: 167-176.

Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, *et al.* Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol* 2007; 41: 5564-5570.

Kang KS, Che JH, Ryu DY, *et al.* Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *J Vet Med Sci* 2002; 64: 227-235.

Kortenkamp A. Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective. *Int J Androl* 2006; 29: 193-198.

Lee HB, Peart TE, Svoboda ML. Determination of endocrine disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; 1094: 122-129.

Luzardo OP, Ruiz-Suárez N, Almeida-González M, *et al.* Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 9523-9536.

Mercado LA, Freille SM, Vaca-Pereira J, *et al.* Serum concentrations of p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDE) in a sample of agricultural workers from Bolivia. *Chemosphere* 2013; 91(10): 1381-1385.

Miller WR, Sharpe RM, Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocr Relat Cancer* 1998; 5:89-96.

Oishi S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* 2001; 17(1):31-39.

Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol* 2002a; 76:423-429.

Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 2002b; 40(12): 1807-1813.

Oishi S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol* 2004; 42:1845-1849.

Olea N, Pazos P, Expósito J. Inadvertent exposure to xenoestrogens. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7:17-23.

Olea N, Fernandez MF. Chemicals in the environment and human male fertility. *Occup Environ Med* 2007; 64(7): 430-431.

Olea N, Olea-Serrano MF. Oestrogens and the environment. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5: 491-496.

Porta M, Ballester F, Ribas-Fitó N, *et al.* Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población general española. Criterios para un diagnóstico de la situación actual. *Gac Sanit* 2006; 20: 233-238.

Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, *et al.* Studies conducted in Spain on concentrations in humans of persistent toxic compounds. *Gac Sanit* 2008; 22: 248-266.

Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, *et al.* Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish population: a puzzle without pieces and the protection of public health. *Gac Sanit* 2002; 16: 257-266.

Sabalitschka T, Dietrich RK. Chemical constitution and preservative properties. *Disinfection*. 1926; 11: 67-71.

Strassmann BI. Energy economy in the evolution of menstruation. *Evol Anthropol* 1996a; 5: 152-156.

Strassmann BI. The evolution of endometrial cycles and menstruation. *Q Rev Biol* 1996b; 71: 181-220.

Strassmann BI. Menstrual cycling and Breast Cancer: An evolutionary perspective. *J Women Health* 1999; 8: 193-202.

Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* 2008; 108(2): 77-84.

Terasaka S, Inoue A, Tanji M, *et al.* Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bisand benzoyl-phenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicol Lett* 2005; 163: 130-141

Toft G, Axmon A, Lindh C, *et al.* Menstrual cycle characteristics in European and Inuit women exposed to persistent organochlorine pollutants. *Hum Reprod* 2008; 23(1): 193-200.

Turci R, Balducci C, Brambilla G, *et al.* A simple and fast method for the determination of selected organohalogenated compounds in serum samples from the general population. *Toxicol Lett* 2010; 192: 66-71.

Usui K, Hayashizaki Y, Minagawa T, *et al.* Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Legal Medicine* 2012; 14(6): 309-316.

Vasiliu O, Muttineni J, Karmaus W. In utero exposure to organochlorines and age at menarche. *Hum Reprod* 2004; 19(7): 1506-1512.

WHO. Polychlorinated biphenyls (PCBs). WHO Regional Office for Europe Air Quality Guidelines, Chapter 5.10, 2000.

Windham GC, Lee D, Mitchell P, *et al.* Exposure to Organochlorine Compounds and Effects on Ovarian Function. *Epidemiology* 2005; 16: 182-190.

Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, *et al.* Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 831: 110-115.

Anexo I

Hoja informativa para participantes

Título: “Exposición a contaminantes persistentes (COPs) y no persistentes en sangre menstrual y su relación con patrones de sangrado uterino anormal”

1. Introducción

Los COPs y parabenos son compuestos químicos usados en la agricultura, la industria y la cosmética. Algunos estudios científicos sugieren que la exposición a estos productos podría estar asociada a algunos **efectos sobre la salud** (infertilidad, alteraciones metabólicas, cambios en el sistema inmunitario y hormonal, e incluso algunos tipos de cáncer). Por esto queremos invitarles a participar en este estudio con el objetivo de conocer la exposición a COPs y parabenos durante su época fértil. **Por favor, lea atentamente la información siguiente y haga cualquier pregunta que necesite aclarar.**

Recuerde que su **participación es total y absolutamente voluntaria**. El estudio cuenta con la debida autorización y supervisión del Comité de Ética y del Comité de Investigación de Granada.

2. ¿Cuál es el objetivo/la finalidad del estudio?

Queremos saber si los compuestos anteriormente mencionados afectan al ciclo menstrual de la mujer.

3. ¿Estoy obligada a participar?

No, la participación en el estudio es completamente voluntaria. Además, en cualquier momento puede optar por abandonar su participación, si así lo desea.

4. ¿Qué tengo que hacer?

Si decide participar, el estudio comenzará con el inicio de su ciclo menstrual y finalizará con el mismo. Tiene que rellenar un cuestionario sencillo para valorar sus hábitos dietéticos y de estilo de vida. Durante el ciclo, usted recogerá su sangre menstrual mediante la copa de silicona y la verterá en el frasco que previamente le habremos entregado. Una vez acabado el periodo le recogeremos el frasco. Entre el 1º día y el 5º día del ciclo acudirá al centro de salud para que se le extraiga una muestra de sangre para analizarla y compararla con la muestra menstrual.

5. ¿Qué molestias/riesgo puede ocasionar?

No existe ningún riesgo en participar en este estudio.

6. Confidencialidad ¿Quién tiene acceso a la información?

Sus datos personales, así como la información colectada durante el estudio nunca se harán públicos. A cada mujer se le asigna un código numérico y nadie puede tener acceso a la información personal, excepto los investigadores del proyecto.

7. ¿Cuál es mi nivel de compromiso?

En cualquier momento usted puede decidir dejar de participar en el estudio de una forma fácil, rápida y sencilla por las razones que sean. En este sentido, posee usted libertad total y no supondrá ninguna consecuencia.

8. ¿Si tengo alguna duda, a quién me dirijo?

En cualquier momento del estudio pueden preguntar. No duden en contactar con nosotros cuando lo necesiten. La responsable del estudio es la doctora Enriqueta Barranco.

Gracias por leer esta información. Si deciden participar y están de acuerdo, rogamos firmen la autorización (consentimiento informado).

Anexo II

CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

“Exposición a contaminantes persistentes y no persistentes en sangre menstrual y su relación con patrones de sangrado uterino anormal”

Se le invita a participar en un estudio descriptivo sobre factores ambientales y su influencia en las características de la menstruación. La participación es totalmente voluntaria.

Algunas preguntas podrían ser un poco difíciles de contestar pero le pedimos que conteste tan precisamente como le sea posible.

La información que usted da se mantendrá en completa confidencialidad y su nombre no será registrado junto con sus respuestas.

Es importante para los resultados del proyecto que participe en la medida que le sea posible, por eso le rogamos su colaboración.

Por favor, especifique la fecha en la que rellena este cuestionario (día/mes/año):

A. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS		
1. ¿Cuándo nació?		
Día, mes, año: / /	Edad:	
2. Nacionalidad:		
3. ¿Dónde vive?		
Localidad:	Código postal:	Teléfono:
4. ¿Cuánto tiempo lleva viviendo en ese lugar? (meses, años)		
5. ¿Está su residencia próxima a un lugar con invernaderos? (rodear la que corresponda)		
Sí		
No (Ir a la pregunta 7)		
6. ¿A qué distancia? (aproximada)		
7. ¿Está su residencia próxima a una zona con actividad agrícola? (rodear la que corresponda)		
1. Sí		
2. No (Ir a la pregunta 9)		
8. ¿A qué distancia? (aproximada)		
9. ¿Está su residencia próxima a una zona con alguna actividad industrial? (rodear la que corresponda)		
1. Sí		
2. No (Ir a la pregunta 12)		

10. ¿Qué tipo de actividad industrial? (garaje, papelera,...)			
11. ¿A qué distancia? (aproximada)			
12. ¿Podría decir en qué otros lugares ha vivido en los últimos diez años?			
Localidad	Provincia	CP:	Tiempo:.....años
Localidad	Provincia	CP:	Tiempo:.....años
Localidad	Provincia	CP:	Tiempo:.....años
13. ¿Vivió cerca de un lugar con invernaderos en esos años? (rodear la que corresponda)			
1. Sí			
2. No (Ir a la pregunta 16)			
14. ¿A qué distancia? (aproximada)			
15. ¿Durante cuanto tiempo vivió allí?			
16. ¿Estuvo su residencia próxima a una zona con actividad agrícola? ? (rodear la que corresponda)			
1. Sí			
2. No (Ir a la pregunta 19)			
17. ¿A qué distancia? (aproximada)			
18. ¿Durante cuanto tiempo vivió allí?			
19. ¿Estuvo su residencia próxima a una zona con alguna actividad industrial? (rodear la que corresponda)			
1. Sí			
2. No (ir a la pregunta 23)			
20. ¿Qué tipo de actividad industrial?			
21. ¿A qué distancia? (aproximada)			
22. ¿Durante cuánto tiempo vivió allí?			
23. ¿Pasa parte del año viviendo cerca de invernaderos, zona agrícola o zona con actividad industrial? (rodear la que corresponda)			
1. Sí			
2. No (pase a la pregunta 28)			
24. ¿Qué tipo de actividad? (rodear la que corresponda)			
1. Invernaderos			
2. Zona agrícola			
3. Actividad industrial			

25. ¿Qué tipo de actividad industrial?	
26. ¿Cuánto tiempo pasa allí? (P.e. el verano,...) meses	
27. ¿A qué distancia se encuentra su segunda residencia de alguno de estos lugares?	
28. ¿Podría indicar sus ocupaciones durante los últimos diez años?	29. ¿Cuánto tiempo se dedicó a cada una de ellas?
1. _____	meses
2. _____	meses
3. _____	meses
4. _____	meses
5. _____	meses
6. _____	meses
7. _____	meses
8. _____	meses
9. _____	meses
10. _____	meses

<p>30. ¿Cuál es su categoría profesional? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fuerzas armadas 2. Dirección de empresas y de administraciones públicas 3. Técnicos y profesionales científicos e intelectuales 4. Técnicos y profesionales de apoyo 5. Empleados de tipo administrativo 6. Trabajadores de los servicios de restauración, personales protección, vendedores de los comercios 7. Trabajadores cualificados en la agricultura y en la pesca 8. Artesanos y trabajadores cualificados de las industrias manufactureras, la construcción y la minería 9. Operadores de instalaciones y 	<p>31. ¿Cuál es la categoría profesional de su pareja? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fuerzas armadas 2. Dirección de empresas y de administraciones públicas 3. Técnicos y profesionales científicos e intelectuales 4. Técnicos y profesionales de apoyo 5. Empleados de tipo administrativo 6. Trabajadores de los servicios de restauración, personales protección, vendedores de los comercios 7. Trabajadores cualificados en la agricultura y en la pesca 8. Artesanos y trabajadores cualificados de las industrias manufactureras, la construcción y la minería 9. Operadores de instalaciones y maquinaria y montadores 10. Trabajadores no cualificados
<p>32. ¿Qué estudios tiene usted? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 No sabe leer ni escribir 2 Primaria incompleta 3 Primaria 4 Formación profesional o Bachiller 5 Diplomado 6 Licenciatura 7 Postgrado (doctor, master,...) 	<p>33. ¿Qué estudios tiene su pareja? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 No sabe leer ni escribir 2 Primaria incompleta 3 Primaria 4 Formación profesional o Bachiller 5 Diplomado 6 Licenciatura 7 Postgrado (doctor, master,...)

B. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS

34. ¿Cuánto mide?	cm
35. ¿Cuánto pesa?	kg
<p>36. ¿Cree que ha perdido peso en los últimos 12 meses?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (Ir a la pregunta 39) 	

37. ¿Cuánto? 1. Menos de 4 kilos 2. Entre 4-6 kilos 3. Más de 6 kilos			
38. ¿Cuál cree que ha sido la causa de la pérdida de peso?			
C. CONDICIONES DE SALUD			
39. ¿Ha tenido alguna de las enfermedades siguientes? (rodear la que			40. ¿Desde cuándo o a qué edad?
1. Hipertensión	1. Sí	2. No	
2. Artritis	1. Sí	2. No	
3. Alergias	1. Sí	2. No	
4. Diabetes	1. Sí	2. No	
5. Úlcera gastrointestinal	1. Sí	2. No	
6. Cataratas	1. Sí	2. No	
7. Afección cutánea	1. Sí	2. No	
8. Embolia	1. Sí	2. No	
9. Afección cardíaca	1. Sí	2. No	
10. Asma	1. Sí	2. No	
11. Afección tracto urinario	1. Sí	2. No	
12. Estreñimiento	1. Sí	2. No	
13. Varices	1. Sí	2. No	
14. Bronquitis crónica	1. Sí	2. No	
15. Hipercolesterolemia	1. Sí	2. No	
16. Depresión, Ansiedad	1. Sí	2. No	
17. Cáncer (especificar cuál)	1. Sí	2. No	
18. Otras: (especificar cuál)	1. Sí	2. No	
41. ¿Con qué frecuencia acude al dentista? (rodear la que corresponda) 1. Menos de 1 vez al año 2. 1 vez al año 3. 1 vez cada 6 meses 4. Más de 1 vez cada 6 meses			
42. ¿Le han puesto alguna vez un empaste? (rodear la que corresponda) 1. Sí 2. No (Ir a la pregunta 45)			

43. Si contestó SÍ, por favor especifique:		
Tipo	<u>Amalgama</u>	<u>Composite</u>

Número de empastes		
--------------------	--	--

44. ¿Cuánto tiempo hace desde que le pusieron un empaste por última vez?

45. ¿Ha consumido algún medicamento durante los 3 últimos meses? (incluir suplementos, como vitaminas, minerales...) (rodear la que corresponda)

1. Sí
2. No (Ir a la pregunta 49)

Si contestó SÍ, por favor especifique:

46. Nombre de la medicación:	47. Para qué enfermedad:	48. Dosis:

D. HISTORIA REPRODUCTIVA

49. Método anticonceptivo actual:

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| - Preservativo | - Anillo anticonceptivo |
| - Ligadura de trompas | - Implante hormonal |
| - Essure | - Cálculo |
| - DIU de cobre | - Marcha atrás |
| - DIU Mirena | - Método sintotérmico |
| - Píldora anticonceptiva | - Moco vaginal |
| - Parche anticonceptivo | - Otro |

50. ¿Ha utilizado alguna vez anticonceptivos hormonales?

1. Sí
2. No (Ir a la pregunta 53)

51. ¿A qué edad comenzó a utilizarlos? años

52. ¿Durante cuánto tiempo (en años) los ha utilizado? (si ha sido por periodos, sumar todos)

53. ¿Cuántos embarazos ha tenido? (incluir abortos)

54. ¿Ha tenido hijos? (rodear la que corresponda)

- Sí
- No (Ir a la pregunta 61)

55. En caso afirmativo, ¿cuántos hijos?

56. ¿Cuál es la fecha de su último parto?
57. ¿Han tenido sus hijos algún problema de salud al nacer? (rodear la que corresponda) 1. Sí 2. No (Ir a la pregunta 59)
58. En caso afirmativo, ¿podría especificar de qué tipo?
59. ¿Ha amamantado a sus hijos? (rodear la que corresponda) 1. Sí 2. No (Ir a la pregunta 61)
60. En caso afirmativo, ¿Cuántos meses de promedio (sumando todos los hijos)?
D. ESTILOS DE VIDA
61. ¿Fuma usted actualmente? (rodear la que corresponda) 1. Sí 2. No (Ir a la pregunta 63)
62. En caso afirmativo, ¿con qué frecuencia? (rodear la que corresponda) 1. Muy pocas veces (1 cigarrillo al mes) 2. Ocasionalmente (1-3 cigarrillos semanales) 3. Moderadamente (2-4 cigarrillos diarios) 4. Mucho (más de 10 cigarrillos diarios)
63. ¿Ha fumado con anterioridad? (rodear la que corresponda) 1. Sí 2. Nunca (Ir a la pregunta 65)
64. En caso afirmativo, ¿con qué frecuencia fumaba en el pasado? 1. Muy pocas veces (1 cigarrillo al mes) 2. Ocasionalmente (1-3 cigarrillos semanales) 3. Moderadamente (2-4 cigarrillos diarios) 4. Mucho (más de 10 cigarrillos diarios)
¿Podría decirme qué cantidad de las bebidas siguientes suele consumir a la semana?
65. Cerveza nº _____ bebidas a la semana (1 tubo = 1 bebida)
66. Vino nº _____ bebidas a la semana (1 vaso = 1 bebida)
67. Licores nº _____ bebidas a la semana (1 cubata = 3 bebidas)
E. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA DIETA
68. ¿Qué tipo de agua bebe? (rodear la que corresponda) 1. Agua del grifo 2. Agua mineral (Ir a la pregunta 70) 3. Ambas
69. ¿Qué tipo de agua del grifo? (rodear la que corresponda) 1. De la red 2. De un pozo
70. ¿Qué agua mineral? (marca)

71. ¿Cuánta agua bebe? (nº de vasos al día)
72. ¿Qué tipo de agua utiliza para cocinar? (rodear la que corresponda) 1. Agua del grifo 2. Agua mineral (Ir a la pregunta 74) 3. Ambas
73. ¿Qué tipo de agua del grifo? 1. De la red 2. De un pozo
74. ¿Qué agua mineral? (marca)
75. ¿Con qué frecuencia come pescado y marisco (NO enlatado)? (rodear la que corresponda) 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
76. ¿Qué tipo de pescado consume más frecuentemente? (rodear la que corresponda) 1. Pescado azul 2. Pescado blanco 3. Indistintamente
77. ¿Con qué frecuencia consume productos lácteos? (no queso) (rodear la que corresponda) 1. Nunca 2. Dos veces por semana o menos 3. Mas de dos veces por semana 4. Todos los días
78. ¿Qué tipo de leche consume? (rodear la que corresponda) 1. Entera 2. Semidesnatada 3. Desnatada 4. Otras (con aditivos):
79. ¿Cuánta leche toma al día? (nº de vasos/día)
80. ¿Con qué frecuencia come queso? (rodear la que corresponda) Nunca Dos veces por semana o menos Más de dos veces por semana Todos los días
81. ¿Qué tipo de queso consume más frecuentemente? (rodear la que corresponda) - Fresco - Curado/Semicurado - Indistintamente
82. ¿Con qué frecuencia consume embutidos y fiambres? (rodear la que corresponda) 1. Nunca 2. Dos veces por semana o menos 3. Más de dos veces por semana 4. Todos los días
83. ¿Qué consume con mayor frecuencia? (rodear la que corresponda) 1. Embutido 2. Fiambre
84. ¿Con qué frecuencia come carne? (rodear la que corresponda) 15. Nunca (pase a pregunta 86) 16. Menos de una vez por semana 17. Una vez por semana 18. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana

<p>85. ¿Qué tipo de carne consume más frecuentemente? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pollo 2. Cerdo 3. Vacuno 4. Ovino 5. Indistintamente 6. Otros:
<p>86. ¿Con qué grasa cocina habitualmente? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aceite de oliva 2. Otros aceites vegetales (especifique): 3. Grasa animal 4. Indistintamente
<p>87. ¿Consume mantequilla y/o margarina? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mantequilla 2. Margarina 3. Indistintamente 4. Nunca
<p>88. ¿Con qué frecuencia consume mantequilla y/o margarina? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una vez por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día
<p>89. ¿Con qué frecuencia come legumbres? (lentejas, garbanzos,...) (rodear la que corresponda)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nunca - Menos de una vez por semana - Una vez por semana - Dos veces por semana - Más de dos veces por semana
<p>90. ¿Con qué frecuencia come verduras cocinadas? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>91. ¿Con qué frecuencia come vegetales crudos? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>92. ¿Con qué frecuencia come fruta? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>93. ¿Con qué frecuencia come huevos? (fritos, en tortilla, cocidos...) (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Menos de una vez por semana 3. Una vez por semana 4. Dos veces por semana 5. Más de dos veces por semana
<p>94. ¿Con qué frecuencia come pan? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una vez por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día 5. Más de una vez al día

<p>95. ¿Con qué frecuencia consume pastas? (macarrones, espaguetis,...) (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. Una vez por semana 3. Tres-cuatro veces por semana 4. Una vez al día
<p>96. ¿Consume comida enlatada? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (Ir a la pregunta 98)
<p>97. En caso de respuesta afirmativa, ¿Cuántas latas de conserva consume a la semana?</p>
<p>98. ¿Ha variado su dieta considerablemente en los últimos doce meses? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí
<p>99. En caso afirmativo, indicar en qué medida:</p>
<p>100. ¿Come comida ecológica? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No
<p>101. En caso afirmativo ¿Qué proporción de su dieta proviene de alimentos ecológicos?</p>
<p>F. ASPECTOS RELACIONADOS CON SU MENSTRUACIÓN</p>
<p>102. ¿A qué edad tuvo su primera regla?</p>
<p>103. ¿Cuánto tiempo transcurre habitualmente entre dos reglas consecutivas? (indique <25 días, 25-32 días, >33 días o irregular)</p>
<p>104. Rodee los días que le dura su regla:</p> <p style="text-align: center;">1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12</p>
<p>105. ¿Le duele la regla? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí (indique si leve, moderado o intenso)
<p>106. ¿Ha notado cambios en la duración y cantidad del sangrado en su regla en los últimos 6 meses? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Sí. Especifique: 4. No
<p>107. ¿Tiene usted síntomas premenstruales?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí (indique si los considera leves-solo lo nota usted-, moderados-los nota su familia, o graves –no puede realizar sus actividades diarias-) 2. No
<p>108. ¿Cuánto tiempo hace de su última revisión/exploración ginecológica? (meses) El resultado es:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Normal 2. Anormal. Indique el diagnóstico, si lo conoce: <p>¿Hace algún tratamiento para este problema? Indique cuál:</p>
<p>109. ¿Tiene algún otro tipo de problema relacionado con la regla?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí. Especifique: 2. No
<p>110. ¿Toma alguna medicación durante la regla? (rodear la que corresponda)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí. Tipo: 2. No

G. USO DE COSMÉTICOS
111. ¿Utiliza tintes para el pelo? 0. Sí 1. No (pase a pregunta 114).
112. Especifique el tipo de tinte: 1. De peluquería 2. Casero. En este caso, especifique la marca:
113. ¿Desde cuándo se tiñe el pelo? (aproximadamente, cuántos años o meses lleva utilizándolos) ¿Con qué frecuencia? (número de veces al año)
114. ¿Utiliza habitualmente (al menos una vez por semana) perfumes, colonias, laca para el cabello o productos cosméticos? 1. Sí
115. ¿Utiliza habitualmente cremas o aceites corporales? 1. Sí (pase a la pregunta siguiente) 2. No.

116. En el caso de utilizar cremas o aceites corporales, conteste a lo siguiente:

- * Zona del cuerpo (rodee lo que considere correcto y especifique la frecuencia de aplicación):
- Cara (incluyendo crema de maquillaje). Número de veces al día:
 - Manos. Número de veces al día:
 - Brazos. Número de veces al día:
 - Piernas. Número de veces al día:
 - Otras partes del cuerpo. Número de veces al día:

HA LLEGADO AL FINAL

¡GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!

Anexo III

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO:

“Exposición a contaminantes persistentes (COPs) y no persistentes en sangre menstrual y su relación con patrones de sangrado uterino anormal”

Yo, (nombre y apellidos).....
mayor de edad y con DNI:

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera.

2º Sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FECHA:

FIRMA DE LA PARTICIPANTE

FECHA:

FIRMA INVESTIGADOR RESPONSABLE

DNI INVESTIGADOR:

Anexo IV

INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA DE LA SANGRE:

Durante la menstruación en la que va a formar parte del estudio tiene que tener en cuenta:

1. Lave su copa menstrual con agua.
2. Evite el uso de jabones o detergentes para higienizar su copa.
3. Evite ponerse crema de manos o cremas corporales antes de manipular la copa, insertarla o retirarla. Queremos evitar que se contamine con productos ajenos a la menstruación.
4. Si le es posible evite los lavados genitales con jabones o detergentes, si puede utilice sólo agua, para evitar que la sangre se contamine con productos ajenos a la propia menstruación.

El primer día de la menstruación, comience a vaciar la sangre de la copa menstrual en los frascos de plástico que se le han enviado; mientras se llena consérvelo en el frigorífico. Una vez lleno (no hace falta que sea hasta el borde), guárdelo en el congelador. No pasa nada si transcurren varios días o se derrama algo de sangre, lo importante es que sea de la misma menstruación (no de otro mes).

Rellene estas preguntas sobre la menstruación que va a ser estudiada:

Día inicio menstruación (día/mes/año)	
Día fin menstruación (día/mes/año)	
Fecha de congelación (día/mes/año)	
Fecha de entrega a mensajería (día/mes/año)	

