



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**"EXPOSICIÓN HUMANA A CONTAMINANTES
ORGÁNICOS PERSISTENTES EN ESPAÑA Y
BOLIVIA Y SU ASOCIACIÓN CON
ALTERACIONES METABÓLICAS"**

Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en Farmacia, dentro del programa de Medicina Clínica y Salud Pública, la Licenciada en Farmacia, MARIA FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

mafero@ugr.es

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María Fernández Rodríguez
ISBN: 978-84-9125-322-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/41097>



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**"EXPOSICIÓN HUMANA A CONTAMINANTES ORGÁNICOS
PERSISTENTES EN ESPAÑA Y BOLIVIA Y SU ASOCIACIÓN CON
ALTERACIONES METABÓLICAS"**

Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en Farmacia, dentro del programa de Medicina Clínica y Salud Pública, la Licenciada en Farmacia, MARIA FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

D. NICOLAS OLEA SERRANO, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Medicina Física del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Director Científico del Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA,

CERTIFICA:

Que **D^a MARÍA FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título "**EXPOSICIÓN HUMANA A CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN ESPAÑA Y BOLIVIA Y SU ASOCIACIÓN CON ALTERACIONES METABÓLICAS**" bajo mi tutela y dirección, respetando los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados y publicaciones, para optar al grado de **DOCTOR EN FARMACIA**, dentro del programa de **MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**, por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación

Granada, 1 septiembre 2015

D. JUAN PEDRO ARREBOLA MORENO, Doctor en Farmacia, Investigador Postdoctoral vinculado a la Unidad de Gestión Clínica de Oncología, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada,

CERTIFICA:

Que **D^a MARÍA FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título "**EXPOSICIÓN HUMANA A CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN ESPAÑA Y BOLIVIA Y SU ASOCIACIÓN CON ALTERACIONES METABÓLICAS**" bajo mi tutela y dirección, respetando los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados y publicaciones, para optar al grado de **DOCTOR EN FARMACIA**, dentro del programa de **MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**, por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación

Granada, 1 septiembre 2015



DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

D. **Nicolás Olea Serrano**, Director del departamento de Radiología y Medicina Física,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en Farmacia D^a **María Fernández Rodríguez** en el Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de Granada.

Granada, 1 septiembre 2015

Fdo.: Prof. Dr. Nicolás Olea Serrano

Índice de contenido

1. Resumen	15
2. Introducción	21
2.1. Contaminantes Orgánicos Persistentes	23
2.2. Toxicidad y Mecanismos de acción de los COPs	27
2.2.1. Absorción	27
2.2.2. Distribución	29
2.2.3. Mecanismos de acción	30
2.2.3.1.1. Disrupción endocrina	31
2.2.3.1.2. Actividad epigenética	36
2.2.3.1.3. Estrés oxidativo	37
2.2.4. Metabolismo y excreción	38
2.3. Dos efectos en salud asociados a la exposición a COPs: disrupción endocrina y enfermedad metabólica	39
2.3.1. Efectos sobre el sistema endocrino	39
2.3.2. Implicación en enfermedades metabólicas	41
2.4. Evaluación de la exposición	43
2.4.1. Caracterización del riesgo	45
2.4.2. Biomonitorización y biomarcadores de exposición	45
2.5. Exposición a COPs en España	47
2.6. Exposición a COPs en Bolivia	49
2.7. Poblaciones con especial exposición a COPs	50
3. Justificación	53
4. Hipótesis	57
5. Objetivos	61
6. Material y métodos	65
6.1. Población de estudio	67
6.1.1. Cohorte de controles MCC-Spain	67
6.1.2. Cohorte Santa Cruz de la Sierra	68
6.1.3. Cohorte GraMo	70
6.2. Variables independientes	71
6.2.1. Cohorte de controles MCC-Spain	71
6.2.2. Cohorte Santa Cruz de la Sierra	71
6.2.3. Cohorte GraMo	72
6.3. Extracción de las muestras biológicas, análisis químico y análisis biológico	73
6.3.1. Cohorte de controles MCC-Spain	73
6.3.2. Cohorte Santa Cruz de la Sierra	74
6.3.3. Cohorte GraMo	75
6.3.3.1.1. Cuantificación de la Carga estrogénica total efectiva (TEXB) en tejido adiposo	76
6.4. Análisis de la fracción lipídica en suero y tejido adiposo	76
6.5. Análisis Estadísticos	77
6.5.1. Cohorte de controles MCC-Spain	77

6.5.2. Cohorte Santa Cruz de la Sierra	78
6.5.3. Cohorte GraMo	79
7. Resultados y discusión	81
7.1. Niveles de contaminantes orgánicos persistentes en una población adulta de cuatro regiones españolas y sus predictores (Objetivo 1).	83
Introducción	
Resumen	
Resultados	
Discusión	
7.2. Concentraciones de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en suero y tejido adiposo humano en Bolivia (Objetivo 2).	105
Introducción	
Resumen	
Resultados	
Discusión	
7.3. Asociación entre exposición acumulada a contaminantes orgánicos persistentes y lípidos séricos y obesidad en una cohorte de adultos del sudeste español (Objetivo 3).	125
Introducción	
Resumen	
Resultados	
Discusión	
7.4. Concentraciones de compuestos orgánicos persistentes en tejido adiposo y prevalencia de diabetes tipo 2 en población adulta del Sudeste español (objetivo 4).	141
Introducción	
Resumen	
Resultados	
Discusión	
7.5. Discusión general	157
7.5.1. Exposición a COPs en España y Bolivia	156
7.5.2. Exposición a COPs como posible factor etiológico del síndrome metabólico (SM)	162
8. Conclusiones	167
9. Bibliografía	173

1. Resumen

Resumen

Los *Contaminantes Orgánicos Persistentes* (COPs) son compuestos orgánicos resistentes a la degradación fotolítica, química y biológica, entre los que se incluyen, por ejemplo, el *p, p'*-diclorodifenildicloroetileno (*p,p'*-DDE), el hexaclorobenceno (HCB), el hexaclorociclohexano (HCH) y congéneres de los bifenilos policlorados (PCBs). Suelen ser compuestos halogenados y, en la mayor parte de los casos, policlorados. El mayor grado de halogenación confiere a estos compuestos, una solubilidad muy baja en agua y alta en lípidos lo que les permite acumularse en los depósitos de grasa. Consecuencia de la bioacumulación es la biomagnificación en la cadena trófica. Muchos de los COPs se caracterizan, además, por ser semi-volátiles, por lo que pueden ser transportados a largas distancias por las corrientes de aire y, por tanto, pueden ser identificados en prácticamente todos los compartimientos ambientales y en todas las zonas del planeta, incluyendo aquellas muy alejadas de donde se han producido y/o usado.

Para cumplir con el primer objetivo general de esta tesis doctoral, que era evaluar la exposición a COPs, se cuantificaron las concentraciones séricas de un grupo de COPs en una muestra de adultos reclutados en cuatro regiones diferentes de España (Cohorte MCC-Spain) y en una cohorte de adultos de Santa Cruz de la Sierra en Bolivia y se analizaron los factores predictores de la exposición tanto socio-demográficos y dietéticos como de estilo de vida.

En el estudio español, las tasas de detección variaron entre el 89,1% (HCB) y el 93,6% (PCB-153); el pesticida *p, p'*-DDE mostró las concentraciones más altas (mediana 1,04 ng/ml), mientras que HCB mostró los niveles más bajos (0,24 ng/ml). La edad se asoció positivamente con varios residuos: HCB, *p, p'*-DDE y PCB-180. El IMC se asoció positivamente con el residuo de *p, p'*-DDE, pero negativamente con PCB-138. El tiempo total de residencia en zona urbana se asoció positivamente con las concentraciones de PCB-153 en suero. En los modelos multivariantes, las mujeres mostraron mayores concentraciones HCB y menores de *p,p'*-DDE que los hombres. Cabe destacar que la exposición a COPs en nuestra población de estudio se asoció positivamente con la lactancia materna recibida por los participantes y negativamente con el número de embarazos de sus madres, pero no estaba relacionado con la historia de las participantes de haber amamantado a sus hijos o la paridad. El tabaquismo se

asoció negativamente con las concentraciones de HCB y PCB-153. El consumo de alimentos ricos en grasas en general, incluyendo pescado azul, se asoció positivamente con los niveles de COPs.

En Bolivia no existen registros previos de biomonitorización de la exposición humana a COPs y se supone *a priori* que los niveles de residuos y las rutas de exposición podrían ser diferentes a los observados en otras poblaciones, debido a las particularidades en cuanto a estilos de vida, etnia, nivel sociocultural y hábitos dietéticos de la región y el país en general.

En la población boliviana, se analizaron los predictores de la exposición combinada a tres PCBs (congéneres 138, 153 y 180) en suero y tejido adiposo de una cohorte de adultos (n = 112) que vivían en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) y sus localidades de alrededor. También se identificaron los modificadores que pueden influir en las asociaciones estadísticas encontradas, utilizando modelos crudos, ajustados parcialmente, y múltiples, de regresión lineal globales. Los principales predictores de las concentraciones séricas fueron la ocupación y el consumo de alimentos grasos, mientras que los de las concentraciones de tejido adiposo se incluyeron la edad, el hábito tabáquico, el consumo de alimentos grasos, y la residencia. Las diferencias entre los predictores de las dos matrices –tejido adiposo y suero- podrían derivar de su significado biológico, dado que las concentraciones de tejido adiposo son un indicador de la exposición crónica a los PCBs, mientras que los niveles séricos son un buen indicador de la exposición permanente y la movilización de los PCBs almacenados en los tejidos grasos. En este trabajo se evidenció que el IMC era un modificador importante de las asociaciones encontradas.

Algunos COPs se comportan como hormonas, alterando la homeostasis del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos, u hormonas tiroideas, a través de diversos mecanismos de acción, generalmente vinculados a receptores nucleares. Por otro lado, existen estudios clínicos y experimentales que han encontrado una relación entre la exposición humana a COPs y la prevalencia de trastornos relacionados con el síndrome metabólico (SM). El SM incluye un conjunto de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular como son la obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión e

hiperlipidemia, que afectan alrededor del 20% de la población adulta en el mundo y del 31% en la población adulta española y se mantienen al alza las previsiones de su prevalencia.

Para dar respuesta al segundo objetivo general de esta tesis doctoral, se estudió la asociación de la exposición humana acumulada a COPs con los niveles de lípidos en suero y con la obesidad, en una cohorte de cerca de trescientos adultos residentes en Granada y Motril.

En el análisis multivariante, las concentraciones de HCB evidenciaron una asociación cuadrática significativa con los niveles de colesterol total, HDL, LDL y lípidos totales en suero. Del mismo modo, los PCB 138 y 180 se asociaron con los triglicéridos y lípidos totales en suero y PCB 153 se asoció con LDL. HCB, *p,p'*-DDE, y β -HCH mostraron asociaciones de segundo grado con el IMC. Todos los modelos cuadráticos mostraron una tendencia positiva en los niveles bajos de exposición, mientras que la pendiente disminuyó o incluso se convirtió en negativa a niveles de exposición superiores. Además, el PCB 138 se asoció positivamente con el IMC de forma lineal. Nuestros resultados sugieren una posible relación entre la exposición histórica a COPs y lípidos séricos / obesidad, que sigue un patrón no lineal en la mayoría de los casos.

Sobre la misma cohorte de individuos, se analizaron residuos de COPs en sangre y tejido adiposo para investigar su relación con la prevalencia de diabetes. Los modelos matemáticos, ajustados por origen del tejido adiposo, sexo, edad y el índice de masa corporal, mostraron que el segundo y tercer tercil de las concentraciones en tejido adiposo de *p,p'*-DDE se asociaban positivamente con el riesgo de diabetes con OR (IC 95%) = 3,6 (0,8-17,3) y 4,4 (1,0-21,0), respectivamente. Además, se encontró una asociación positiva entre las concentraciones de β -HCH y diabetes cuando los modelos no se ajustaban por el IMC y el origen del tejido adiposo, con OR (IC 95%) de 3,3 (1,0-10,4) y 5,5 (1,7-17,3), para el segundo y tercer tercil de la exposición, respectivamente. Además, se observó una interacción estadísticamente significativa entre *p, p'*-DDE y el IMC, de tal manera que el riesgo de diabetes aumenta con terciles de la exposición de manera lineal en sujetos no obesos, pero no en los obesos, en los que se observó un patrón de forma de U invertida.

2. Introducción

2.1 Contaminantes Orgánicos Persistentes

Los *Contaminantes Orgánicos Persistentes* (COPs, o POPs en sus siglas en inglés), se definen como compuestos orgánicos, generalmente de origen antropogénico, muy resistentes a la degradación fotolítica, química y biológica. Suelen ser compuestos halogenados y en la mayor parte de las veces clorados de ahí el nombre de compuestos organoclorados (OCs). El enlace halógeno-carbono es muy estable y para el caso del cloro más estable que el resto de los compuestos halogenados. El cloro unido a un anillo aromático es más estable a la hidrólisis que el de las estructuras alifáticas. Además, cuanto mayor es el número de sustituciones de cloro y/o grupos funcionales, más elevada es la resistencia a la degradación biológica y fotolítica. El mayor grado de halogenación confiere a estos compuestos, una solubilidad muy baja en agua y alta en lípidos lo que les permite, entre otras propiedades, pasar fácilmente a través de la estructura fosfolipídica de las membranas biológicas, como la membrana celular, y acumularse en los depósitos de grasa. Consecuencia de la bioacumulación es la biomagnificación en la cadena trófica. Muchos de los COPs se caracterizan, además, por ser semi-volátiles, por lo que se han identificado en prácticamente todos los compartimientos ambientales desde agua, lluvia, nieve, aire, sedimento hasta suelos, y en todas las zonas del planeta, incluyendo aquellas muy alejadas de donde se han producido y/o usado.

En la actualidad, los COPs incluyen una amplia variedad de compuestos químicos con estructuras muy diversas, que tienen o han tenido usos muy diversos en agricultura y en industria. Por ejemplo, están presentes en transformadores eléctricos, en la formulación de plaguicidas y pinturas, o formando parte de residuos industriales de muy variada procedencia. Ejemplos de COPs son los plaguicidas organoclorados, policloro-bifenilos PCBs, dioxinas, furanos y los compuestos aromáticos policíclicos (PAH) entre los organoclorados y los polibromo difeniléteres (PBDEs) y sulfonato de perfluorooctano (PFO) y derivados del ácido perfluorooctanoico (PFOAs), como muestra de organobromados y fluorados.

El diclorodifeniltricloroetano (DDT) es uno de los plaguicidas organoclorados más conocidos en todo el mundo. Se utilizó como insecticida para el control de vectores, hasta la década de 1970 (van den Berg, 2009), y actualmente está en uso en algunos

países como Marruecos y México (Zumbado et al., 2005). Tanto en el medio ambiente y los organismos vivos, el DDT se degrada principalmente a *p, p'*-diclorodifenildicloroetileno (*p, p'*-DDE), que es incluso más persistente que el compuesto original (OMS, 1979), y tiene una vida media estimada de 7 a 8,6 años en los organismos vivos (Kirman et al., 2011;Saoudi et al., 2014) (tabla 1). Se ha demostrado que el *p, p'*-DDE interactúa con los receptores de andrógenos, como antagonista en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Li et al., 2008), así como con los receptores de estrógenos, compitiendo por el receptor y mimetizando la actividad estrogénica en ensayos *in vitro* (Soto et al., 1995).

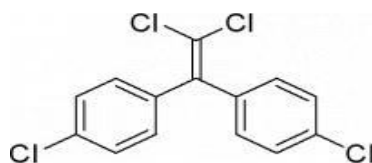
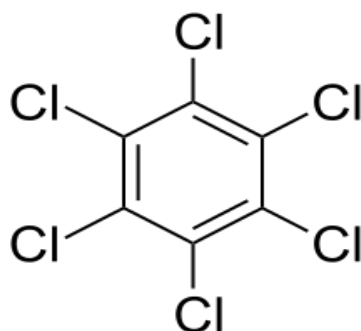


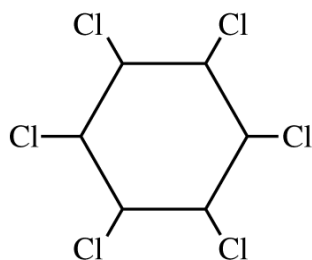
Figura 1. Estructura química de *p, p'*-Diclorodifenildicloroetileno (*p, p'*-DDE). Fuente wikipedia (<https://es.wikipedia.org/>)

El hexaclorobenceno (HCB) fue utilizado como fungicida para cereales, y se libera en la actualidad durante ciertos procesos industriales, como en la quema de residuos, la industria del cloro-álcali, y plantas de preservación de la madera (Addae et al., 2013;Aurrekoetxea Agirre et al., 2011). La vida media del HCB en compartimentos grasos del organismo humano se ha estimado en aproximadamente 6 años (Hardell et al., 2010;Mrema et al., 2013) (tabla 1). El HCB es un conocido antagonista del receptor de andrógenos (Li et al., 2008). En los seres humanos, la exposición a HCB puede afectar a diversos órganos, como el hígado y la piel (ATSDR, 1996). Existen algunos estudios que relacionan los niveles de HCB con el riesgo de padecer porfiria (Billi de Catabbi et al., 2005;Freire et al., 2015). Además, investigaciones recientes sugieren que la exposición a bajos niveles de HCB puede afectar negativamente al desarrollo neurológico y conductual de los niños (Liu and Schelar, 2012) y otros reportan una asociación negativa con los niveles de hormonas tiroideas (Meeker et al., 2007;Schell et al., 2008)



*Figura 2. Estructura química del hexaclorobenceno (HCB). Fuente wikipedia
(<https://es.wikipedia.org/>)*

Se conoce como HCH técnico a una mezcla de isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), de los cuales el isómero γ o lindano es el de mayor actividad insecticida. El isómero β -HCH es el que se detecta más frecuentemente en humanos, así como en las plantas y animales que nos sirven de alimento (Aurrekoetxea Agirre et al., 2011) debido, probablemente, a su mayor resistencia a la degradación química y metabolización en los organismos vivos (Hayes and Laws, 1991). El lindano se ha usado como control de plagas e incluso en productos de higiene personal. Se ha demostrado que el lindano se acumula en tejidos grasos del organismo y es absorbido por vía respiratoria, cutánea y gastrointestinal. Sus propiedades estrogénicas han sido demostradas en ensayos in vitro (Steinmetz et al., 1996), así como posibles efectos cancerígenos en ensayos con animales (IARC, 1998). El isómero β puede acumularse en el organismo con una vida media de 7.2-7.6 años (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005) (tabla 1).



*Figura 3. Estructura química del hexaclorociclohexano (HCH). Fuente: wikipedia
(<https://es.wikipedia.org/>)*

Los PCBs incluyen un amplio grupo de contaminantes en el que teóricamente podrían existir 209 congéneres (según la posición y el grado de sustitución del cloro), y que se han utilizado en la industria con varias funciones como aislante térmico o refrigerante, en pinturas y en las instalaciones eléctricas (ATSDR, 2000). El uso de PCBs está prohibido en España desde 1986, pero aún se encuentran comúnmente en el medio ambiente, en maquinarias y residuos industriales obsoletos, construcciones en las cuales se permitió su uso y en los seres vivos (Agudo et al., 2009; Birnbaum and Staskal-Wikoff, 2010). Las concentraciones de tres de estos congéneres, PCB-138, PCB-153, y el PCB-180, son frecuentemente utilizados como biomarcadores de la exposición total de los PCB en la población no ocupacionalmente expuesta, dado que se ha demostrado que suponen el 50% de la exposición total a PCBs la población en general (Apostoli et al., 2005; Covaci et al., 2008; Donato et al., 2008). Hay una gran variación en las vidas medias entre los diferentes congéneres de PCBs en función del número y posición de los átomos de cloro, desde unos pocos días hasta incluso 17 años días dependiendo del congénere (Hardell et al., 2010) (tabla 1).

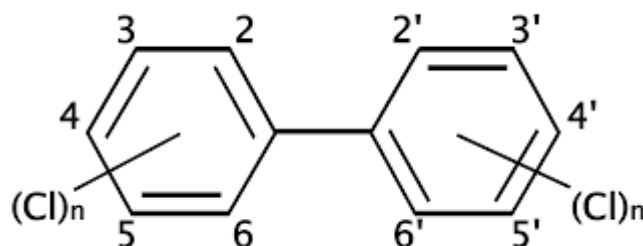


Figura 4. Modelo de estructura química general de los bifenilos policlorados PCBs.

Fuente: wikipedia (<https://es.wikipedia.org/>)

A pesar de que estas sustancias han demostrado ser eficaces en sus distintos usos, su persistencia y capacidad de bioacumulación en las especies animales han hecho sospechar acerca de sus posibles efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana. Existen datos en numerosos estudios que asocian la presencia de COPs con efectos negativos en la salud y con algunas enfermedades como alteraciones en el desarrollo, cáncer de mama y próstata, obesidad o diabetes.

El 17 de mayo del 2004 entró en vigor el Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes (SCPOP, 2001). Se trata de un acuerdo internacional en el que los países firmantes se comprometen a regular el tratamiento de estas sustancias químicas persistentes y potencialmente tóxicas. Inicialmente el convenio regulaba doce productos químicos conocidos como la docena sucia, que incluía plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados, dioxinas y furanos. Actualmente el convenio incluye más de 21 compuestos y lo han ratificado un total de 178 países. España lo ratificó el 28 de mayo de 2004, entrando en vigor el 26 de agosto del mismo año. Bolivia es el primer país de América del Sur en haber ratificado el Convenio en América del Sur en octubre del año 2003.

2.2 Toxicidad y mecanismos de acción de los COPs

2.2.1 Absorción

Teniendo en cuenta las características de ubicuidad y lipofilia, se han descrito diversas vías potenciales de absorción de COPs.

-Sistema respiratorio. Las vías respiratorias superiores (nariz, boca, laringe y faringe) constituyen el punto de entrada importante dado que hay una considerable superficie de absorción y una barrera frágil. Los COPs son sustancias semi-volátiles, lo cual les permite presentarse en la fase de vapor o adsorbidos sobre partículas aéreas. Los COPs que son capaces de alcanzar el organismo por esta vía, normalmente lo hacen en forma de vapor o aerosol, penetra en el organismo a través de las vías respiratorias. Una vez en los alvéolos pulmonares, los tóxicos pueden absorberse por diferentes mecanismos, difusión pasiva, fagocitosis, o difusión linfática, siendo ésta última la más grave, ya que la toxina llega rápidamente a la sangre a través de la circulación. Por lo tanto, la exposición por vía respiratoria se lleva a cabo principalmente a través de la inhalación del aire en el interior de viviendas o lugares de trabajo, por lo que esta vía es muy relevante en la exposición ocupacional (ATSDR, 2000; Zumbado et al., 2005) .

-Piel. La capa mas externa de la piel, el estrato córneo, se presenta como una gran barrera para el paso de numerosas sustancias. El paso representa casi en su totalidad como un proceso de difusión pasiva. En general, la difusión a través de la piel es

directamente proporcional a su liposolubilidad e inversamente proporcional a su peso molecular, por lo que puede ser relevante para la exposición a COPs, ya que muchos son moléculas liposolubles y de bajo peso molecular (Nielsen et al., 2004). Se han descrito algunos ejemplos de absorción cutánea de algunos pesticidas organoclorados como los ciclodienos (p.ej., dieldrin) (Ferrer, 2003). El HCH, por ejemplo, tiene una absorción cutánea estimada en 9.8% (Bhalla and Thami, 2004; Feldmann and Maibach, 1974), lo cual indica una exposición preocupante en personas expuestas ocupacionalmente. La vía dérmica es muy importante en exposiciones laborales, sobre todo cuando la protección es inadecuada.

-Sistema digestivo. Los COPs son contaminantes ambientales que, por sus características lipofílicas y su resistencia a la degradación, se convierten en parte de la cadena alimentaria, donde tienden a bioacumularse principalmente en los alimentos grasos. Por lo tanto, la dieta está considerada como la principal vía de exposición para la mayor parte de la población no expuesta de forma ocupacional (Darnerud et al., 2006; WHO, 2003). Aunque los cálculos sobre la ingesta dependen de los hábitos de consumo y el tipo de alimento, las mayores concentraciones de COPs suelen encontrarse en los alimentos grasos de origen animal, sobre todo en los pescados grasos de gran tamaño (Darnerud et al., 2006; Gasull et al., 2011; Llobet et al., 2003)

La absorción digestiva se ve favorecida con una mayor liposolubilidad del contaminante, ya que esta propiedad permite una mejor difusión pasiva a través de las membranas del epitelio intestinal. Sin embargo, una liposolubilidad demasiado elevada provocará que estos compuestos no se dispersen adecuadamente en los fluidos biológicos (que son generalmente polares), por lo que su difusión en el organismo puede verse disminuida. Además, el tiempo de permanencia en el tubo digestivo es un factor importante, ya que la absorción de una sustancia será mayor cuanto mayor sea su tiempo de contacto con las paredes del tubo digestivo.

-Vía transplacentaria o a través de la leche materna. Podemos estimar esta vía tanto de excreción para las madres como de exposición en fetos y lactantes. Se considera que la exposición humana a COPs se inicia en el período de la vida uterina mediante transferencia transplacentaria (Rogan et al., 1986). La placenta puede evitar la transferencia de algunos contaminantes, pero hay pruebas de que los COPs, incluso los

de alto peso molecular, pueden llegar al feto (Vizcaino et al., 2011). Además, muchos COPs se excretan a través de la leche materna (Jensen, 1983), lo que convierte esta vía en una de las más importantes en cuanto a exposición en lactantes (Campoy et al., 2001;Cerrillo et al., 2006).

2.2. 2 Distribución

Una vez absorbidos, los COPs siguen un modelo de distribución tricompartmental. Es decir, alcanzan los órganos a través del torrente sanguíneo y se almacenan en los tejidos con mayor porcentaje graso, como es el tejido adiposo. Cuanto mayor es el número de sustituciones halogenadas del compuesto, mayor es su capacidad de bioacumulación, pudiéndose almacenar en tejido graso durante años (Yu et al., 2011) (tabla 1). Esta acumulación en el tejido graso explica por qué se encuentran concentraciones mayores en las poblaciones que en el medio donde habitan. En el organismo, las sustancias almacenadas se encuentran en equilibrio con las circulantes manteniendo una exposición crónica, de manera que pueden dar lugar a exposiciones agudas a raíz de una liberación repentina de COPs desde los tejidos grasos, como consecuencia, por ejemplo, de una pérdida de peso acentuada.

COP	Bioacumulación (años)
<i>p,p'</i> -DDE	7 - 8,6
β -HCB	7,2-7,6
HCH	7,5
PCBs	0,12 -17

Tabla 1. Tiempo estimado de vida media de COPs en los seres humanos.

Los COPs se movilizan a través de la sangre ligados a lipoproteínas en una unión reversible (Hjelmborg et al., 2008) estableciéndose un equilibrio entre los diferentes compartimentos del organismo. Como los factores determinantes de la

biodisponibilidad de los COPs en el organismo son la persistencia y lipofilia, situaciones como una gran pérdida de peso podría liberar ciertas cantidades de COPs almacenadas en el tejido adiposo y elevar las concentraciones de COPs en la sangre. Del mismo modo, una exposición reciente y puntual a COPs también contribuye a niveles más altos en la sangre (Arrebola et al., 2012a;Crinnion, 2009). En ciertas circunstancias, los niveles de COPs en distintas matrices del organismo pueden tener diferentes significados biológicos, de manera que las concentraciones encontradas en tejido adiposo son buenos indicadores de la exposición acumulada a lo largo de los años (Kohlmeier and Kohlmeier, 1995;Pearce et al., 1995), mientras que los niveles séricos se consideran un resultado las exposiciones recientes y de la movilización de los COPs de los tejidos grasos (Archibeque-Engle et al., 1997;Crinnion, 2009). Además, la afinidad particular de uno de estos compuestos por un órgano o tejido termina su distribución (Yu et al., 2011;Zeliger, 2013)

2.2. 3 Mecanismos de acción

Dependiendo de la duración y el nivel de exposición a COPs, podemos distinguir existen dos tipos de toxicidad causada por estos contaminantes:

- Aguda: normalmente está causada por una exposición puntual a niveles elevados de una sustancia química, y tiene lugar a las pocas horas de haber estado en contacto con la misma. Hoy en día estas intoxicaciones están ampliamente descritas. Los síntomas pueden ser muy diversos, y pueden incluir dolores de cabeza, mareos, vómitos, dolor de estómago, irritaciones de la piel, diarrea, dificultad para respirar, cansancio, desmayo e incluso la muerte.

- Crónica: suele tener lugar a niveles de exposición bajos o medios, durante largos períodos de tiempo. Las intoxicaciones crónicas suelen ser más problemáticas a la hora de determinar su origen, ya que la exposición a múltiples sustancias químicas, así como la distancia temporal entre la exposición y los primeros síntomas de la enfermedad dificulta el establecimiento de un vínculo causal. El elevado número de sustancias químicas que se encuentran en nuestro entorno actual dificulta en gran medida la determinación de los mecanismos de acción de cada una de ellas (Colborn, 1995). De hecho, numerosos autores defiende que la toxicidad crónica derivada de la exposición humana a COPs no ha sido suficientemente estudiada (Porta et al.,

2002;Porta et al., 2003). Dentro de este contexto de exposición crónica y toxicidad a largo plazo, el presente trabajo de tesis doctoral se centra en las patologías derivadas de la exposición a bajas dosis de COPs durante largos períodos de tiempo.

2.2.3.1 Disrupción endocrina

Se ha acuñado el término de *disruptor endocrino* (DE) para definir al compuesto químico capaz de interaccionar con el sistema hormonal de animales y humanos, alterando la homeostasis hormonal. Según la OMS, un disruptor endocrino es aquella sustancia química exógena que tiene efectos adversos para la salud de un organismo intacto o su descendencia, como consecuencia de cambios en la función endocrina.

La lista de sustancias químicas que actúan mimetizando las hormonas endógenas supera los 1500 compuestos y continúa creciendo. Además, muchos de ellos se han usado desde los años '30 y otros están actualmente en uso en la mayoría de países, como ocurre con los PFOs y PFOAs en recubrimientos para sartenes, ropa impermeable o espuma anti-incendios.

Así como las hormonas endógenas se agrupan teniendo distintas vías, mecanismos de acción, regulación y efectos en el organismo, los DEs abarcan numerosas vías farmacocinéticas que dependen en gran medida de sus características físico-químicas. Una vez dentro del organismo, los DE pueden alterar el mensaje hormonal de diversas formas ya que pueden mimetizar la hormona ocupando su lugar, bloquear su acción compitiendo por la unión al receptor específico, o modificar la síntesis de la hormona o del receptor correspondiente (Nadal et al., 2000;Sonnenschein and Soto, 1998). Como consecuencia, se produce una modificación de la homeostasis hormonal que puede tener consecuencias adversas en sistemas y aparatos cuyo correcto desarrollo y funcionamiento depende de la concentración de determinadas hormonas (Olea and Fernandez, 2007).

La presencia medioambiental de sustancias que se comportan como las hormonas naturales se constató inicialmente en 1979 en la conferencia *Estrogens in the Environment I* celebrada en el instituto Nacional de Salud y Medioambiente Americano (NIEHS), corroborando efectos en la salud años más tarde, en 1985 en la segunda conferencia, *Estrogens in the Environment II*. Con el paso del tiempo, se constató que

muchas sustancias químicas de uso habitual pueden comportarse como DEs y que, por lo tanto, la exposición humana es generalizada e inadvertida. En 1991 se acuñó por primera vez el término DE, en la *Conferencia de Wingspread* y posteriormente en Weybridge (UK) se acuñó el término DE y se sentaron las bases de este campo de la toxicología.

Son características de los DEs:

- La actuación a concentraciones muy bajas. Es difícil establecer un nivel umbral de toxicidad (NOAEL) (Kortenkamp et al., 2007). Esta característica le confiere a los DEs una especial peligrosidad ya que no existen dosis seguras como en el caso de otros tóxicos.
- Existen periodos del desarrollo en el que los seres humanos son especialmente vulnerables a la disrupción endocrina, provocando daños que pueden causar importantes efectos sobre la salud a lo largo de toda la vida.
- En numerosas ocasiones, su relación dosis-efecto no es lineal, es decir, la respuesta no siempre aumenta en la misma proporción que la dosis de exposición.
- Generalmente, los seres vivos no están expuestos a un solo tipo de compuesto, sino a las mezclas de ellos cuyos efectos son más difíciles de predecir dadas las posibles acciones sinérgicas, aditivas o antagónicas.
- La exposición a DEs en las personas puede tener consecuencias adversas para generaciones posteriores, como se ha podido observar en distintos episodios de contaminación en poblaciones humanas (Anway and Skinner, 2006; Skinner and Guerrero-Bosagna, 2009) y en experimentación (Soto et al., 1992).
- Los efectos pueden tener largos periodos de latencia, lo que distancia la exposición del efecto y dificulta en gran medida el establecimiento de una asociación causal.
- La ubiquidad de la exposición a DEs es un hecho constatado. Debido a su persistencia, se pueden encontrar en agua, tierra, aire y en seres vivos. Los DEs

se han encontrado en los lugares más remotos del planeta y sin que pueda asociarse a una actividad humana local contaminante.

Ciertos COPs pueden ejercer un efecto disruptor endocrino a través de su interacción con los receptores estrogénicos (RE), receptores nucleares de las hormonas estrogénicas (Shanle and Xu, 2011). Existen dos formas diferentes del RE, normalmente referidas como las formas α y β , ambas codificadas por genes diferentes e independientes y con ciertas diferencias de expresión en distintos tejidos. Las hormonas esteroideas pueden atravesar la membrana plasmática de la célula, con lo que los receptores no necesitan estar anclados a membrana para unirse al estrógeno. A la luz de la gran variedad de estructuras diversas de compuestos que se unen a los RE, desarrollar un método fiable para predecir la afinidad de la unión RE-DE es una herramienta de gran valor. Existen varios enfoques para calcular las afinidades de unión de ligandos, que van desde los estudios de análisis comparativo basado ligando del campo molecular, relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) que correlaciona los análisis sobre la estructura química y una actividad biológica específica cuyos modelos derivados, se utilizan para predecir actividades de los productos químicos no testados (Tong et al., 1997), a métodos basados en proteínas, que utilizan funciones de puntuación empíricas (Bissantz et al., 2000) y simulaciones de dinámica molecular, utilizando métodos de liberación de energía libre (Oostenbrink et al., 2000). Sin embargo, la predicción exacta de la afinidad de unión de los estrógenos exógenos es difícil, ya que la mayoría de los enfoques están limitados en su aplicabilidad a compuestos que tienen una estructura de básica común y no todos están basados en la fórmula química del ciclopentano-perhidro-fenantreno (ver figuras 1, 2,3 y 4). Además, hay que tener en cuenta la orientación espacial molecular que favorece la unión del receptor con el compuesto activo (Kobayashi et al., 2001;van Lipzig et al., 2004).

Los DE interfieren con el funcionamiento de receptores cuya función normal es mediar los efectos de las hormonas esteroideas endógenas (Colborn et al., 1993). Los efectos citotóxicos de altas concentraciones de ligandos con los receptores nucleares (RN) son el modo más común de acción responsable de las curvas dosis-respuesta no-monotónicas en estudios experimentales, y son a menudo el resultado de acciones no

específicas (Cookman and Belcher, 2014). La función de los RN es la de actuar como ligandos para los factores de transcripción (actividad genómica), que actúan en el núcleo después de la unión con una hormona endógena o DE. El ligando unido al RN interactúa con secuencias específicas de ADN denominadas elementos hormonosensibles y en cooperación con un co-regulador proteico, regulan la unión de los complejos múltiples de proteína transcripcional que finalmente modula la transcripción de genes dependientes. Estos co-reguladores incluyen co-activadores y co-represores que facilitan la unión del complejo con el receptor nuclear para aumentar o reprimir la expresión de los genes diana (Kininis and Kraus, 2008). Los RN también puede modular la actividad transcripcional (actividad no genómica) a través de ligando, estos mecanismos independientes implican al receptor específico de fosforilación. En el caso del RE α , la fosforilación del dominio AF1 (serina 118) da como resultado que su actividad transcripcional sea independiente de la unión con el estrógeno (Zhang and Trudeau, 2006). La unión del ligando a un NR activo puede actuar como un agonista inverso, lo que resulta en una disminución de las actividades. En el caso del receptor de la hormona tiroidea, se reprime la transcripción por la unión de otro ligando distinto a la hormona tiroidea y también se puede considerar este hecho como una forma negativa de la propia actividad constitutiva (Brent, 2012).

Además de los mecanismos mencionados, que son los más frecuentes, los DEs pueden actuar modificando el metabolismo hormonal. Los PCBs y algunos plaguicidas organoclorados, pueden actuar sobre la ruta metabólica del estradiol, aumentando la concentración plasmática de dicho esteroide, impidiendo su síntesis, aumentando la velocidad de degradación, entre otras acciones. También pueden modificar el número de receptores hormonales en la célula. Es un mecanismo de control complejo. Un DE puede reducir o incrementar el número de receptores y, por lo tanto, afectar a la capacidad de respuesta a las hormonas naturales, sintéticas o DE. Por ejemplo, el beta-hexaclorociclohexano (β -HCH) produce respuestas estrogénicas -división y crecimiento celular- a concentraciones encontradas en el tejido adyacente al cáncer de mama, no mediante su unión al RE sino a través de la transcripción de ADN mimetizando la respuesta estrogénica. Por otro lado, el *p,p'*-DDT, a concentraciones aun menores a las encontradas en el tejido graso mamario, activa una mezcla compleja de proteínas de señalización celular (Receptores de factores de crecimiento) conduciendo a la división

celular. Sin embargo, el *p,p'*-DDT si se puede receptor de andrógenos (RA) y actuar competitivamente con el ligando natural. De este modo, el mismo compuesto puede influir en el sistema endocrino de diferentes formas (Kelce et al., 1995).

La toxicidad es un fenómeno complejo en el que finalmente se evidencia un daño al organismo que está en contacto con la sustancia tóxica. La medida de los efectos se investiga mediante estudios de dosis respuesta que pueden adoptar patrones de relación lineal y no-lineal. Dentro de estas últimas se describen curvas dosis-respuesta no-monotónicas en forma de “U”, incluso una morfología de “U” invertida (Cookman and Belcher, 2014) que añade una mayor dificultad a la interpretación de la relación exposición y efecto.

Cualquier relación dosis-respuesta cuya curva se ajuste a una pendiente que cambia de signo (dirección) a lo largo de un rango de dosis definida, se clasificaría como no-monotónica. En el rango de concentración examinado en muchos estudios, estas curvas no monótonicas son observadas a menudo como una curva en forma de “U” invertida caracterizadas por una dosis intermedia que tiene un efecto que no es observable mayor o menor dosis. De cualquier manera, las curvas no-monotónicas también pueden poseer múltiples puntos de inflexión indicando una complejidad adicional (Vandenberg et al., 2012). Por ejemplo, Lee et al. (2011b) describieron asociaciones significativas entre bajos niveles de exposición a COPs y las concentraciones de lípidos plasmáticos (por ejemplo, triglicéridos y HDL) en una muestra de individuos no diabéticos. Sin embargo, los efectos sobre la salud de la exposición humana a crónica dosis bajas de COPs continúan siendo poco conocidos (Porta et al., 2008) y se han descrito algunos resultados paradójicos, con mayores efectos de baja de dosis altas en algunos casos (Hennig et al., 2002). Además, se ha demostrado que mezclas con dosis por debajo de NOAEL, son capaces de evidenciar un efecto considerable (Auxietre et al., 2014;Kortenkamp et al., 2007)

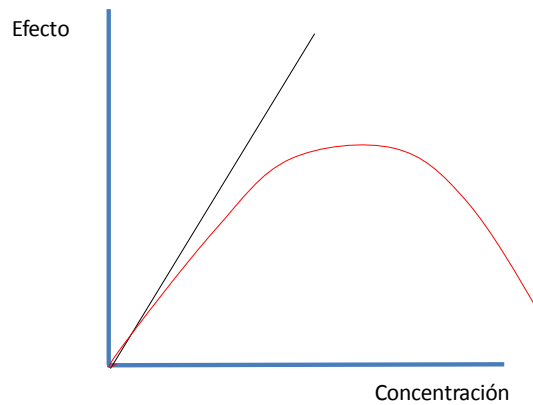


Figura 5. Ejemplo de respuesta monotónica (negro) y no monotónica (rojo).

2.2.3.2 Actividad epigenética

El efecto de la epigenética es el fenómeno molecular que regula la expresión génica sin presentar alteraciones en la secuencia de ADN (Jones and Takai, 2001). En términos biológicos, está demostrada la existencia de metilaciones a nivel de las histonas de la misma cadena de ADN, lo que provoca cambios en la estructura e impedimentos a nivel de expresión génica, que pueden derivar en diversas enfermedades. Aunque este es el mecanismo de acción más frecuente, hay otras formas de control epigenético como acetilaciones y otras modificaciones químicas (Skinner and Guerrero-Bosagna, 2009).

Un número creciente de estudios vinculan la exposición a PCBs o plaguicidas organoclorados, como el mirex, clordano o *p,p'*-DDE, con distintos cambios epigenéticos en humanos (Collotta et al., 2013; Hou et al., 2012; Perera and Herbstman, 2011). Las generaciones actuales pueden experimentar cambios epigenéticos debido a la exposición a COPs en el útero materno o incluso desde óvulo alterado o espermatozoides de sus padres o abuelos; la exposición fetal a contaminantes del medio ambiente como los COPs, pueden causar cambios epigenéticos con efectos transgeneracionales (Lee et al., 2007a; Titus-Ernstoff et al., 2008; Titus-Ernstoff et al., 2006). De hecho, las alteraciones epigenéticas se han propuesto como un mecanismo importante en la patogénesis de la diabetes tipo 2 o la aterosclerosis (Lee et al., 2007a).

Según el estudio de Rusiecki et al (2008) en una población altamente expuesta, existe una fuerte correlación entre el aumento de los niveles séricos de los COPs e

hipometilación del ADN global, que es un patrón epigenético aberrante en las células tumorales malignas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la exposición a los COPs puede inducir la metilación del ADN. Este estudio cuantifica y evalúa la exposición biológica a COPs en una población con algunos de los más altos niveles en el mundo, además de llevar a cabo una metodología para ponderar el rendimiento de la metilación del ADN.

En el año 1976, se produjo un accidente y la población de Seveso (Italia), sufrió un accidente en una planta química en 1976, exponiéndose a una alta concentración de dioxinas (Chevrier et al., 2014). Las mujeres expuestas tuvieron problemas para quedarse embarazadas y aumentaron los casos de esterilidad. Se observó posteriormente que aquellas que eran niñas en el momento del accidente, presentaban el doble de posibilidades de sufrir un síndrome metabólico y muchas de las nietas de las mujeres expuestas tenían alterada su función tiroidea. Los mecanismos de regulación epigenética tratan de explicar algunos de los fenómenos observados.

2.2.3.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un cambio del balance redox celular hacia un valor más oxidativo (más negativo) del potencial electroquímico, que favorece la producción de peróxidos y radicales libres, causantes del daño celular. Es uno de los desencadenantes principales en la inducción de apoptosis (Kannan and Jain, 2000;Perez-Maldonado et al., 2005). Se sospecha de muchos pesticidas como posibles candidatos a este mecanismo de acción tóxico capaz de desencadenar la apoptosis a través de alteraciones en la homeostasis redox generados por una disminución de las defensas en antioxidantes y por la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Un exceso de producción de ERO conduce a procesos tales como modificaciones oxidativas de proteínas de señalización, daño oxidativo del ADN, estrés en el retículo endoplasmático y alteraciones en la función mitocondrial, que a su vez desencadenan la activación de cascadas de señalización específicas.

La exposición a ciertos pesticidas trae como consecuencia la activación de respuestas de supervivencia tales como los mecanismos de reparación del ADN, las proteínas-quinasa, cascadas de señalización y regulación de las defensas antioxidantes en un intento de hacer frente y contrarrestar los efectos nocivos de mayores niveles de especies reactivas

intracelulares que a su vez activan las vías de muerte celular apoptótica. En la mayoría de los casos las cascadas apoptóticas y de señalización se activan simultáneamente en respuesta a la exposición a los pesticidas (Mrema et al., 2013). Por ejemplo, los PCBs pueden inducir estrés oxidativo en las células endoteliales mediante la estimulación del proceso inflamatorio (Choi et al., 2003).

2.2.4 Metabolismo y Excreción

La ruta principal de excreción de los COPs en el organismo humano es la biliar. Aunque casi todos los OCs producen metabolitos urinarios medibles, desafortunadamente, muchos de los pesticidas sin metabolizar son reabsorbidos con eficiencia por el intestino (a través de la circulación enterohepática), lo cual retarda substancialmente la excreción fecal. La mayoría de los COPs son, en cierto grado, de-clorados, oxidados y, después, conjugados. Los COPs sufren distintas metabolizaciones de hidrólisis y conjugación dependiendo de su estructura química. En el riñón, los contaminantes más lipofílicos presentes en el filtrado pueden atravesar por difusión pasiva las paredes del túbulo proximal y distal, reabsorbiéndose por esta vía. Dado que el proceso de difusión pasiva tiene lugar a favor de gradiente, puede dar lugar tanto a mecanismos de eliminación como de absorción. Por ejemplo, la existencia de DDT en el organismo activa las enzimas microsomiales hepáticas que inducen una deshalogenación en la molécula, transformando el DDT en su principal metabolito, el DDE, que se excreta principalmente a través de las vías biliares o la leche materna (Barquero and Constenla, 1986). La conjugación de HCB con glutatión lleva a la formación de metabolitos sulfurados hidrosolubles que se eliminan por orina (To-Figueras et al., 1997). En numerosos estudios de biomonitorización se incluyen estos análisis en orina para observar la contaminación en una población determinada (Berk et al., 2014; Forde and Dewailly, 2015). Otras vías de excreción incluyen leche materna, aire expirado o sudor.

Uno de los puntos más estudiados en este aspecto es la oxidación moderada enzimáticamente por el citocromo P-450. Las isoformas del citocromo P-450 (CYP) poseen funciones que van desde la síntesis y degradación de las hormonas endógenas esteroideas, vitaminas y derivados de los ácidos grasos (xenobióticos), al metabolismo de los compuestos exógenos tales como drogas, contaminantes ambientales, y carcinógenos. Las isoformas del citocromo P450 catalizan tanto la formación y la

degradación de estos ligandos. Algunos compuestos exógenos, entre ellos los DE, pueden actuar como activadores de los receptores nucleares y celulares (Honkakoski and Negishi, 2000). El resultado del metabolismo de estos compuestos puede dar lugar a metabolitos más activos que su compuesto origen (como el ya mencionado de DDT y DDE). A su vez, uno de los objetivos de los factores de transcripción más estudiado, del que depende la isoforma citocromo P450 (CYP) 1A1 (Shanle and Xu, 2011; Whitlock, Jr., 1999). Por ejemplo, la alta afinidad de 2, 3, 7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) por el factor de transcripción, hace que sea el inductor más potente de expresión CYP1A1 y es un conocido DE (Shanle and Xu, 2011; Whitlock, Jr., 1999).

2.3. Dos efectos para la salud asociados a la exposición a COPs: Disrupción endocrina y Enfermedad metabólica.

2.3.1 Efectos sobre el sistema endocrino

La hipótesis patogénica subyacente en disrupción endocrina explica que algunos COPs se comportan como hormonas, alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos, u hormonas tiroideas, a través de diversos mecanismos de acción (Miller and Sharpe, 1998; Olea et al., 2001).

Los receptores hormonales pueden ser estimulados en dosis bajas e inhibidos en dosis altas a través de mecanismos de acción conocidos como puede ser la retroalimentación negativa, citotoxicidad, competición por el receptor o desensibilización de los receptores implicados (Schmidt, 2001; Vandenberg et al., 2012). Estos fenómenos abarcan todos los niveles de la organización biológica, desde la expresión génica y la producción de hormonas, hasta los riesgos de enfermedades para una población. La aceptación de estos fenómenos, por lo tanto, debería conducir a cambios de paradigma en los estudios toxicológicos (Vandenberg et al., 2012). De hecho, en terapia clínica se usa este resultado, regulando las dosis hormonales para conseguir el efecto deseado (Schmidt, 2001), por ejemplo, con el tratamiento con estrógenos en cáncer de mama hormono-dependiente.

Si bien en especies animales la asociación entre exposición a DE y trastornos en el comportamiento, alteraciones en el desarrollo y riesgo de enfermedad, es un hecho probado (Addae et al., 2013; Ahlborg et al., 1995; Cabral et al., 1977), en la especie humana es complicado establecer una relación directa causa-efecto, puesto que todos los seres humanos están expuestos a algún tipo de contaminante y debido también a que muchos efectos sólo son visibles mucho después de ocurriera la exposición. No obstante, existen algunos ejemplos que parecen evidenciar una acción perjudicial sobre la salud humana (Juberg, 2000). Los datos epidemiológicos muestran que los desórdenes de carácter reproductivo, se han incrementado durante los últimos cuarenta años, entre ellos: la caída significativa del recuento espermático en el hombre (Swan et al., 2003), el incremento de las alteraciones en el desarrollo del sistema genitourinario masculino, y cáncer de testículo (Bhatia et al., 2005; Chowdhury et al., 1987; Fernandez et al., 2007a; Main et al., 2010), el incremento de cáncer de dependencia hormonal en la mujer (mama y ovario) (Ahlborg et al., 1995; Aronson et al., 2000; Kandaraki et al., 2011) y el aumento de la incidencia de los casos de esterilidad ligada a endometriosis, entre otras, que podrían estar relacionados con la exposición inadvertida a los DE. Más recientemente, el incremento de trastornos tan frecuentes como trastornos en el neurodesarrollo, obesidad, diabetes y síndrome metabólico (Airaksinen et al., 2011; Eriksson and Talts, 2000; Uemura et al., 2009) empiezan a mostrar una relación con la exposición humana a DE.

La exposición a DE no tiene la misma repercusión sobre todos los individuos expuestos. Destacan, como un momento crítico, las etapas embrionaria, fetal y la primera infancia (Olea and Fernandez, 2007). Se cree que la exposición uterina tiene consecuencias de tal magnitud que difícilmente se sospecharían en estudios realizados sobre individuos adultos. Esta asociación confiere a la exposición materna unas peculiaridades muy particulares y coloca a la mujer en edad fértil en el centro de atención de la mayor parte de los estudios en disrupción endocrina.

La exposición a COPs se ha asociado con efectos en la salud, incluyendo cáncer (Aronson et al., 2000; Cohn et al., 2007; Recio-Vega et al., 2011), defectos reproductivos (Nicolopoulou y Stamanti, 2001) y cambios en el comportamiento (Zala y Penn, 2004). Se cree que estos efectos están relacionados con su capacidad para alterar las funciones de ciertas hormonas, enzimas, factores de crecimiento, neurotransmisores y para inducir

los genes clave implicados en el metabolismo de esteroides y xenobióticos (Gourounti et al., 2008).

Los datos epidemiológicos muestran aumentos en la incidencia y prevalencia de las enfermedades asociadas con DE, como el cáncer de mama, próstata y cáncer de testículo, la diabetes, la obesidad y la disminución de la fertilidad en los últimos 50 años. Estos incrementos podrían reflejar en parte un aumento en la probabilidad de diagnóstico y, ciertamente, no constituyen prueba de los efectos de disruptores endocrinos. La evaluación de la exposición es extremadamente difícil (De and van, 2012).

Los estudios clínico-epidemiológicos realizados hasta el momento han intentado establecer una asociación entre la exposición a DE y la frecuencia de presentación de determinadas enfermedades. Este proceso, que a priori podría parecer sencillo, requiere la definición de instrumentos para la medida de la exposición y de las variables que una vez cuantificadas permitan clasificar a los pacientes de acuerdo a su grado de exposición. La medida de exposición a DE es, más que nada, compleja. Por otro lado, no se dispone de baterías de test completas para su identificación y catalogación ya que en un principio sólo se desarrollaron para evaluar actividades hormonales estrogénicas y androgénicas, cuando las evidencias de que pueden actuar en diferentes rutas y receptores nucleares siguen aumentando dando lugar a nuevas asociaciones con enfermedades metabólicas y alteraciones cognitivas (Lee et al., 2010). Los estudios científicos muestran que la medida de compuestos químicos de forma aislada puede no ser la aproximación a la situación real de exposición humana. Las evidencias muestran un efecto combinado de la exposición a mezclas complejas de contaminantes que puede pasar por la sinergia o el antagonismo (Kortenkamp et al., 2007).

2.3.2 Implicaciones en la enfermedad metabólica

Estudios clínicos y experimentales han encontrado una relación entre la exposición humana a COPs y la prevalencia de trastornos relacionados con el síndrome metabólico (SM). El SM incluye un conjunto de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular: obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión e hiperlipidemia, que afectan alrededor del 20% de la población adulta en el mundo (Kolovou et al., 2007;Pimenta et

al., 2015) y del 31% en la población adulta española (Fernandez-Berges et al., 2012) y se mantienen al alza las previsiones de su prevalencia (Alegria et al., 2008).

Existen indicios de que diversos factores ambientales podrían estar contribuyendo al aumento de la prevalencia de obesidad a nivel mundial. De hecho, hay estudios epidemiológicos humanos que relacionan la exposición a ciertos COPs llamados obesógenos, con el desarrollo de la obesidad, que aunque ciertamente aún son limitados, integran varias asociaciones del mayor interés (Garcia-Mayor et al., 2012; Grun and Blumberg, 2009). Apoyando esta hipótesis, existe abundante evidencia en estudios con animales de laboratorio y en cultivos celulares sobre una gran variedad de DE que pueden conducir a un aumento de la adipogénesis y a un aumento de peso (Chamorro-Garcia and Blumberg, 2014; Sharpe and Drake, 2013). Además de las mencionadas alteraciones del metabolismo de lípidos, otros posibles mecanismos de acción incluyen el inducción de la hiperplasia del adipocito, la alteración del equilibrio que controla el aprovechamiento energético y la interacción con el sistema nervioso (Frye et al., 2012; Grun and Blumberg, 2009; Newbold et al., 2009). Además, estos cambios en la homeostasis lipídica son precursores de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares y pueden ser inducidos por ciertos COPs, incluso a bajas dosis (Lee et al., 2010).

El concepto de que la salud y la enfermedad de adultos tienen su base etiológica en la etapa fetal o neonatal no es única para el campo de la endocrinología. A finales de los años 80, los estudios de nutrición materna sugirieron que el ambiente fetal, como se refleja en el bajo peso al nacer y la mala nutrición, estaba relacionado con un mayor riesgo de sufrir enfermedades crónicas no transmisibles, las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, osteoporosis, etc., que sugieren la hipótesis de que las enfermedades tuvieron su origen en las etapas fetales y neonatales (Garcia-Mayor et al., 2012).

No obstante, la exposición a contaminantes ambientales sería un factor de riesgo más para el SM, al que hay que sumar a otros, como la genética, la dieta, el estrés o el ejercicio físico.

2.4. Evaluación de la exposición

El concepto de exposición, como magnitud, integra dos factores variables diferentes; la concentración o nivel de presencia del contaminante en el medio y el tiempo o duración de la propia exposición. Ambos factores tienen interés propio, por lo cual se dice que la exposición es más o menos intensa según sea la magnitud de la concentración del contaminante y se clasifican las exposiciones en agudas, sub-agudas y crónicas según su duración y frecuencia.

El grado de exposición viene dado por la dosis externa del contaminante a la que expone la población. La evaluación de la exposición se lleva a cabo por análisis cuali- y cuantitativos de los mecanismos por los que el contaminante es liberado al medio, se desplaza, y alcanza a la población.

Para que la exposición se lleve a cabo, existe una ruta medioambiental, evaluable en cada uno de sus pasos:

-Fuente de contaminación: Las fuentes de contaminación se revelan en estudios observacionales analíticos como el de Odabasi (2015), que usó el medio ambiente para analizar los compuestos y sus concentraciones alrededor de posibles fuentes. Las concentraciones disminuyeron con la distancia de las fuentes y los más bajos se midieron a los emplazamientos más alejados. La distribución espacial de los COPs indicó que las principales fuentes de la región estudiada fueron las de hierro-acero, el desguace de barcos, plantas petroquímicas y la refinería de petróleo.

-Compartimentos medioambientales: El rápido desarrollo de los sectores agrícola e industrial han ido acompañados de una amplia aplicación de plaguicidas organoclorados. Aunque, el uso de los COPs se ha prohibido o restringido en la última década, hay países que lo hicieron mucho más tarde que la mayoría o continúan en uso. Además, los residuos generados por aparatos eléctricos y electrónicos se relacionan con una alta concentración de PCB y PBDE en diferentes compartimentos ambientales (Bridgen, 2005; Eguchi et al., 2012).

En el estudio de Odabasi (2015), se obtuvieron correlaciones significativas entre las concentraciones en el aire y, el suelo, desechos, y los componentes de los árboles, sugieren la interacción de estos compartimentos con el aire. Se concluyó que las

tendencias crecientes observadas de COPs en las muestras de anillos de árboles eran representativas de las variaciones en las emisiones antropogénicas y que resultado de las concentraciones atmosféricas de la región. Estos resultados indican que los componentes de árboles, hojarasca y el suelo se podrían utilizar para determinar las variaciones espaciales mientras que los anillos de los árboles podrían ser utilizados para investigar las tendencias históricas de COP atmosféricos en una región. También se inventariaron cantidades POP almacenados en diferentes componentes del árbol, desechos y tierra. Las cantidades más altas se almacenaban en el suelo y en los árboles, lo que indicó que además de suelo, la vegetación es también un importante reservorio para los COPs.

La alta persistencia de los COPs en los suelos y la afinidad por la materia orgánica, proporcionan la condición para que el suelo se comporte como un compartimento importante de almacenamiento a largo plazo (Manz et al., 2001 y Pereira et al., 2010). Los suelos también pueden servir como fuentes secundarias cuando el clima o las perturbaciones antropogénicas producen las condiciones ambientales idóneas para la liberación de los COPs a la atmósfera (Cheng, 1990 y Nizzetto et al., 2010).

-Vía de exposición: Las aguas superficiales son clave en la definición de importantes vías de exposición para los seres humanos debido a su utilización con fines de producción de alimentos y de agua potable. Las principales fuentes de COPs para la superficie del agua incluyen los vertidos directos de los residuos y la escorrentía agrícola, deposiciones atmosféricas, y el deshielo.

La acumulación COPs en los suelos es por aplicación directa, con fines de control de plagas agrícolas o por deposición indirecta de contaminantes previamente volatilizados en las áreas de uso directo. El resultado es una exposición de los organismos del suelo y, en los organismos superiores a través de la dieta y las vías respiratorias.

Más del 80% de la ingesta total de residuos de COPs en humanos puede ser atribuida a la cadena alimentaria (Martínez et al., 1997). Existen muchas otras como la vía materna a través de la placenta en el feto y de la leche materna en el bebé. A través del aire inspirado sobretodo el lugares muy contaminados, cerca de fábricas o en grandes ciudades y vía tópica por contacto directo con el contaminante, ya que como hemos visto, son capaces de atravesar la barrera de la dermis.

-Tipo de población expuesta: Conjuntamente, todos los procesos anteriores de contaminación, bioacumulación y exposición determinan la exposición humana a cada uno de los COPs y por tanto, cuales son los niveles previsibles para un conjunto de población determinada.

2.4.1 Caracterización del riesgo

En la caracterización del riesgo, se integra la información obtenida sobre los COPs, la evaluación de la exposición y su relación dosis-respuesta, con el objeto de predecir el riesgo de sufrir efectos nocivos. Es, en otras palabras, el proceso de estimación de la incidencia de un efecto adverso sobre la salud de distintas situaciones de exposición humana para obtener medidas cuantitativas de riesgo.

La medida del riesgo para la salud humana se expresa como la probabilidad de que el efecto de la salud ocurra a consecuencia de la exposición. Para ello se sirve de los ensayos experimentales *in vitro* e *in vivo*, así como de estudios epidemiológicos, para la construcción de un perfil global de la toxicidad de los DE.

2.4.2 Biomonitorización y biomarcadores de exposición

Debido a la alta tasa de bioacumulación de COPs y su biomagnificación en la cadena trófica, los organismos vivos se utilizan a menudo como matriz integrada para la biomonitorización. El vínculo entre los organismos vivos y la exposición humana es crucial y está bien documentada (Colborn, 1995). La biomonitorización está definida como la estimación de la exposición a sustancias químicas presentes en el medio ambiente mediante la medida directa de dichas sustancias o de sus derivados en muestras biológicas (Bonefeld-Jorgensen, 2010). Es una herramienta que permite identificar posibles fuentes de exposición, estudiar relaciones entre contaminantes y efectos en la salud, identificar grupos de poblaciones vulnerables a determinados contaminantes y fijar prioridades en investigación sobre medioambiente y salud.

Todos estamos expuestos, en mayor o menor grado, a los contaminantes medioambientales. Este hecho queda patente ante la dificultad de encontrar una matriz biológica libre de compuestos exógenos. La carga biológica del ser humano tiene consecuencias directas sobre su salud e indirectas en materia de Salud Pública que hacen que este hecho sea digno de estrategias de prevención, monitorización e

intervención. Dada la complejidad química y biológica de la exposición, mecanismos de acción y efectos en salud, la búsqueda de biomarcadores, aquellos que pueden medirse objetivamente, y que indicarían si un proceso biológico es normal o patológico, es una tarea del mayor interés. Que estos biomarcadores permitan cuantificar de manera lo más objetiva posible es evidentemente necesario y aún teniendo en cuenta las mezclas complejas a las que se expone la población.

El desarrollo de biomarcadores ha arrojado luz en el campo de la epidemiología ambiental (Albertini, 1998). Existen tres tipos diferentes de biomarcadores en relación a aquellos compuestos con actividad disruptora endocrina:

- a) los biomarcadores de exposición hacen referencia a la cuantificación de contaminantes y/o sus metabolitos;
- b) los biomarcadores de susceptibilidad estudian la capacidad del organismo para adaptarse a las consecuencias derivadas de la exposición;
- c) los biomarcadores de efecto, se definen en términos de la alteración hormonal, bioquímica, fisiológica o de cualquier otro tipo que pueda ser medida y cuantificada y que, dependiendo de su magnitud, pueda ser reconocida como una desviación del patrón normal, un efecto adverso o un signo de enfermedad (Olea et al., 2002).

En esta última disposición, nuestro grupo de investigación desarrolló un bioensayo *in vitro* llamado Carga Estrogénica Total Efectiva (TEXB, de sus siglas en inglés), que compara el rendimiento celular en cultivo de líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama tratadas con estradiol, con aquellas tratadas con diferentes concentraciones de xenobióticos sospechosos de ser estrogénicos (Sonnenschein et al., 1995; Soto et al., 1995; Soto et al., 1992; Villalobos et al., 1995). De esta forma, el bioensayo puede ser utilizado como medida del efecto estrogénico total correspondiente al contenido de COPs de muestras biológicas y por tanto, se considera un marcador del efecto biológico de la exposición combinada a COPs con actividad xenoestrogénica. Niveles elevados de este biomarcador aplicado en muestras humanas se han relacionado positivamente con el riesgo de cáncer de mama, así como con malformaciones en el tracto genitourinario, alteraciones en el neurodesarrollo y bajo peso en la descendencia (Fernandez et al.,

2007a;Fernandez et al., 2007b;Vilahir et al., 2014a;Vilahir et al., 2014b;Vilahir et al., 2013).

2.5 Exposición a COPs en España

A nivel normativo, España fue uno de los primeros países firmantes en el convenio de Estocolmo en 2001, anexión que fue ratificada en 2004 y, junto con el Plan Nacional de Aplicación (PNA, 2007), promueven el establecimiento y vigilancia de los COPs.

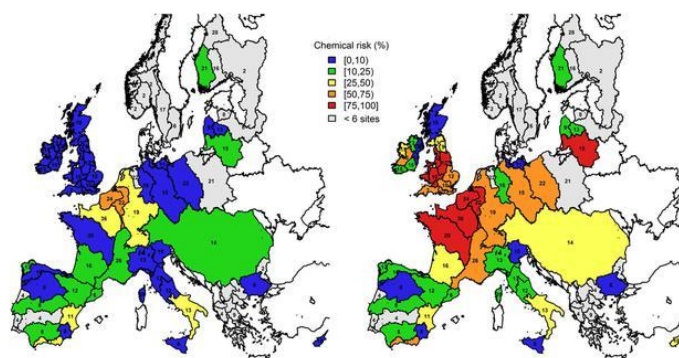


Figura 6. Regiones de las cuencas fluviales europeas con concentraciones de químicos orgánicos industriales que superan los umbrales de riesgo agudo (a la izquierda) y los umbrales de riesgo crónico (a la derecha). Las cifras indican la media del número de sustancias analizadas dentro de cada cuenca. Fuente: (Malaj et al., 2014)

Los estudios disponibles en España indican que un 80-100% de la población presenta concentraciones detectables en su organismo de *p,p'*-DDE, PCBs, HCB o HCH. Desde una perspectiva de salud pública es preocupante que en España no existan prácticamente estudios representativos de la población general en los que se analicen los niveles de exposición a COPs, así como los factores que condicionan su acumulación en las personas. Esto supone una cuestión relevante para la salud pública, dado que se ha demostrado que dosis de algunos COPs por debajo de las que normalmente se consideran «seguras» pueden causar efectos biológicos y clínicos relevantes. La valoración de la significación clínica y social del espectro de efectos más sutiles y con períodos de latencia mayores de los COPs presenta interesantes retos y oportunidades

(Porta et al., 2002). De hecho, el déficit de indicadores poblacionales sobre el impacto que los procesos ambientales tienen en la salud humana es sólo una consecuencia más de las múltiples deficiencias que se barajan en España a nivel de política ambiental (Ballester et al., 2005).

Aunque en España se han realizado estudios sobre concentraciones de COPs en muestras biológicas humanas, los trabajos existentes son sumamente heterogéneos y la mayoría carece de representatividad poblacional (Porta et al., 2008a). Las poblaciones de estudio han incluido voluntarios sanos, autopsias, enfermos, población hospitalarios, individuos parcialmente expuestos y ciertos subgrupos de la población general (Cerrillo et al., 2006;Henriquez-Hernandez et al., 2011;Ribas-Fito et al., 2003;Sala et al., 1999) y sólo unos pocos para una muestra representativa de la población general (Porta et al., 2010;Zumbado et al., 2005).

Las concentraciones de COPs parecen haber decrecido moderadamente en los últimos 20 años. En una revisión de la literatura existente, encontramos niveles altos de PCBs en algunos trabajos realizados en población residente en España (Agudo et al., 2009;Gonzalez et al., 1998;Porta et al., 1999;Sala et al., 1999), y se observó en general una tendencia decreciente con el tiempo, con niveles menores en estudios posteriores (Gasull et al., 2011;Henriquez-Hernandez et al., 2011;Sunyer et al., 2010). En cuanto a los niveles de *p,p'*-DDE, existe mayor número de estudios que en el caso de PCBs, y se observa una tendencia temporal similar, de manera que los estudios antiguos (Camps et al., 1989;Ferrer et al., 1992;Gomez-Catalan et al., 1993) muestran unos niveles considerablemente más elevados que los trabajos en población reclutada más recientemente (Alvarez-Pedrerol et al., 2009;Boada et al., 2007;Carreno et al., 2007;Porta et al., 2012a;Sunyer et al., 2010;Zumbado et al., 2005).

Se estima que la principal fuente de exposición a COPs en la población española es el consumo de alimentos, especialmente los de elevado contenido graso. Diversos estudios realizados en España han observado niveles detectables de *p,p'*-DDE, PCB, HCB e isómeros del lindano en muestras de carne, pescado, huevos, leche, mantequilla, queso o cereales (Kalantzi et al., 2001;Lazaro et al., 1999;Rivas et al., 2007), aunque en España los conocimientos sobre la contaminación de los alimentos por COPs presentan vacíos temporales y geográficos. La magnitud real de la contaminación humana por COPs y

sus tendencias a lo largo del territorio español, como su diversidad geográfica y social y los estudios representativos de la población general sana, siguen siendo ampliamente desconocidas (Porta et al., 2008a).

2.6 Exposición a COPs en Bolivia

Bolivia es considerada uno de los países menos desarrollados de América Latina. Sin embargo, se considera que la contaminación ambiental es elevada, debido a la proliferación de actividades que escapan de los mecanismos de regulación y control, afectando factores hídricos, atmosféricos, suelos, biota y la salud de la población (PLAGBOL, 2008). El impacto ambiental de los COPs en Bolivia se relaciona sobre todo con la acumulación histórica de residuos y su mal manejo, uso inadecuado de pesticidas, contaminación de las aguas y aire y un uso no racional de sustancias químicas (PLAGBOL, 2008).

Tras la firma del Convenio de Estocolmo en el año 2003, se realizó el trabajo de Inventariado y Diagnóstico preliminar de COPs en Bolivia; durante el trabajo de campo, se determinó la presencia de COPs, estableciendo la presencia en la agricultura, industria, así como niveles de contaminantes en la población boliviana. Hasta la fecha el uso de COPs persiste, y pese a las prohibiciones, siguen encontrándose cantidades de estas sustancias distribuidas a lo largo de todo el país (Mercado et al., 2013). Se estima que unos 17.200 litros de aceites dieléctricos potencialmente contaminados se identificaron en un inventario nacional preliminar (Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004). Se considera que una de las principales vías de liberación de los PCBs al medioambiente en Bolivia, es a través de derrames de fluidos eléctricos de las industrias (Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004).



Figura 7. Venta callejera de pesticidas organoclorados en Bolivia. Fuente: Archivo PLAGBOL

2.7 Poblaciones con especial exposición a COPs

Los seres humanos son objetivo sensible de bioacumulación de COPs y de sus los efectos adversos asociados (Krieger et al., 1994). Los pesticidas han sido utilizados ampliamente por los agricultores debido a su disponibilidad y sencillez en la aplicación, por lo tanto, otras vías de exposición (inhalación, contacto con la piel) pueden ser relevantes en estos colectivos. La conciencia entre los agricultores o el personal trabajador en industria acerca de la importancia de protegerse de los riesgos asociados a la aplicación de plaguicidas, sigue siendo escasa sobre todo en determinados países. El uso de equipo de protección personal, tales como sombreros, máscaras, gafas, botas y guantes es recomendable en aquellas actividades con riesgo de exposición laboral. En un estudio en Indonesia (Yuantari et al., 2015), sólo el 3,8% de los agricultores llevaba gafas y un 1,9% usaban botas. Las máscaras utilizadas sólo consistían en una parte de su camisa atada alrededor de la boca, no llevaban pantalones largos y camisas con mangas largas y utilizan la misma ropa durante más de 1 día sin lavar. Es de suma importancia el desarrollo de un conjunto de herramientas especiales para la reducción del riesgo de exposición, involucrando al personal expuesto.

Por otro lado, independientemente de la localización geográfica o la ocupación, las concentraciones de COPs en los seres humanos pueden estar influenciadas por los estilos de vida y las características socio-demográficas (Arrebola et al., 2012a;Arrebola et al., 2013a;Brauner et al., 2012a). Los hombres y mujeres pueden experimentar diferencias sustanciales en sus niveles internos de contaminantes ambientales, incluso cuando se exponen a niveles externos similares, que se atribuyen a una combinación de las características sociológicas, genéticas y fisiológicas (Arrebola et al., 2013a;Garcia, 2003;Garcia et al., 2004;Kennedy and Koehoorn, 2003).

La presencia de contaminantes orgánicos persistentes en la sangre humana y la leche es un motivo de preocupación a nivel mundial. El lactante se expone a una concentración de COPs de mayor grado que los adultos con respecto a su masa corporal y pueden suponer consecuencias graves en su salud ya que sus mecanismos de detoxificación no están completamente desarrollados y por tanto, son más vulnerables. La leche humana es, junto con el aire, el compartimento seleccionado por el Programa de las Naciones Unidas por el Medio Ambiente (UNEP) para la vigilancia mundial de los COPs. Las tasas de obesidad infantiles, en las que en algunos casos alcanzan el 15% y los casos de diabetes de tipo 2 en niños, que antes eran raros, han aumentado en todo el mundo, y en algunos países representan casi la mitad de los nuevos casos diagnosticados en niños y adolescentes, pueden indicar que el estilo de vida desde edades muy tempranas es relevante para la salud del adulto.

3. Justificación

Toda actividad humana trae consigo alguna forma de interacción con el medioambiente y, por tanto, cierto grado de contaminación ambiental, ya sea física, química o biológica, o una combinación de ellas, que en última instancia pudiera afectar negativamente al bienestar de la población. En lo que respecta a la contaminación química, la actividad humana ha traído como consecuencia la incorporación al medio de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, o mezclas de ellas, que pueden ser inhaladas, ingeridas o absorbidas por los seres vivos, incluida la especie humana. Estas sustancias son el resultado de procesos de síntesis y transformación relacionados con la industria química, agraria, automovilística, farmacéutica o constructora, entre otras, que alteran - en muchos de los casos, desfavorablemente - las condiciones naturales del medio ambiente y pueden afectar a la salud, la higiene o el bienestar del público.

Actualmente, el problema de la contaminación ha adquirido grandes proporciones, tanto por las diferentes fuentes antropogénicas que conforman las actividades de la vida diaria, como por su extensión geográfica. Las zonas contaminadas tienden a cubrir el planeta entero y se puede encontrar compuestos químicos en sitios muy distantes de los lugares de producción y uso. La degradación del medio ambiente parece ser un fenómeno inseparable del desarrollo.

Es necesario, por tanto, tratar de preservar la sociedad de la exposición sistémica y gradual. La búsqueda de nuevos métodos y técnicas que permitieran el progreso sin perjuicio del medio natural y la fabricación de nuevos productos que permitan enriquecer la tierra y luchar contra las plagas sin crear nuevos peligros, debería ser una meta de la sociedad actual. La orientación de la capacidad creadora del hombre hacia esta búsqueda para la preservación del medio ambiente podría llegar a solucionar gran parte de estos problemas.

Dentro de este contexto, es de gran interés el estudio de la exposición humana a COPs, la investigación de los determinantes y el análisis de las consecuencias sobre la salud humana, en poblaciones de diferentes países, con distintos niveles de exposición ambiental, diferentes hábitos y estilos de vida. Además, los estudios de biomonitorización constituyen una herramienta muy útil para conocer la eficacia de las medidas adoptadas en política medioambientales.

Cualquiera que sea su mecanismo de acción, se sospecha que el resultado final de la exposición a COPs, conlleva importantes alteraciones metabólicas y hormonales difícilmente predecibles. Para comprender la toxicología de los COPs, es importante visualizarlos en un contexto general de caracterización, exposición, efectos en salud y de validez de las herramientas de las que se disponen para llevar a cabo los análisis procedentes.

Por tanto, hay una legítima necesidad de investigar si esta exposición puede tener un efecto potencial dañino para nuestra salud o a la de nuestra descendencia (Risbridger, 2014). Una mejora en el conocimiento de cómo estos compuestos influyen en el desarrollo y progresión de las enfermedades crónicas de elevada prevalencia es una demanda crucial en el campo de la medicina y la salud pública (Mrema et al., 2013).

4. Hipótesis

A pesar de las restricciones en el uso y producción de COPs, vivimos en una sociedad en la que la exposición diaria de los seres humanos a estos contaminantes es un hecho constatado. Las sospechas sobre la acción negativa sobre la salud de los COPs y sus efectos a largo plazo son abrumadoras, sin embargo, la gran mayoría de las observaciones quedan sólo en hipótesis, que aunque plausibles, no proporcionan la evidencia científica necesaria para actuar de forma contundente.

El elevado número de COPs, la variedad de sus posibles efectos crónicos adversos y la incertidumbre sobre la magnitud del daño sobre la salud, han generado una preocupación razonable en científicos, médicos y ambientalistas, entre otros profesionales de la salud, así como en una parte no desdeñable del resto de la sociedad (Porta et al., 2008b).

La hipótesis del presente trabajo de tesis es que la población general presenta actualmente niveles de exposición a COPs, que vienen determinados por factores de actividad histórica, sociodemográficos, de estilo de vida y dietéticos, hasta ahora no bien identificados. Asimismo, la exposición continua y a bajas dosis de COPs incrementa el riesgo a largo plazo de padecer ciertas alteraciones metabólicas, entre las que destacan, por su prevalencia en la población general, la diabetes, la obesidad y la dislipemia.

5. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral son los siguientes:

Generales:

- i. Analizar y comparar los niveles de exposición a COPs y los factores determinantes de la misma en muestras de población de España y Bolivia, con diferentes características socioculturales, estilos de vida y niveles de contaminación ambiental.
- ii. Estudiar la relación entre la exposición acumulada a COPs en adultos y el desarrollo de patologías crónicas de elevada prevalencia en la población general como son la diabetes y la obesidad.

Específicos:

1. Cuantificar los niveles de exposición humana a COPs e identificar los factores predictores de las concentraciones, en una muestra de población de diferentes regiones en España.
2. Cuantificar los niveles de exposición humana a COPs e identificar los factores predictores de las concentraciones, en una muestra de población de Bolivia.
3. Analizar la relación entre la exposición acumulada a COPs y alteraciones en los niveles de lípidos plasmáticos, así como su posible papel como inductores de la obesidad.
4. Analizar la relación entre la exposición acumulada a COPs y el riesgo de padecer diabetes tipo 2.

6. Material y métodos

6.1 Población de estudio

Para responder a los objetivos de la presente tesis doctoral, el equipo de investigación ha trabajado con tres poblaciones de estudio diferentes:

- Cohorte de controles MCC-Spain
- Cohorte Santa Cruz de la Sierra
- Cohorte Granada-Motril (GraMo)

6.1.1 Cohorte de controles MCC-Spain

Para el presente estudio se seleccionó una submuestra de individuos entre la población control reclutada en el estudio MCC-Spain, que es un estudio multicasos-control de base poblacional, entre septiembre de 2008 y diciembre de 2013, en doce provincias españolas. MCC-Spain tiene como objetivo estudiar los factores relacionados con algunos de los tumores más relevantes en la población española (cáncer de mama, colon-rectal, linfomas, tumores gastro-esofágicos y cáncer de próstata) (Castano-Vinyals et al., 2015). Los individuos controles fueron seleccionados al azar utilizando los datos poblacionales de los centros de salud correspondientes a las áreas de estudio y se les contactó telefónicamente. Los criterios de inclusión fueron: ser ≥ 18 años y haber residido ≥ 6 meses en el área de influencia del hospital en el que él / ella fue reclutado. Los criterios de exclusión fueron: impedimentos para la comunicación y / o discapacidad física para participar en el estudio (Castano-Vinyals et al., 2015). El protocolo de MCC-Spain fue aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del estudio y firmaron un consentimiento informado (Castano-Vinyals et al., 2015).

La población incluida en este trabajo de tesis doctoral consistió en 312 adultos que fueron reclutados en las 4 regiones diferentes del país: Cataluña (16,75%), Madrid (41,87%), Cantabria (28,57%) y Navarra (12,81%). La recolección de las muestras biológicas se llevó a cabo en las áreas de influencia de los siguientes hospitales : Hospital del Mar y de la Clínica, en Barcelona, Can Ruti, de Badalona, el Hospital La Paz y Ramón y Cajal de Madrid, Hospital de Pamplona y Virgen del Camino, en Navarra y Hospital Marqués de Valdecilla en Cantabria.

La media de edad \pm desviación estándar de los participantes fue de $62,5 \pm 9,8$ años y el 65,1% de los participantes eran mujeres. De acuerdo con los criterios de la OMS, un total de 17,3% de los participantes eran obesos, con un índice de 45,2% de sobrepeso, un 36,9% de masa corporal normal, y un 0,6% tenían bajo peso (WHO, 2010). La distribución por sexos en cada región de reclutamiento fue la siguiente: Cataluña (54 hombres / 34 mujeres), Madrid (55 hombres / 85 mujeres), Navarra (0 hombres / 26 mujeres) y Cantabria (0 hombres/ 58 mujeres). Todos los participantes (100%) vivieron en algún momento de su vida en zona urbana.

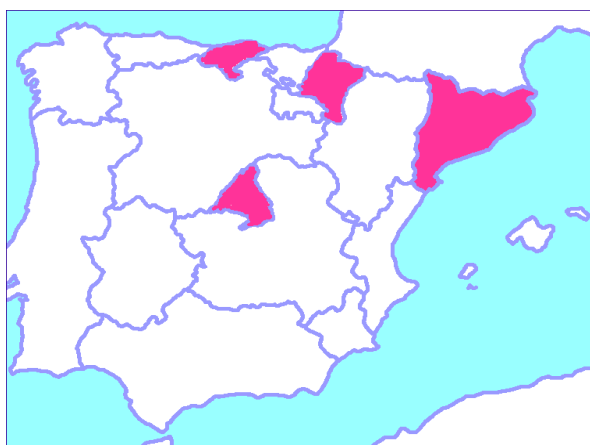


Figura 8. Área de estudio de MCC-Spain (provincias marcadas en rojo).

6.1.2 Cohorte Santa Cruz de la Sierra

El estudio que conforma el objetivo 2, está integrado en el marco que conforma el primer estudio de biomonitorización de la exposición humana a COPs en Bolivia basados en una cohorte de adultos reclutados en la población boliviana de Santa Cruz de la Sierra, entre enero y Junio 2010 (Arrebola et al., 2012a; Arrebola et al., 2012c). Santa Cruz de la Sierra, con 1,5 millones de habitantes, es la ciudad más poblada de Bolivia y se encuentra en la parte oriental del país (Región de Santa Cruz) a una altitud de 416 sobre el nivel del mar. La economía de la ciudad y sus suburbios representan el

35% del Producto Interior Bruto de Bolivia y se basa en la industria de los hidrocarburos, la industria maderera y agricultura. Alrededor del 80% del de la producción agrícola del país se cultiva en esta región tropical, que goza de una temperatura media anual de 21 °C.

La cohorte incluida en esta tesis doctoral está compuesta de 112 personas, que acudieron a los servicios de cirugía del Hospital Japonés en Santa Cruz de la Sierra durante el año 2009, para someterse a tratamientos quirúrgicos no relacionados con cáncer. De forma resumida 56% eran hernia inguinal o cirugía abdominal, 20% de cirugía de la vesícula biliar y el 24% otras cirugías). Durante las intervenciones, se extrajeron muestras de sangre y tejido adiposo de cada paciente. Todos los participantes estaban en condiciones de 12 h de ayuno en el momento de la intervención.

Los criterios de inclusión fueron: edad mayor de 16 años, ausencia de enfermedad relacionada con hormonas o cáncer, no recibir terapia hormonal y haber residido en el área de estudio durante al menos 10 años. Un total de 160 personas cumplían estos criterios por lo que fueron invitadas a tomar parte en el estudio. El 69% (112) aceptaron participar y firmaron su consentimiento informado, que había sido previamente aprobado por el Comité de Ética del hospital.



Figura 9. Localización del área de estudio de santa Cruz de la Sierra

6.1.3 Cohorte GraMo

Esta cohorte fue reclutada en el marco de un estudio de base hospitalaria cuyo objetivo es la caracterización de la exposición a COPs de una cohorte de adultos reclutados en la provincia de Granada. Para la consecución de los objetivos se definieron dos áreas de estudio delimitadas por la zona de influencia de dos hospitales públicos, donde fueron reclutados los participantes entre julio de 2003 y junio de 2004, el Hospital Universitario San Cecilio de la ciudad de Granada (240.000 habitantes) y el hospital Santa Ana, en la localidad de Motril (50.000 habitantes). Ambas ciudades distan aproximadamente 70 km entre sí. El área de Granada corresponde a una zona urbana densamente poblada (ciudad de Granada) y suburbios metropolitanos con economía basada en el sector servicios. El área de Motril corresponde a una zona semi-rural (ciudad de Motril) y sus alrededores, pequeños pueblos en la costa mediterránea, con una intensa actividad agrícola, incluyendo invernadero cultivo. Los participantes del estudio se escogieron de los listados de pacientes sometidos a cirugías no relacionadas con cáncer, con los siguientes tratamientos: 47% tratados de hernia inguinal o cirugía abdominal, 17% cirugía biliar y vesicular, 12% cirugía de varices y el 24% restante con otro tipo de cirugía. Todos los participantes firmaron su consentimiento informado para participar en el estudio, que fue aprobado por el Comité de Ética de cada hospital.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad mayor de 16 años, ausencia de enfermedad o cáncer hormonodependiente, no recibir terapia hormonal, y haber residido en una de las áreas de estudio durante al menos 10 años. De un total de 409 Individuos que cumplían los criterios de inclusión y fueron invitados a participar, 387 (94,6%) aceptaron, pero 19 de ellos fueron retirados del estudio por pérdida de datos (objetivo 3) y 89 debido a la falta de datos analíticos (objetivo 4), dejando una muestra final de 386 (94.6%) y 298 participantes (73%), respectivamente para los fines de los objetivos 3 y 4.

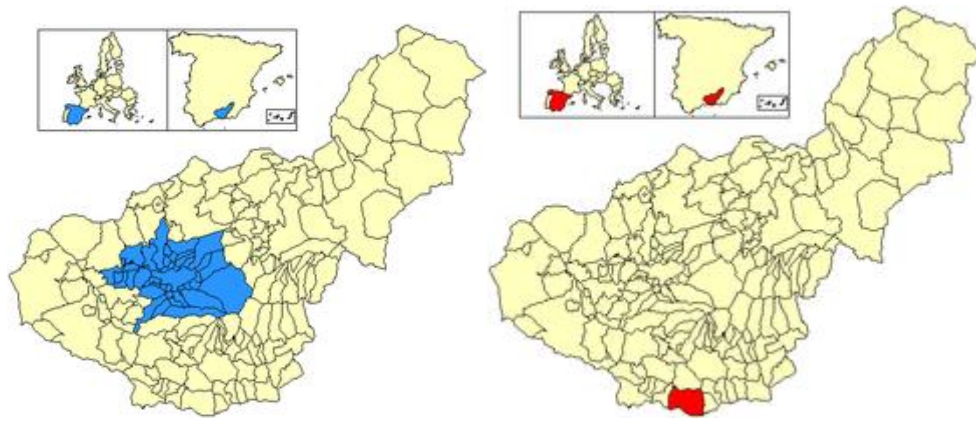


Figura10. Término municipal de la ciudad de Granada (azul) y término municipal de la ciudad de Motril (rojo). Fuente: wikipedia (<https://es.wikipedia.org/>)

6.2 Variables independientes

6.2.1 Cohorte de controles MCC-Spain

Las variables independientes fueron obtenidas mediante cuestionarios estandarizados, que fueron administrados por entrevistadores entrenados, en entrevistas personales con una duración aproximada de 70 minutos (rango: 30-130). El cuestionario incluyó preguntas sobre los factores de estilo de vida, características sociodemográficas, factores ocupacionales y personales, detalles del historial médico y familiar y una sección auto-administrada sobre los hábitos alimenticios durante los años previos al reclutamiento del paciente (Castano-Vinyals et al., 2015).

6.2.2 Cohorte de Santa Cruz de la Sierra

La información sobre posibles factores predictores de la exposición a COPs se obtuvo mediante un cuestionario administrado a cada participante a través de entrevistas personales realizadas por personal previamente entrenado. Las características sociodemográficas incluyeron información sobre el género, la edad, el índice de masa corporal (IMC), la residencia, la ocupación, la dieta y el hábito tabáquico. Los sujetos fueron clasificados en seis categorías ocupacionales siguiendo la propuesta de Goldthorpe (Domingo-Salvany et al., 2000; Regidor, 2001): I, gerentes de empresas con

>10 empleados, personal técnico superior, y profesionales libres; II, gerentes de empresas con < 10 empleados y ocupaciones intermedias; III, personal administrativo, profesionales de apoyo de gestión financiera, profesionales autónomos, supervisores de trabajadores manuales y otros trabajadores no manuales cualificados; IV, manuales cualificados y trabajadores semicualificados; y V, trabajadores manuales no cualificados. Finalmente, y debido a las limitaciones de tamaño muestral, los sujetos fueron clasificados en 2 grupos (no manuales: I, II y III; manuales: IV y V). En los fumadores, los datos correspondientes al número de cigarrillos consumidos a la semana fueron incluidos como variable categórica. La residencia se consideró "urbana" cuando vivían dentro de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra en el momento de la cirugía y "rural" cuando se encontraban en los pueblos de los alrededores de Santa Cruz de la Sierra.

6.2.3 Cohorte GraMo

Los datos sobre las características sociodemográficas, el estilo de vida, los hábitos dietéticos y el estado de salud se recogieron en entrevistas personales realizadas a cada participante por personal previamente capacitado para ello, durante la estancia en el hospital. Los cuestionarios y procedimientos de esta investigación fueron previamente estandarizados y validados en un estudio piloto con 50 sujetos. La prevalencia de diabetes fue evaluada utilizando tanto la información auto-reportada por los pacientes y mediante revisión de sus historias clínicas. Se consideró que un sujeto tenía diabetes tipo 2 si él / ella respondía "sí" a la siguiente pregunta: "¿Alguna vez fue diagnosticado con diabetes por un médico?". Asimismo, se consultaron los registros clínicos que mostraban los resultados del análisis de rutina previo a la cirugía. Si el paciente estaba registrado como diabético, los valores presentaban niveles de glucosa superiores a 126 mg/dl. No se encontraron discrepancias entre la prevalencia de diabetes auto-reportada y los datos registrados en la historia clínica. Los sujetos fueron considerados consumidores de alcohol cuando informaron del consumo de alcohol de al menos una vez a la semana. Un sujeto fue considerado fumador (en el pasado o presente) si declaró un consumo diario de tabaco superior a 1 cigarrillo. La clase ocupacional se clasificó según lo dispuesto por Goldthorpe, como anteriormente se ha descrito (Regidor, 2001).

6.3 Extracción de las muestras biológicas, análisis químico y análisis biológico

6.3.1 Cohorte de Controles MCC-Spain

Se llevó a cabo el desarrollo de una metodología de extracción de suero para análisis de residuos químicos que permitiese además la realización del test E-Screen. Las pruebas y validación de la metodología se llevaron a cabo en un estudio piloto de 100 muestras de suero. Tres mililitros de suero se extrajeron utilizando la metodología descrita por Turci et al. (2010), con algunas modificaciones. En resumen, se usó *p*-clorodibenzofenona (PCDBF) como patrón interno y la muestra de suero se extrajo con metanol y hexano/éter etílico (1: 1 v/v). La fase orgánica se reconstituyó en 1 ml de hexano y se dejó pasar a través de un cartucho de Bond-Elut-PCB. La elución de la muestra se realizó con 3 ml de *n*-hexano y 3 ml de hexano/éter dietílico (1: 1 v / v). Finalmente, el extracto se evaporó hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno, y se procesó a través de un protocolo de fraccionamiento mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), descrito previamente por Rivas et al. (2001), utilizando un sistema Agilent Serie 1260 Infinity.

Se cuantificaron los extractos obtenidos, midiendo una serie de plaguicidas organoclorados: *p,p'*-DDE, HCB y PCBs (congéneres 138, 153, y 180) mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones, usando un cromatógrafo Varian CP-3800 equipado con un detector de captura de electrones ⁶³Ni (Walnut Creek, CA, EE.UU.).

Como parte del control de calidad se analizaron blancos de laboratorio (con sólo disolventes) y siempre dieron un resultado negativo. La variabilidad inter e intra-día estuvo siempre por debajo de 20%. Además, para el control de calidad, se utilizaron muestras biológicas marcadas a diferentes concentraciones. Se estudiaron las recuperaciones de COPs del suero con el fin de evaluar la eficacia de la extracción de los métodos utilizados. Para ello se marcaron 10 muestras de blanco con los analitos en un punto intermedio de la curva de calibración y el procesamiento se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Para todos los COPs, las recuperaciones oscilaron desde 90 al 98%. El límite de detección (LOD) se determinó como la cantidad más pequeña de analito que dio una relación desde señal a ruido \geq de 3 y se fijó en 0,05 g/l para cada COP. Las concentraciones por debajo del LOD se les asignaron un valor aleatorio entre

cero y el límite de detección. Las concentraciones de COPs se calcularon utilizando una recta de calibrado y se expresaron en crudo (nanogramos por ml de suero) y en base lipídica (nanogramos por gramo de lípido).

6.3.2 Cohorte Santa Cruz de la Sierra

Las muestras de tejido adiposo de 5-10 g y 10 ml de sangre se recogieron de cada paciente durante la cirugía en condiciones de ayuno. Las muestras de sangre se centrifugaron a continuación durante 5 min. a 2500 rpm para separar el suero. Ambas muestras de tejido de suero y de tejido adiposo fueron codificados y se almacenaron a 80 C° hasta el análisis químico. Se dispuso de una muestra de tejido adiposo de los 112 pacientes y una muestra de sangre de 62 de ellos.

La extracción química se realizó siguiendo la metodología descrita por Martínez Vidal y Moreno-Frías (Martínez Vidal et al., 2002; Moreno-Frías M. et al., 2004). En resumen, se extrajeron 200 mg de tejido adiposo utilizando n-hexano, y después la solución se purificó a través de columna de alúmina y se mantuvieron en tubos de ensayo a 80 C°. De cada muestra de suero, se extrajeron 4 ml por acidificación con dietil-éter y n-hexano, y el extracto se purificó a través de una columna de extracción de sílice en fase sólida (SepPack, Waters).

Los congéneres de PCBs 138,153 y 180 fueron cuantificados mediante cromatografía de gases de alta resolución con detector de captura de electrones, usando un sistema Agilent GC7890A y columna capilar de sílice de 30 m x 0,32 0,25 mm (J & WScientific, HP-5).

El límite de detección se determinó para cada COP como la cantidad más pequeña de analito que dio una relación de señal a ruido superior a 3 y se fijó en 1 ppb, calculado sobre la concentración de lípidos en la muestra. A las concentraciones cromatográficas no detectadas, se les asignaron un valor aleatorio entre cero y el límite de detección, siguiendo las recomendaciones de Antweiler y Taylor (2008), y se utilizó PCDBF como patrón estándar interno.

Las concentraciones de PCBs fueron confirmadas en 1 de cada 10 muestras analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, utilizando un

cromatógrafo de gases Agilent 6890 (AgilentTechnologies, Wilmington, Estados Unidos) con inyector de serie 7683.

La reproducibilidad y la eficacia de extracción del método se establecieron mediante la ejecución de 10 muestras de tejido adiposo y suero enriquecido con PCBs en una punto intermedio de la curva de calibración. Las muestras se procesaron como se describe anteriormente. Las recuperaciones variaron de 70% a 98%.

6.3.3 Cohorte GraMo

Durante la cirugía se recolectaron muestras de 5-10 g de tejido adiposo y 10 ml de suero, que fueron codificadas y almacenadas a -80 ° C hasta el análisis de la concentración de residuos.

La preparación de las muestras para su análisis químico incluyó una extracción sólido-líquido de 200 mg de tejido adiposo con n-hexano. La solución se purificó a través de 2 g de alúmina en una columna de vidrio según la metodología descrita por Rivas et al. (2001). Cada muestra de suero (4 ml) fue sometida a un proceso de extracción líquido-líquido con éter etílico acidificado y n-hexano, y el extracto purificado se sometió a una extracción en fase sólida mediante un cartucho de extracción con relleno de sílice (SepPack, Waters) (Martinez Vidal et al., 2002). Todos los extractos se almacenaron en tubos de vidrio a -80° C.

Los COPs se cuantificaron mediante cromatografía de gases de alta resolución con un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo, usando un sistema Saturn 2000 (Varian, Walnut Creek, CA). Para el análisis se utilizó una columna capilar de Sílice 2 m x0, 25 mm (Bellefonte, PA), junto con una columna analítica de 30m x 0,25 mm (Factor FOUR VF-5MS, Varian Inc., Walnut Creek, CA). Los límites de detección y de cuantificación se fijaron en 0,01 mg / L y 4 mg / L, respectivamente, para cada uno de los COPs analizados. A las concentraciones cromatográficas por debajo del LOD se les asignó un valor aleatorio entre 0 y el LOD. Se cuantificaron los residuos en tejido adiposo de *p*, *p'*-DDE, HCB, β -HCH, y los congéneres de PCBs 138, 153 y 180. Para el estudio de recuperación de los COPs en muestras de tejido adiposo y suero se marcaron 10 muestras de cada matriz con los analitos correspondientes, en un punto intermedio de

la curva de calibración, y éstas fueron procesadas según la metodología descrita anteriormente. Las recuperaciones oscilaron entre 90% y 98%.

Durante el procesamiento de las muestras biológicas, se trabajó en todo momento en doble ciego, de forma que ni los analistas químicos, ni el personal estadístico conocían la identidad de cualquier sujeto de estudio.

6.3.3.1 Cuantificación de la Carga estrogénica total efectiva (TEXB) en tejido adiposo

Como parte del objetivo 4, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad estrogénica resultante de los COPs presentes en los extractos de tejido adiposo, mediante el biomarcador TEXB. Para ello los extractos se ensayaron en el test E-Screen, que mide el efecto proliferativo de xenoestrógenos en las células de cáncer de mama MCF-7, mediante la comparación del crecimiento celular de los cultivos tratados con estradiol y los tratados con diferentes concentraciones de extractos biológicos (Soto et al., 1992). Cada extracto de tejido adiposo seco se resuspendió en 5 ml de medio DMEM sin rojo fenol, suplementado con 10% de carbón dextrano tratado con suero humano. Los extractos se analizaron en el bioensayo E-Screen en diluciones de 1:1, 1:5, y 1:10. Cada muestra fue ensayada por triplicado con un negativo (vehículo) y positivos (estradiol) de control en cada pocillo. El efecto proliferativo del extracto de tejido adiposo se refiere al efecto máximo obtenido con estradiol, convertido en unidades equivalentes de estradiol (EEQ) para la lectura de una curva de dosis-respuesta, y se expresa en unidades de EEQ por gramo de lípido.

En el objetivo 4 se cuantificó la estrogenicidad del extracto total (TEXB-extract) de tejido adiposo antes de la separación en cromatografía líquida semipreparativa-HPLC, habitualmente empleada por el grupo de trabajo (Fernandez et al., 2008a). Por tanto, el TEXB-extract proporciona información sobre la estrogenicidad total de las muestras sin separación en función de su polaridad y lipofilicidad (Arrebola et al., 2012a).

6.4 Análisis de la fracción lipídica en suero y tejido adiposo

En las tres poblaciones de estudio se llevó a cabo un procedimiento común para el cálculo de la concentración lipídica de cada matriz biológica. Los niveles totales de colesterol y triglicéridos se cuantificaron en cada muestra de suero mediante ensayos

enzimáticos colorimétricos con un sistema de análisis modular Cobas C-8000 (Roche / Hitachi, Suiza). Los lípidos totales se calcularon utilizando la fórmula breve sugerida por Philips et al. (1989):

$$TL [g/L] = 2.27 \times TC [g/L] + TG [g/L] + 0.623$$

TL= Concentración total de lípidos

TG=concentración de triglicéridos

TC=Concentración de colesterol

En las muestras de tejido adiposo, se cuantificó el contenido total de lípidos mediante un método gravimétrico, previamente descrito por Rivas et al. (2001), que incluye una etapa de homogeneización de 100 mg adiposo tejido con 5 ml de cloroformo: metanol: ácido clorhídrico (20:10:0.1) y su acidificación con ácido clorhídrico 0,1 N.

Las concentraciones de COPs en base lipídica se calcularon dividiendo las concentraciones en tejido adiposo por el contenido de lípidos totales y fueron expresados en tanto en base húmeda (nanogramos por gramo de tejido adiposo o nanogramos por ml) y base lipídica (nanogramos por gramo de lípido).

En las muestras de suero, las concentraciones de COPs fueron individualmente estandarizadas por lípidos séricos totales, también se expresaron en ng / g lípido.

6.5 Análisis estadísticos

6.5.1 Cohorte de Controles MCC-Spain

El análisis descriptivo de las variables continuas se llevó a cabo mediante el cálculo de medianas y percentiles 25 y 75, para las variables continuas, así como de frecuencias relativas para las variables categóricas.

Se procedió a la transformación logarítmica (logaritmo neperiano) de las concentraciones de COPs, y el análisis multivariante de los factores predictores de las concentraciones se llevó a cabo mediante análisis de regresión lineal por pasos, usando una combinación de las técnicas de selección de variables "hacia adelante" y "hacia atrás", tomando un valor $p \leq 0,05$ como el nivel de significación estadística y $p \leq 0.1$ como "borderline", y cambios en el coeficiente R^2 . Con el fin de evaluar la influencia de

posibles predictores específicos en la población femenina, los modelos calculados para toda la población se repitieron sólo en las mujeres, y las siguientes variables fueron añadidas: estado de menopausia (pre- / post-menopáusica), tiempo acumulado de lactancia (meses), paridad (nº total de hijos) y el número de embarazos.

Los lípidos totales, la edad, el IMC y el sexo siempre se incluyeron en los modelos como covariables, independientemente de su significación estadística, debido a la experiencia basada en estudios previos, que vinculan estas variables a la exposición a COPs. Los patrones de consumo de alimentos siempre se introdujeron como variables continuas, y se categorizaron cuando se observó alguna tendencia significativa marginal. Los datos fueron almacenados y procesados mediante el programa SPSS v18.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.), y los análisis multivariantes se realizaron con el programa de análisis estadístico R v2.12.1 (<http://www.r-project.org/>).

6.5.2 Cohorte Santa Cruz de la Sierra

En el análisis descriptivo se calcularon las medias geométricas y percentiles de las concentraciones de PCBs. Las variables independientes continuas se describieron mediante medianas, máximos y mínimos, y las categóricas mediante frecuencias relativas. La \sum PCBs se calculó como la suma de las concentraciones de los tres congéneres.

Se procedió a la transformación logarítmica (logaritmo neperiano) de las concentraciones de PCBs, y el análisis de los factores predictores de las concentraciones se llevó a cabo mediante regresión lineal. Las variables independientes se introdujeron en modelos bivariantes, que fueron ajustados posteriormente por sexo, edad, e IMC.

Finalmente, se crearon los modelos de regresión lineal múltiple usando el método de selección de variables "hacia atrás", basado en un valor de $p < 0.1$ y cambios en R^2 . Las interacciones fueron probadas como el producto de 2 variables en los modelos finales.

El nivel de significancia se estableció para una $p \leq 0.05$, aunque los valores de $p \leq 0.10$ se consideraron como "borderline", siguiendo las recomendaciones de Greenland (1989) y Mickey and Greenland (1989).

Los datos para el análisis fueron almacenados usando SPSS v18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) y los análisis multivariantes se realizaron con el programa R v.2.12.1 (<http://www.r-project.org>).

6.5.3 Cohorte GraMo

El análisis descriptivo incluyó el cálculo de medianas, medias geométricas, desviaciones estándar y percentiles de las variables continuas; y porcentajes para las variables categóricas. Los valores de \sum PCBs y \sum COPs se calcularon como la suma de las concentraciones individuales de los tres congéneres de PCBs (138, 153 y 180) y los seis COPs (*p*, *p'*-DDE, HCB, β -HCH, y PCBs 138, 153, y 180), respectivamente.

En el análisis bivariante se utilizó el test de Mann-Whitney para comparar los niveles de variables continuas en dos categorías, así como la prueba exacta de Fisher para comparar dos variables categóricas. Para evaluar las correlaciones lineales entre las concentraciones de COPs y los niveles de TEXB-extract se usó la prueba de Spearman.

Para evaluar la asociación entre las concentraciones de COPs y la prevalencia de diabetes, se usaron modelos de regresión logística no condicional, y se calcularon las odds ratio (OR) crudas y ajustadas, con sus correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC95%). Además, se calcularon los terciles de las concentraciones de COPs y valores TEXB, los cuales fueron usados como variables independientes en los modelos de regresión logística. Se construyeron varios modelos con diferentes niveles de ajuste por factores de confusión: origen del tejido adiposo (pared abdominal, cintura pélvica, y otros), el sexo, la edad y el IMC.

El nivel de significación estadística se fijó en el 5% ($p=0,05$) y todos los test fueron bilaterales. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 18,0 (SPSS Inc, Chicago, IL) y el programa informático estadístico R v3.0. (<http://www.r-project.org/>).

7. Resultados y discusión

7.1. Exposición a contaminantes orgánicos persistentes y factores predictores de la exposición en la población adulta de cuatro regiones españolas (Objetivo 1).

El trabajo de investigación llevado a cabo para el objetivo 1 fue concebido como parte del estudio multicéntrico MCC-Spain, y tiene por objeto evaluar las concentraciones séricas de un grupo de plaguicidas organoclorados y congéneres de PCBs, en una muestra de adultos reclutados en cuatro regiones diferentes de España, así como investigar los factores predictores de la exposición relacionados con variables socio-demográficas, alimentarias y de estilo de vida.

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar las concentraciones séricas de un grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COP) en una muestra de adultos reclutados en cuatro regiones diferentes de España e investigar los factores predictores de la exposición tanto socio-demográficos y dietéticos como de estilo de vida.

La población de estudio consta de 312 adultos sanos seleccionados de entre los controles reclutados en el estudio de multicasos-control, MCC-Spain. Las variables de estudio fueron obtenidas mediante cuestionarios estandarizados, y los contaminantes se analizaron mediante cromatografía de gases con detección de captura de electrones. Se realizaron análisis multivariantes para identificar los predictores de las concentraciones de contaminantes con transformación logarítmica, utilizando modelos de regresión múltiple con pasos adelante y atrás.

Las tasas de detección variaron entre el 89,1% (hexaclorobenceno, HCB) y el 93,6% (bifenilo policlorado -153 [PCB-153]); el pesticida *p, p'*-diclorodifenildicloroetileno (*p, p'*-DDE) mostró las concentraciones más altas (mediana 1,04 ng / ml), mientras que HCB mostró los niveles más bajos (0,24 ng / ml). La edad se asoció positivamente con varios residuos: HCB, *p, p'*-DDE y PCB-180. El IMC se asoció positivamente con el residuo de *p, p'*-DDE, pero negativamente con PCB-138. El tiempo total acumulado de residencia en zona urbana se asoció positivamente con las concentraciones de PCB-153 en suero. En los modelos multivariantes, las mujeres mostraron mayores concentraciones HCB y menores de *p, p'*-DDE que los hombres. Cabe destacar que la

exposición a COPs en nuestra población de estudio se asoció positivamente con la lactancia materna recibida por los participantes y con el número de embarazos de sus madres, pero no estaba relacionado con la historia de las participantes de haber amamantado a sus hijos o la paridad. El tabaquismo se asoció negativamente con las concentraciones de HCB y PCB-153. El consumo de alimentos ricos en grasas en general, incluyendo pescado azul, se asoció positivamente con los niveles de COPs.

Fernandez-Rodriguez M, Arrebola JP, Artacho-Cordon F, Amaya E, Aragones N, Llorca J, Perez-Gomez B, Ardanaz E, Kogevinas M, Castano-Vinyals G, Pollan M, Olea N. Levels and predictors of persistent organic pollutants in an adult population from four Spanish regions. *Sci Total Environ* 2015; 538: 152-161.

Factor de impacto 2014: 4.099 (Primer decil)



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Levels and predictors of persistent organic pollutants in an adult population from four Spanish regions



M. Fernández-Rodríguez ^{a,*}, J.P. Arrebola ^{a,b,c,*}, F. Artacho-Cordón ^a, E. Amaya ^a, N. Aragones ^{c,d,e}, J. Llorca ^{c,f}, B. Perez-Gomez ^{c,d,e}, E. Ardanaz ^{c,g,h}, M. Kogevinas ^{c,i,j,k}, G. Castano-Vinyals ^{c,i,j,k}, M. Pollan ^{c,d,e}, N. Olea ^{a,c}

^a Instituto de Investigación Biosanitaria IBS.Granada, University of Granada, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain

^b Oncology Unit, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

^c Consortium for Biomedical Research in Epidemiology & Public Health (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^d Cancer Epidemiology Unit, National Center for Epidemiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^e Cancer Epidemiology Research Group, Oncology and Hematology Area, IIS Puerta de Hierro (IDIPHIM), Majadahonda, Madrid, Spain

^f Universidad de Cantabria-IDIVAL, Santander, Spain

^g Navarra Public Health Institute, Pamplona, Spain

^h Navarra Institute for Health Research (IdiSNA) Pamplona, Spain

ⁱ IMM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

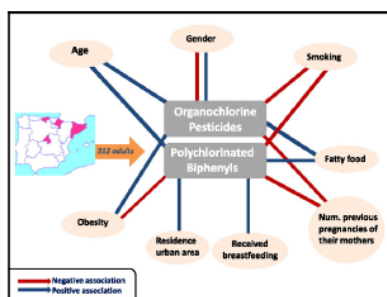
^j Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

^k Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- We analyzed persistent organic pollutants in adults from four Spanish regions.
- Detection rates ranged from 89.1% (HCB) to 93.6 (PCB-153).
- Predictors of POP exposure included gender, BMI, age, and study area.
- Receipt of breastfeeding and mother's previous pregnancies also affected exposure.
- Consumption of fatty food was in general positively associated with POP levels.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2015

Received in revised form 31 July 2015

Accepted 31 July 2015

Available online xxxxx

Editor: D. Barcelo

ABSTRACT

This research aimed to assess serum concentrations of a group of persistent organic pollutants (POPs) in a sample of adults recruited in four different regions from Spain and to assess socio-demographic, dietary, and lifestyle predictors of the exposure.

The study population comprised 312 healthy adults selected from among controls recruited in the MCC-Spain multicase-control study. Study variables were collected using standardized questionnaires, and pollutants were analyzed by means of gas chromatography with electron capture detection. Multivariable analyses were

* Corresponding authors at: Departamento de Radiología y Medicina Física, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.
E-mail addresses: mafero@ugr.es (M. Fernández-Rodríguez), jparrebola@ugr.es (J.P. Arrebola).

Keywords:
 Persistent organic pollutants
 Organochlorine pesticides
 Polychlorinated biphenyls
 Exposure predictors

performed to identify predictors of log-transformed pollutant concentrations, using combined backward and forward stepwise multiple linear regression models. Detection rates ranged from 89.1% (hexachlorobenzene, HCB) to 93.6% (Polychlorinated biphenyl-153 [PCB-153]); *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) showed the highest median concentrations (1.04 ng/ml), while HCB showed the lowest (0.24 ng/ml). In the multivariable models, age was positively associated with HCB, *p,p'*-DDE, and PCB-180. BMI was associated positively with *p,p'*-DDE but negatively with PCB-138. Total accumulated time residing in an urban area was positively associated with PCB-153 concentrations. The women showed higher HCB and lower *p,p'*-DDE concentrations versus the men. Notably, POP exposure in our study population was inversely associated with the breastfeeding received by participants and with the number of pregnancies of their mothers but was not related to the participants' history of breastfeeding their children or parity. Smoking was negatively associated with HCB and PCB-153 concentrations. Consumption of fatty foods, including blue fish, was in general positively associated with POP levels. Although POP environmental levels are declining worldwide, there is a need for the continuous monitoring of human exposure in the general population. The results of the present study confirm previous findings and point to novel predictors of long-term exposure to persistent organic pollutants.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Persistent organic pollutants (POPs) are a group of lipophilic chemicals that are highly resistant to biological and photolytic degradation and are therefore able to bioaccumulate in living organisms, mainly in their fatty tissues (Jung et al., 2012; UNEP, 2012). POPs include several chemical species, including organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs), which were extensively used until their widespread prohibition in the late 1970s due to their long half-lives and potential toxicity, and they remain present in the food chain (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004).

Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) is one of the most well-known organochlorine pesticides. It was applied worldwide as an insecticide for vector control until the 1970s (van den Berg, 2009) and is still used in some countries (e.g. Morocco, Mexico) (Zumbado et al., 2005). In the environment and in living organisms, DDT is mainly degraded to *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE), which is even more persistent than the parent compound (WHO, 1979). Estimates of the half-life of *p,p'*-DDE in the human body range between 7 and 8.6 years (Kirman et al., 2011; Saoudi et al., 2014), and it has been found to interact with androgen receptors (Li et al., 2008) and estrogen receptors (Soto et al., 1995).

Hexachlorobenzene (HCB) was previously used as fungicide for cereals (Addae et al., 2013) and is still released during the burning of waste and in chloralkali and wood-preserving processes, among other industrial processes (ATSDR, 1996; Aurrekoetxea Agirre et al., 2011). The half-life of HCB in the human body has been estimated at around 6 years (Hardell et al., 2010; Mrema et al., 2013). It is known to cause damage to the liver and endocrine systems, among other human organs (ATSDR, 1996; World Health Organisation, 2013), and to be an androgen receptor antagonist (Li et al., 2008). In addition, recent research has suggested that exposure to low levels of HCB can affect the neurological and behavioral development of young children (Liu and Schelar, 2012).

PCBs include a wide group of 209 congeners with various industrial applications, e.g., in thermal insulation or as coolant (ATSDR, 2000). Although banned in Spain since 1986, they are commonly found in the environment and living organisms (Agudo et al., 2009). Concentrations of three of these congeners, PCB-138, PCB-153, and PCB-180, are frequently used as biomarkers of the total exposure of PCBs, because they have been found to account for approximately 50% of total PCB exposure in the general population (Apostoli et al., 2005; Arrebola et al., 2012b; Bergonzi et al., 2009; Covaci et al., 2008). There is a wide variation in half-lives among PCB congeners from a few days to as long as 17 years, depending on the number and position of the chlorine atoms (Hardell et al., 2010; WHO, 2000).

Diet is estimated to account for the majority of human exposure to POPs (Gasull et al., 2011; Gomara et al., 2005; Lobet et al., 2003).

However, the contribution of specific food items and lifestyle patterns to the POP body burden is not completely understood (Boada et al., 2014; Juberg, 2000; Porta et al., 2010).

The objectives of the present research, conceived as part of the multi-center MCC-SPAIN study, were to assess serum concentrations of a group of organochlorine pesticides and PCBs in a sample of adults recruited in four different regions from Spain and to assess socio-demographic, dietary and lifestyle predictors of exposure.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study population was selected from among controls recruited in the MCC-Spain study, a population-based multicase-control study carried out between September 2008 and December 2013 in 12 Spanish provinces. The aim of MCC-Spain was to study factors related to some of the most relevant tumors in the Spanish population (breast, colorectal, gastroesophageal, and prostate cancer and chronic lymphocytic leukemia) in seven Spanish regions (Castano-Vinyals et al., 2015). Controls were randomly selected using population health data centers and contacted telephonically. Inclusion criteria were age 20–85 years and residence for ≥ 6 months in the catchment area of the recruiting hospital. Exclusion criteria were impediments to communication and/or physical inability to participate in the study (www.mccspain.org, Castano-Vinyals et al., 2015). The protocol of MCC-Spain was approved by the ethics committees of the participating institutions. All participants were informed about the study objectives and signed an informed consent form (Castano-Vinyals et al., 2015).

The population of the present study comprised a subsample of 312 adults recruited in the reference areas of eight hospitals from four Spanish provinces: Barcelona (28.2%), Madrid (44.9%), Cantabria (18.6%), and Navarra (8.3%). Biological samples were collected at the Hospital del Mar and Clinic in Barcelona, Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona, Hospital La Paz and Hospital Ramón y Cajal in Madrid, Complejo Hospitalario de Navarra A and B in Pamplona, and Hospital Marqués de Valdecilla in Santander. The main characteristics of the study population are summarized in Table 1. The mean age and standard deviation of the 312 participants was 62.5 ± 9.8 years, and 65.1% were women. According to WHO criteria, 17.3% participants were obese (BMI > 30), 45.2% overweight (BMI: 25–29.9), 36.9% normal-weight (BMI: 18.5–24.9), and 0.6% underweight (BMI < 18.5) (WHO, 2010). The sex-distribution in these areas was conditioned by the types of tumor cases recruited in each one. In this regard, Barcelona and Madrid recruited breast and prostate cases and controls, while Navarra and Cantabria did not recruit prostate cases. The percentage of female participants per province was 38.6% in Barcelona, 60.28% in Madrid, 100% in Navarra, and 100% in Cantabria.

Table 1
Characteristics of the study population.

	Total (n = 312)		Women (n = 203)			
	n	%	n	%		
Receipt of breastfeeding = yes	265	84.9	168	82.8		
Marital status = single	30	9.6	27	13.3		
Area = Madrid	140	44.9	85	41.9		
Barcelona	88	28.2	34	16.7		
Cantabria	58	18.6	58	28.6		
Navarra	26	8.3	26	12.8		
Married	233	74.7	133	65.5		
Studies = primary or less	163	52.2	102	50.3		
Secondary	89	28.5	70	34.5		
University	51	16.3	31	15.3		
Occupational class = housekeeper	77	24.7	77	37.9		
Worker	105	33.7	77	37.9		
Retired/not working	130	41.7	49	24.2		
Menopause status = menopause/postmenopause*	NA	NA	182	89.7		
Smoker	60	19.2	36	17.7		
Former smoker	100	32.1	38	18.7		
Never smoked	152	48.7	129	63.6		
Dairy consumption = 2 portions/day	111	35.6	79	38.9		
Lamb consumption = yes	149	47.8	116	57.1		
Vegetable consumption = ≥3 portion/week	227	72.8	147	72.4		
Legume consumption = ≥1 portion/week	208	66.7	130	64.0		
	Median	Percentiles		Median	Percentiles	
		25th	75th		25th	75th
Age (years)	62.5	55.0	69.0	59.0	52.0	66.0
BMI (kg/m ²)	26.1	23.7	28.5	25.7	23.2	28.5
Total lipids (g/l)	7.2	6.4	8.1	7.4	6.6	8.4
Age at menarche (years)*	NA	NA	NA	13.0	11.0	14.0
Total accumulated time of residence in urban area (years)	47.0	41.0	57.0	46.0	39.0	55.0
Mother's number of pregnancies at delivery	3.0	1.0	8.0	3.0	2.0	8.0
Number of pregnancies*	NA	NA	NA	2.0	1.0	3.0
Receipt of breastfeeding (months)	12.0	2.0	18.0	6.0	1.0	12.0
Breastfeeding time (months)	NA	NA	NA	6.0	0.0	10.0
Blue fish consumption (portions/day)	0.1	0.1	0.2	0.1	0.0	0.2
Eggs consumption (number/day)	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5

* Only women; NA: not applicable.

2.2. Study variables

2.2.1. Independent variables

The independent variables were collected using standardized computerized questionnaires, which were administered by trained interviewers in personal interviews lasting around 70 min (range: 30–130). The questionnaires included lifestyle factors, sociodemographic characteristics, occupational and personal factors, and medical and family histories. A self-administered questionnaire on dietary habits during the previous year was also administered to participants (Castano-Vinyals et al., 2015). The questionnaires are supplied as supplementary material. When feasible, 27 ml of peripheral blood was drawn from participants, which were aliquoted in whole blood, plasma, cellular fraction for DNA extraction, and serum and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. For this study, an aliquot of serum was sent to San Cecilio University Hospital for chemical analyses.

2.2.2. Sample extraction and chemical analyses

Three milliliters of serum were extracted from each patient using the methodology described by Turci et al. (2010) with slight modifications. Briefly, serum was spiked with p-chlorobenzophenone as internal standard and further extracted with methanol and hexane/ethyl ether (1:1 v/v). The organic phase was reconstituted in 1 ml hexane and passed through a Bond Elut-PCB cartridge. The sample elution was performed with 3 ml hexane and 3 ml hexane/diethyl ether (1:1 v/v). Finally, the eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen and processed following a high-performance liquid chromatography

fractionation protocol described elsewhere by Rivas et al. (2001), using an Agilent Infinity Series 1260 system.

A group of organochlorine pesticides p,p'-DDE, HCB, and PCBs (congeners 138, 153, and 180) were quantified in the extracts by gas chromatography with micro-electron capture detection, using a VARIAN CP-3800 equipped with a ⁶³Ni electron capture detector (Walnut Creek, CA).

Laboratory blanks with solvents alone were tested and always yielded a negative result. Inter- and intra-day variability was less than 20%. Laboratory-fortified matrix samples at different concentrations were used for quality control. The extraction efficiency of the techniques used was evaluated by spiking 10 blank samples with target analytes at an intermediate point on the calibration curve and processing them as above, obtaining POP recovery from serum of 90–98%. The limit of detection (LOD) was determined as the smallest amount of the analyte that gave a signal-to-noise ratio ≥ 3 and was set at 0.05 $\mu\text{g/L}$ for each POP. Concentrations below the LOD were assigned a random value between zero and the LOD. POPs were calculated using matrix-matched calibration and expressed in both wet (nanograms per ml serum) and lipid (nanograms per gram of lipid) bases.

Total cholesterol and triglyceride levels were quantified in each serum sample by enzymatic colorimetric tests using a Cobas C-8000 modular analyzer system (Roche/Hitachi, Switzerland). Total lipids were calculated using the short formula of Phillips et al. (1989).

2.3. Statistical analyses

Median values and 25th, and 75th percentiles were calculated for continuous variables and relative frequencies for categorical variables.

Multivariable analyses were performed to identify predictors of log-transformed POP concentrations using a combination of backward and forward stepwise multiple linear regression, setting a significance level of $p \leq 0.05$ ($p \leq 0.1$ as borderline significant) and changes in R^2 . The models for the whole study population were repeated for the females alone to assess the influence of potential female-specific predictors, testing the following additional variables: menopausal status, accumulated breastfeeding, parity, and number of pregnancies.

Total lipids, age, BMI, and sex were always included in the models as covariates, regardless of their statistical significance, based on reported evidence of their association with POP exposure. Food consumption patterns were tested both as continuous and categorical variables. Data were stored and processed using SPSS v18.0 (IBM, Chicago, IL, USA), and multivariate analyses were carried out with the R statistical computing environment v2.12.1 (<http://www.r-project.org/>).

3. Results and discussion

3.1. Serum POP concentrations in the study population

Frequencies of detection and concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in serum samples are shown in Table 2. All analyzed samples were positive for at least one of the studied chemicals. Detection rates ranged from 89.1% (HCB) to 93.6 (PCB-153). *p,p'*-DDE showed the highest median concentrations (1.04 ng/ml), while HCB showed the lowest (0.24 ng/ml).

Table 3 summarizes a review of recent studies on organochlorine pesticide and PCB serum concentrations in Spanish populations. There is a general trend for a decrease in most chemicals over time, although they are still commonly detected in virtually all individuals. In fact, a previous study in a Spanish population recruited between 1992 and 1996 reported *p,p'*-DDE concentrations of 857.9 ng/g lipid, i.e., five-fold higher than reported in the present study. In comparison to other recent studies, *p,p'*-DDE levels in our population were within the lower-medium range (Jakszyn et al., 2009), and far lower than those described in occupationally/accidentally exposed populations (Mercado et al., 2013). Our *p,p'*-DDE concentrations are very similar to those recently reported by Morales et al. (2013), Gascon et al. (2013) and Arrebola et al. (2013a) and are lower than those described in a general US population recruited in 2003–04 (1.45 ng/ml) (CDC, 2005).

Serum concentrations of HCB (0.24 ng/ml and 152.5 ng/g lipid) were relatively high in comparison to findings worldwide (Arrebola et al., 2009; Glynn et al., 2003; Kang et al., 2008; Karrman et al., 2006) but slightly lower than those reported by Morales et al. (2013) and Gascon et al. (2013) in Spanish populations. Serum concentrations of PCBs were not very different from those reported over the past 10 years in different countries (CDC, 2009; Covaci et al., 2008;

Fernandez et al., 2007; Ibarluzea et al., 2011; Kalantzi et al., 2011; Kang et al., 2008; Thomas et al., 2006; Tsukino et al., 2006).

3.2. Predictors of serum POP concentrations

Table 4 shows the results of the multivariable analyses of the predictors of POP concentrations. In the models for the whole study population, average HCB concentrations were 0.75 ng/ml higher and *p,p'*-DDE concentrations 0.50 ng/ml lower in the women than in the men, while no statistically significant gender differences were found for the remaining POPs. Higher cytochrome P450 activity has been reported in males than in females (McTernan et al., 2002; Moser and McLachlan, 2001; Silbergeld and Flaws, 2002), which might explain the lower HCB levels and higher *p,p'*-DDE levels in the men (the latter as a result of the metabolism of the parent compound DDT). This is in agreement with previous reports of a higher urinary excretion of the HCB sulfur-conjugate in men (To-Figueras et al., 1997). Other reasons for the observed associations might include differences in the percentage of body fat between men and women (López-Flores et al., 2009) or even gender-related social disparities (Arrebola et al., 2013b). Interestingly, in a study of healthy Spanish adults from different regions, Jakszyn et al. (2009) found very similar results to our study, with higher *p,p'*-DDE and lower HCB concentrations in men versus women. Furthermore, as discussed below, lactation is a major route for POP excretion in women (Cerrillo et al., 2006; Hardell et al., 2010), which might be more relevant for *p,p'*-DDE given its moderately higher liposolubility in comparison to HCB ($K_{ow} = 5.31$ vs. 6.51, respectively) (EPA, 1989).

In our study, age was positively associated with HCB, *p,p'*-DDE, and PCB-180. Previous studies have also found higher POPs concentrations in older people (Apostoli et al., 2005; Arrebola et al., 2012a; Hansen et al., 2010; Hardell et al., 2010; Jakszyn et al., 2009; Rivas et al., 2007). A positive association between age and POPs burden could be assumed on the basis of the persistence and bioaccumulative properties of these chemicals in human fatty tissues, as well as the continuous exposure of the population (Arrebola et al., 2009; Burgaz et al., 1994; Daglioglu et al., 2010; Waliszewski et al., 1995). A cohort effect has also been described in relation to this association, given that older people might have accumulated higher POP concentrations because they were born when these chemicals were widely employed (Ahlborg et al., 1995; Arrebola et al., 2012b; Glynn et al., 2003; Jakszyn et al., 2009).

BMI was positively associated with *p,p'*-DDE and borderline negatively correlated with PCB-138. There are conflicting results in the literature on the association between the obesity rate and POP burden, with researchers reporting positive, negative, or even no association (Hansen et al., 2010; Huetos et al., 2014; Hunter et al., 1997; Sala et al., 1999; Wolff et al., 2007). It could be assumed that BMI might be a proxy for

Table 2
Concentrations and frequencies of detection of POPs in the study population.

	Total				Women			
	% > LOD	Median	Percentiles		% > LOD	Median	Percentiles	
			25th	75th			25th	75th
HCB (ng/ml)	89.10	0.24	0.11	0.53	89.29	0.29	0.11	0.68
HCB (ng/g lip)		33.96	16.03	69.25		37.57	15.01	88.39
<i>p,p'</i> -DDE (ng/ml)	92.63	1.04	0.37	2.47	94.39	0.20	0.74	1.98
<i>p,p'</i> -DDE (ng/g lipid)		152.47	51.85	350.18		96.95	26.97	256.22
PCB-138 (ng/ml)	93.27	0.69	0.40	1.13	93.88	0.72	0.34	1.31
PCB-138 (ng/g lipid)		95.30	56.75	158.72		97.28	44.63	175.08
PCB-153 (ng/ml)	93.59	0.69	0.37	1.22	94.90	0.60	0.25	1.17
PCB-153 (ng/g lipid)		96.65	50.62	172.77		82.55	34.36	171.54
PCB-180 (ng/ml)	92.31	0.53	0.28	0.79	93.88	0.44	0.22	0.75
PCB-180 (ng/g lipid)		71.18	39.87	107.49		57.39	34.39	102.34

LOD: limit of detection.

Table 3
Recent studies on POP serum concentration in Spanish populations.

Reference	N	Study population	Location	Sampling year	Units	HCB	p,p'-DDE	PCB-138	PCB-153	PCB-180
Porta et al., 1999	51	Cancer patients	Mallorca, Alicante, Barcelona	1992/95	ng/ml	–	18.80 ^a	1.45 ^a	1.59 ^a	2.01 ^a
Porta et al., 1999	26	Hospital controls	Mallorca, Alicante, Barcelona	1992/95	ng/ml	–	9.41 ^a	1.13 ^a	1.26 ^a	1.30 ^b
Sala et al., 1999	608	General population	Flix, Catalonia	1994	ng/ml	–	36.7 ^a	9.61 ^a	1.25 ^a	1.46 ^a
To-Figueras et al., 2000	53	Exposed population	Flix, Catalonia	N/S	ng/ml	–	30.2 ^a	–	–	–
Botella et al., 2004	200	Women	Granada	N/S	ng/ml	–	8.11 ^a	–	–	–
Howsam et al., 2004	208	Hospital controls	Catalonia	1996/98	ng/g lipid	–	1753 ^b	3686 ^b	308 ^b	362 ^b
Zumbado et al., 2005	682	General population	Canary Islands	1998	ng/g lipid	–	118 ^b	–	–	–
Jiménez-Torres et al., 2006	72	Healthy mothers	Almería, Granada	N/S	ng/ml	–	20.0 ^a	31.9 ^a	–	–
Carreño et al., 2007	220	Healthy men	Granada	N/S	ng/ml	–	2.31 ^b	4.15 ^b	–	–
Boada et al., 2007	423	General population	Canary Islands	1997/98	ng/g lipid	–	11.17 ^a	–	–	–
Rivas et al., 2007	200	Premenopausal women	Granada	N/S	ng/ml	–	4.0 ^a	–	–	–
Rivas et al., 2007	200	Postmenopausal women	Granada	N/S	ng/ml	–	7.0 ^a	–	–	–
Agudo et al., 2009	953	Healthy adults	Asturias,Guipuzcoa,Navarra, Murcia,Granada	1992/96	ng/g lipid	–	–	117.5 ^a	205.2 ^a	136.4 ^a
Agudo et al., 2009	953	Healthy adults	Asturias,Guipuzcoa,Navarra, Murcia,Granada	1992/96	ng/ml	–	–	0.81 ^a	1.42 ^a	0.94 ^a
Álvarez-Pedrerol et al., 2009	520	Pregnant women	Sabadell	2004/06	ng/g lipid	–	42.4 ^b	1122 ^b	18.8 ^b	34.5 ^b
Álvarez-Pedrerol et al., 2009	570	Pregnant women	Guipuzkoa	2004/06	ng/g lipid	–	35.6 ^b	89.9 ^b	30.9 ^b	53.1 ^b
Jakszyn et al., 2009	953	Healthy adults	Asturias,Guipuzkoa,Navarra, Granada,Murcia	1992/96	ng/g lipid	–	379.0 ^a	822.1 ^a	–	–
López-Espinosa et al., 2009	157	Pregnant women	Valencia	2003/05	ng/g lipid	–	320 ^a	–	–	–
Llop et al., 2010	541	Pregnant women	Valencia	2004/06	ng/g lipid	–	54.6 ^a	186.72 ^a	27.43 ^a	38.26 ^a
Porta et al., 2010	919	General population	Catalonia	2002	ng/g lipid	–	159.4 ^b	399.3 ^b	69.5 ^b	100.1 ^b
Sunyer et al., 2010	584	Pregnant women	Sabadell	2004/06	ng/g lipid	–	43.7 ^b	112.3 ^b	21.1 ^b	35.5 ^b
Aurrekoetxea et al., 2011	424	General population	Basque country (Bilbao-Barakaldo)	2008	ng/g lipid	–	94.9 ^a	190.1 ^a	61.3 ^a	88.4 ^a
Henríquez-Hernández et al., 2011	607	General population	Canary Islands	1997/98	ng/g lipid	–	–	0.0 ^b	2.18 ^b	6.7 ^b
Ibarluzea et al., 2011	1245	Pregnant women	Sabadell, Guipuzkoa	2004/05	ng/g lipid	–	33.54 ^a	110 ^a	21.8 ^a	38.9 ^a
Boada et al., 2012	103	Healthy women	Canary Islands	1998	ng/g lipid	–	198 ^a	–	–	–
Boada et al., 2012	121	Breast cancer patients	Canary Islands	1999/01	ng/g lipid	–	357.4 ^a	–	–	–
Gasull et al., 2012	886	General population	Cataluña	2002	ng/ml	–	1.07 ^a	2.70 ^a	0.39 ^a	0.56 ^a
Porta et al., 2012	231	General population	Catalonia	2006	ng/ml	–	0.66 ^a	1.44 ^a	0.27 ^a	0.39 ^a
Vrijheid et al., 2012	490	Pregnant women	Valencia	2004/08	ng/g lipid	–	56.2 ^b	188.7 ^b	–	–
Vrijheid et al., 2012	637	Pregnant women	Sabadell	2004/08	ng/g lipid	–	35.2 ^b	125.6 ^b	–	–
Vrijheid et al., 2012	630	Pregnant women	Guipuzkoa	2004/08	ng/g lipid	–	12.0 ^b	95.8 ^b	–	–
Arrebola et al., 2013	387	Adults	Granada	2003/04	ng/g lipid	–	175.7 ^b	–	–	–
Gascon et al., 2013	1175	Healthy mothers	Guipuzkoa, Sabadell, Valencia	2003/08	ng/g lipid	–	42.7 ^a	132.4 ^a	–	39.8 ^a
Mari et al., 2013	27	Exposed workers	Tarragona	2011	ng/g lipid	–	10.8 ^a	–	42.2 ^a	18.5 ^a
Morales et al., 2013	2031	Pregnant women	Valencia,Sabadell, Guipuzkoa	2003/08	ng/g lipid	–	41.3 ^a	127.2 ^a	24.8 ^a	40.9 ^a
Gari et al., 2014	705	General population	Catalonia	1994	ng/ml	–	14.0 ^b	4.4 ^b	0.58 ^b	0.63 ^b
Gari et al., 2014	705	General population	Catalonia	2002	ng/ml	–	1.2 ^b	2.7 ^b	0.46 ^b	0.63 ^b
Huetos et al., 2014	917	Women	17 Regions	2009/10	ng/g lipid	–	–	31.85 ^a	42.8 ^a	52.1 ^a
This study	312	Cancer controls	Catalonia, Madrid, Navarra, Cantabria	2008/13	ng/ml	–	0.24 ^b	1.04 ^b	0.69 ^b	0.69 ^b
This study			Catalonia, Madrid, Navarra, Cantabria	2008/13	ng/g lipid	–	34.0 ^b	152.47 ^b	95.30 ^b	96.65 ^b

^a Geometric mean.

^b Median.

food consumption, assuming a higher intake of fatty food (and consequently greater POP intake) by more obese individuals (Hardell et al., 2010). However, there have also been reports of a potential dilution effect on POP concentrations exerted by a certain degree of obesity (Arrebola et al., 2012c; Porta et al., 2012b), although this would be more evident in adipose tissue stores than in serum (Ben et al., 2014). This issue becomes even more complex if it is considered that POPs might be a cause rather than a consequence of obesity. In fact, many POPs have been acknowledged as potential obesogens, i.e., capable of altering lipid accumulation and adipogenesis (Grun and Blumberg, 2007) and therefore promoting obesity and obesity-related disorders (Sharpe and Drake, 2013). The negative association found between PCB-138 and obesity in the present study was also described by Ibarluzea et al. (2011) in pregnant Spanish women.

In addition, we investigated several interactions in the models by entering the product term in each final model (i.e., BMI × age, sex × age, and age × BMI), with null results.

Total accumulated residence in an urban area was positively associated with concentrations of PCB-153, which is in agreement with its industrial origin. It is also of interest that the area of recruitment seemed

to have a strong influence on POP exposure. This might be related to distinct exposure patterns of the different sampled populations or to the confounding effect of other variables not included in the models. The highest concentrations of POPs related to industrial activities (PCBs, HCB) were observed in participants recruited in Navarra and the highest p,p'-DDE levels in those from Madrid, while the lowest POP concentrations were always found in participants recruited in Cantabria. It is important to note that the four regions in the present study are relatively industrialized in comparison to the rest of the country. Jakszyn et al. (2009) and Vrijheid et al. (2012) also documented regional differences in POP exposure in Spain. Although the sample size was very limited for stratified analyses, our findings warrant further biomonitoring research in larger population samples in order to fully elucidate different exposure levels and predictors across the different regions in the country. Despite the universality of POP exposure, certain hotspots have been documented, related not only to accidental or occupational exposure but also to specific lifestyle and dietary patterns of the populations (Rusiecki et al., 2008).

It is noteworthy that POP exposure in our study population was inversely associated with the number of previous pregnancies of

Table 4
Multivariable linear regression models for the predictors of log transformed serum POP concentrations (n = 312).

	HCB				p,p'-DDE				PCB-118				PCB-153				PCB-180			
	Beta	SE	Exp(beta)	p	Beta	SE	Exp(beta)	p	Beta	SE	Exp(beta)	p	Beta	SE	Exp(beta)	p	Beta	SE	Exp(beta)	p
Sex (female)	0.75	0.18	2.12	<0.001	-0.50	0.20	0.61	0.013	-0.14	0.21	0.87	0.532	-0.32	0.20	0.73	0.112	-0.03	0.19	0.97	0.960
Age (years)	0.04	0.01	1.04	<0.001	0.02	0.010	1.02	0.050	-0.01	0.01	0.99	0.296	-0.01	0.01	0.99	0.910	0.03	0.01	1.03	0.002
BMI (kg/m ²)	0.02	0.02	1.02	0.384	0.05	0.024	1.05	0.036	-0.04	0.02	0.96	0.079	0.01	0.02	1.01	0.848	0.14	0.18	1.15	0.436
Mother's number of pregnancies at delivery*	-0.04	0.02	0.96	0.061	-0.16	0.064	0.86	0.015	-0.05	0.03	0.95	0.060	-0.05	0.02	0.95	0.051	-0.05	0.02	0.95	0.054
Breastfeeding (received) = yes	-	-	-	-	-	-	-	-	0.74	0.36	2.10	0.039	-	-	-	-	-	-	-	-
Study area	Ref				Ref				Ref				Ref				Ref			
Cantabria	1.17	0.2	3.23	<0.001	1.53	0.27	4.61	<0.001	0.58	0.20	2.66	0.002	1.24	0.26	3.45	<0.001	0.40	0.25	1.62	0.056
Madrid	1.22	0.27	3.40	<0.001	0.69	0.36	1.99	0.055	1.71	0.36	5.55	<0.001	2.26	0.33	9.61	<0.001	0.84	0.32	2.31	0.009
Navarra	0.59	0.24	1.81	0.014	1.33	0.32	3.79	<0.001	1.55	0.35	4.70	<0.001	1.05	0.30	2.84	0.001	0.64	0.30	1.91	0.032
Barcelona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Smoking habit	Ref				Ref				Ref				Ref				Ref			
Never smoked	-0.31	0.16	0.73	0.060	-	-	-	-	-0.29	0.21	0.75	0.160	-0.34	0.19	0.71	0.072	-	-	-	-
Former smoker	-0.45	0.18	0.64	0.016	-	-	-	-	-0.58	0.24	0.56	0.016	-0.51	0.21	0.60	0.018	-	-	-	-
Current smoker	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Egg consumption (number/day)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	0.40	2.47	0.026	0.63	0.40	1.87	0.122
Blue fish consumption (portions/day)	-	-	-	-	1.97	0.73	7.19	0.007	1.43	0.71	4.16	0.047	1.09	0.65	2.98	0.093	1.01	0.64	2.74	0.117
Vegetable consumption ≥3 portions/week	-	-	-	-	-0.52	0.23	0.59	0.027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Legume consumption ≥1 portions/week	-	-	-	-	-	-	-	-	0.29	0.20	1.33	0.145	-	-	-	-	-	-	-	-
Dairy consumption ≥1 portions/week	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.40	0.18	1.49	0.027
Lamb consumption = yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.41	0.17	1.51	0.019	-	-	-	-
Chicken consumption (portion/day)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1.59	0.63	0.20	0.014
Total accumulated residence in urban area (years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.01	1.02	0.031	-	-	-	-

Total serum lipids were entered as a covariate in all the models. Each column corresponds to a single model; SE: Standard error of beta coefficient.

* This refers to participant's mothers.

participants' mothers and positively associated with the receipt of breastfeeding. The finding that these variables have a stronger effect in comparison to the participants' history of breastfeeding/parity indicates an interesting cohort effect that affects the POP burden at an adult stage. In this regard, Gallo et al. (2011) and Hsu et al. (2014) also found positive associations between the receipt of breastfeeding and POP exposure. Both parity and lactation have been described as major routes for POP clearance (Cerrillo et al., 2006; Hansen et al., 2010; Hardell et al., 2010; Veyhe et al., 2015). This finding might be related to the greater importance of these sources of POP clearance in the past, given that current exposure levels are very low in comparison to those observed decades ago, and exposure during early childhood usually results in higher concentrations due to the relatively small body size.

Regarding specific characteristics of the women, we found higher concentrations of *p,p'*-DDE, HCB, PCB-138, and PCB-180 in premenopausal versus postmenopausal women ($\text{beta}[p,p'\text{-DDE}] = 1.39$, $p < 0.001$; $\text{beta}[\text{HCB}] = 0.65$, $p = 0.073$; $\text{beta}[\text{PCB-138}] = 1.00$, $p = 0.079$; $\text{beta}[\text{PCB-180}] = 0.70$, $p = 0.077$, respectively, data not shown in tables). Rivas et al. (2007) found similar associations with a number of organochlorine pesticides, with the exception of *p,p'*-DDE. This finding might relate to the different physiological conditions of pre- and post-menopausal women or to specific lifestyle patterns that were not collected in our study.

The smoking habit was negatively associated with HCB and PCB-153. Interestingly, current smokers showed the lowest concentrations, followed by former smokers and then non-smokers. It has been documented that polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke are potent inducers of cytochrome P450 isoforms 1A1 and 1A2 (Kroon, 2007), enzymes that metabolize toxicants. A similar association was reported by Arrebola et al. (2012c) in a Bolivian population, although Apostoli et al. (2005) found no association between smoking habit and PCB concentrations in an Italian population.

Although diet (especially fatty food) is estimated to be the main contributor to POP exposure in the general population (Aurrekoetxea Aguirre et al., 2011; Llobet et al., 2003; Porta et al., 2012a), the assessment of dietary predictors of POP concentrations raises certain methodological issues, given the diverse possibilities for estimating food consumption. Thus, Jakšzyn et al. (2009) observed no dietary predictor of organochlorine pesticide levels in the EPIC-Spain study, but Agudo et al. (2009) found a positive association between fish consumption and PCB exposure in the same study. In the present investigation, we chose to enter dietary predictors as individual food items rather than calculate aggregates (e.g. total fat), on the grounds that not all animal species accumulate these lipophilic chemicals in their fatty tissues in a similar manner. In fact, a Swedish market basket study revealed much higher organochlorine pesticide and PCB concentrations in fish products than in meat (Darnerud et al., 2006). In agreement with Agudo et al. (2009), the most consistent dietary predictors in our population were those for PCBs. In this regard, fatty food items were in general associated with POP levels, such as blue fish consumption, which showed a positive relationship with levels of PCB-138, PCB-153, PCB-180 and *p,p'*-DDE, confirming previous reports (Agudo et al., 2009; Bjerne et al., 2013; Gallo et al., 2011; Llop et al., 2010; Rivas et al., 2007). Llobet et al. (2003) reported that PCB-153 was the most abundant persistent organic pollutant in food items, especially in fish. Other associations with fatty food in our population included higher levels of PCB-153 in lamb consumers, which corroborate findings by Arrebola et al. (2012b) in a Bolivian population. We also found a positive association between egg consumption and levels of PCB-153 and PCB-180, which is in agreement with the few studies that have addressed this issue (Arrebola et al., 2012c; Boada et al., 2014; Llop et al., 2010; Schuhmacher et al., 2007), although eggs have been acknowledged as a potential food item for POP accumulation (Eens et al., 2013; Gasull et al., 2011; Kupferschmidt, 2011; Porta et al., 2002). Dairy product consumption was also positively associated with PCB-180 concentrations, which is

consistent with previous findings (Agudo et al., 2009; Arrebola et al., 2010; Schuhmacher et al., 2007). Fat content might also be responsible for the positive association between legume consumption and PCB-138, given that legumes are very often cooked with meat and fatty products in Spain. In line with our previous findings, we observed inverse associations between POP levels and food items with a low fat content (e.g., PCB-180 and chicken or *p,p'*-DDE and vegetables). We also tested individual food items and found a negative association between octopus intake and *p,p'*-DDE ($\text{beta} = -0.46$, $p = 0.016$), PCB-138 ($\text{beta} = -0.50$, $p = 0.007$), and PCB-153 ($\text{beta} = -0.45$, $p = 0.013$) levels (data not shown in tables). Potential explanations for this finding include the low fat content of this animal and the removal before human consumption of its digestive glands, where it accumulates POPs (as in other cephalopod mollusks and shellfish) (Lopes et al., 2014). We found no association of POP levels with fruit consumption, which is in agreement with previous studies conducted in Spain (Gasull et al., 2011; Rivas et al., 2007; Vicente et al., 2004).

It should be noted that the cross-sectional design does not allow the inference of causality in the associations found. Other limitations include the relatively limited sample size, which impeded the performance of stratified analysis. In addition, no account was taken of the origin of the food, which might influence POP concentrations. A further limitation is related to the use of serum as an estimator of long-term exposure. It has been reported that serum POP levels are good estimators of ongoing exposure but not always of long-term exposure, because they can be affected by lipid mobilization and current exposure levels (Archibeque-Engle et al., 1997; Crinnion, 2009). However, an attempt was made to minimize this bias by adjusting all models for total lipids. Evidently, serum samples are more accessible for bio-monitoring purposes.

Although POP environmental levels are declining worldwide, there is a need for a continuous monitoring of human exposure and its potential effects in the general population, because even low exposure levels can interfere with the hormonal system (Arrebola et al., 2013b; Porta, 2006). The present study reports exposure data in a cohort of individuals from different areas of Spain and identifies potential sources of POP exposure that warrant further confirmation and implementation of the corresponding public health measures.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the scientific and technical assistance provided by Richard Davies. Dr J.P. Arrebola is currently receiving a postdoctoral fellowship from the Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales, Junta de Andalucía, Spain (RH-0092-2013). F. Artacho-Cordón has a fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU12/02524). This study was supported in part by research grants from CIBER de Epidemiología and Junta de Andalucía (SAS 01/264, P09-CTS-5488, SAS PI-0675-2010, EF-0708-2013, and PI-0513/2012). The results would not have been achieved without the selfless collaboration of the staff from the hospitals and the participants who took part in the study.

The study was partially funded by the "Acción Transversal del Cáncer", approved at the Spanish Ministry Council on the 11th October 2007, by the Instituto de Salud Carlos III-FEDER (PI08/1770, PS09/00773, PI11/01889, PI12/00488, PI12/01270, PI12/00715, PI12/00150), by the Fundación Marqués de Valdecilla (API 10/09), by the Recercaixa (2010ACUP 00310), by the Spanish Association Against Cancer (AECC) Scientific Foundation, and by the Catalan Government DURSI grant 2009SGR1489.

Samples: biological samples were stored at the Parc de Salut MAR Biobank (MARBio-banc; Barcelona), which is supported by Instituto de

Salud Carlos III FEDER (RD09/0076/00036). The sample collection was also supported by the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya, sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.162>.

References

- Addae, C., Cheng, H., Martínez-Ceballos, E., 2013. Effect of the environmental pollutant hexachlorobenzene (HCB) on the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 5244–5256.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004. ATSDR Annual Report 2004.
- Agudo, A., Goni, F., Etxeandia, A., Vives, A., Millán, E., Lopez, R., Ardanaz, E., Barricarte, A., Chirlaque, M.D., Dorronsoro, M., Jakszyn, P., Larranaga, N., Martínez, C., Navarro, C., Rodríguez, L., Sanchez, M.J., Tormo, M.J., Gonzalez, C.A., 2009. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: determinants of serum concentrations. *Environ. Res.* 109, 620–628.
- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., Trichopoulos, D., Adams, H.O., 1995. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 463–531.
- Alvarez-Pedrerol, M., Guzens, M., Ibarluzea, J., Rebagliato, M., Rodriguez, A., Espada, M., Goni, F., Basterrachea, M., Sunyer, J., 2009. Organochlorine compounds, iodine intake, and thyroid hormone levels during pregnancy. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7909–7915.
- Apostoli, P., Magoni, M., Bergonzi, R., Carasi, S., Indelicato, A., Scarrella, C., Donato, F., 2005. Assessment of reference values for polychlorinated biphenyl concentration in human blood. *Chemosphere* 61, 413–421.
- Archibeque-Engle, S.L., Tessari, J.D., Winn, D.T., Keeffe, T.J., Nett, T.M., Zheng, T., 1997. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J. Toxicol. Environ. Health* 52, 285–293.
- Arrebola, J.P., Martín-Olmedo, P., Fernández, M.F., Sánchez-Cantalejo, E., Jiménez-Ríos, J.A., Torne, P., Porta, M., Olea, N., 2009. Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: a multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ. Int.* 35, 27–32.
- Arrebola, J.P., Fernández, M.F., Porta, M., Rosell, J., de la Ossa, R.M., Olea, N., Martín-Olmedo, P., 2010. Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ. Int.* 36, 705–713.
- Arrebola, J.P., Cuellar, M., Claire, E., Quevedo, M., Antelo, S.R., Mutch, E., Ramirez, E., Fernández, M.F., Olea, N., Mercado, L.A., 2012a. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. *Environ. Res.* 112, 40–47.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Cuellar, M., Quevedo, M., Claire, E., Mejia, L.M., Fernández-Rodríguez, M., Freire, C., Olea, N., Mercado, L.A., 2012b. Factors influencing combined exposure to three indicator polychlorinated biphenyls in an adult cohort from Bolivia. *Environ. Res.* 116, 17–25.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Rivero, M., Choque, A., Silvestre, S., Olea, N., Ocaña-Riola, R., Mercado, L.A., 2012c. Contribution of sociodemographic characteristics, occupation, diet and lifestyle to DDT and DDE concentrations in serum and adipose tissue from a Bolivian cohort. *Environ. Int.* 38, 54–61.
- Arrebola, J.P., Fernández, M.F., Olea, N., Ramos, R., Martín-Olmedo, P., 2013. Human exposure to p,p'-dichlorodiphenylchloroethylene (p,p'-DDE) in urban and semi-rural areas in southeast Spain: a gender perspective. *Sci. Total Environ.* 458–460, 209–216.
- Arrebola, J.P., Fernández, M.F., Olea, N., Ramos, R., Martín-Olmedo, P., 2013a. Human exposure to p,p'-dichlorodiphenylchloroethylene (p,p'-DDE) in urban and semi-rural areas in southeast Spain: a gender perspective. *Sci. Total Environ.* 458–460, 209–216.
- Arrebola, J.P., Pumarega, J., Gasull, M., Fernández, M.F., Martín-Olmedo, P., Molina-Molina, J.M., Fernández-Rodríguez, M., Porta, M., Olea, N., 2013b. Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ. Res.* 122, 31–37.
- ATSDR, 1996. Toxicological Profile for Hexachlorobenzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- ATSDR, 2000. Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (Update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services, Atlanta.
- Aurrekoetxea Agirre, J.J., Zubero, M.B., Jiménez García, C., Goñi Irigoyen, F., Cambra Contin, K., Alonso Fustel, E., Cadiñanos Díaz-Tejedo, M.C., 2011. Exposure to lindane, other pesticides and organochlorines in the general population Barakaldo, Spain. *Rev. Esp. Salud Pública* 85, 189–204.
- Ben, H.S., Hammami, B., Ben, A.W., El, M.Y., Barhoumi, B., El, A.R., Driss, M.R., 2014. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and their relation with age, gender, and BMI for the general population of Bizerte, Tunisia. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 6303–6313.
- Bergoni, R., Specchia, C., Dinolfo, M., Tomasi, C., De, P.G., Fusca, T., Apostoli, P., 2009. Distribution of persistent organochlorine pollutants in maternal and foetal tissues: data from an Italian polluted urban area. *Chemosphere* 76, 747–754.
- Bjermo, H., Darnenud, P.O., Pearson, M., Barbieri, H.E., Lindroos, A.K., Nalsen, C., Lindh, C.H., Jonsson, B.A., Glynn, A., 2013. Serum concentrations of perfluorinated alkyl acids and their associations with diet and personal characteristics among Swedish adults. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 2206–2215.
- Boada, L.D., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Almeida-González, M., Alvarez-Leon, E.E., Serra-Majem, L., Luzardo, O.P., 2012. Complex organochlorine pesticide mixtures as determinant factor for breast cancer risk: a population-based case-control study in the Canary Islands (Spain). *Environ. Health* 11, 28.
- Boada, L.D., Sangil, M., Alvarez-Leon, E.E., Hernandez-Rodriguez, G., Henríquez-Hernández, L.A., Gamacho, M., Zumbado, M., Serra-Majem, L., Luzardo, O.P., 2014. Consumption of foods of animal origin as determinant of contamination by organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls: results from a population-based study in Spain. *Chemosphere* 114, 121–128.
- Burgaz, S., Afkham, B.L., Karakaya, A.E., 1994. Organochlorine pesticide contaminants in human adipose tissue collected in Ankara (Turkey) 1991–1992. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 501–508.
- Carreño, J., Rivas, A., Granada, A., Jose Lopez-Espinosa, M., Mariscal, M., Olea, N., Olea-Serrano, F., 2007. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ. Res.* 103, 55–61.
- Castano-Vinyls, G., Aragones, N., Perez-Gomez, B., Martín, V., Llorca, J., Monzo, V., Altzibar, J.M., Ardanaz, E., de Sanjosé, S., Jimenez-Moleón, J.J., Tardon, A., Alguacil, J., Peiro, R., Marcos-Gragera, R., Navarro, C., Pollán, M., Kogevinas, M., 2015. Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): rationale and study design. *Gac. Sanit.* 29 (4), 308–315.
- CDC, 2005. Centers for Disease Control and Prevention. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. CDC, Atlanta (GA).
- CDC, 2009. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
- Cerrillo, I., Olea-Serrano, M.F., Ibarluzea, J., Exposito, J., Torne, P., Laguna, J., Pedraza, V., Olea, N., 2006. Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 62, 1917–1924.
- Covaci, A., Voorspoels, S., Roosen, L., Jacobs, W., Bust, R., Neels, H., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. *Chemosphere* 73 (2), 170–175.
- Crinnion, W.J., 2009. Chlorinated pesticides: threats to health and importance of detection. *Altern. Med. Rev.* 14, 347–359.
- Daglioglu, N., Gulmen, M.K., Akcan, R., Elkoglu, P., Yener, F., Unal, I., 2010. Determination of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Cukurova, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 97–102.
- Damerud, P.O., Atuma, S., Aune, M., Bjerselius, R., Glynn, A., Grawe, K.P., Becker, W., 2006. Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1597–1606.
- Ems, M., Jaspers, V.L., Van den Steen, E., Bateson, M., Carere, C., Clergeau, P., Costantini, D., Dolenc, Z., Elliott, J.E., Flux, J., Gwinner, H., Halbrook, R.S., Heeb, P., Mazgajski, T.D., Moksnes, A., Polo, V., Soler, J.J., Sinclair, R., Veiga, J.P., Williams, T.D., Covaci, A., Pirxten, R., 2013. Can starling eggs be useful as a biomonitoring tool to study organohalogenated contaminants on a worldwide scale? *Environ. Int.* 51, 141–149.
- EPA, 1989. Environmental Fate and Effects Division, Pesticide Environmental Fate One Line Summary: DDT (p,p'). US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Fernández, M.F., Araque, P., Kivimäki, H., Molina-Molina, J.M., Rantakokko, P., Laine, O., Vartiainen, T., Olea, N., 2007. PBDEs and PBBs in the adipose tissue of women from Spain I. *Chemosphere* 66, 377–383.
- Gallo, M.V., Schell, L.M., DeCaprio, A.P., Jacobs, A., 2011. Levels of persistent organic pollutant and their predictors among young adults. *Chemosphere* 83, 1374–1382.
- Gañ, M., Bosch, C., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2014. Impacts of atmospheric chlor-alkali factory emissions in surrounding populations. *Environ. Int.* 65, 1–8.
- Gascon, M., Verner, M.A., Guxens, M., Grimalt, J.O., Forn, J., Ibarluzea, J., Lertxundi, N., Ballester, F., Llop, S., Haddad, S., Sunyer, J., Vrijheid, M., 2013. Evaluating the neurotoxic effects of lactational exposure to persistent organic pollutants (POPs) in Spanish children. *Neurotoxicology* 34, 9–15.
- Gasull, M., Bosch, de, B.M., Puigdomenech, E., Pumarega, J., Porta, M., 2011. Empirical analyses of the influence of diet on human concentrations of persistent organic pollutants: a systematic review of all studies conducted in Spain. *Environ. Int.* 37, 1226–1235.
- Gasull, M., Pumarega, J., Tellez-Plaza, M., Castell, C., Tresserras, R., Lee, D.H., Porta, M., 2012. Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of Catalonia. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7799–7810.
- Glynn, A.W., Granath, F., Aune, M., Atuma, S., Damerud, P.O., Bjerselius, R., Vainio, H., Weiderpass, E., 2003. Organochlorines in Swedish women: determinants of serum concentrations. *Environ. Health Perspect.* 111, 349–355.
- Gomara, B., Bordajandi, L.R., Fernandez, M.A., Herrero, L., Abad, E., Abalos, M., Rivera, J., Gonzalez, M.J., 2005. Levels and trends of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Spanish commercial fish and shellfish products, 1995–2003. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8406–8413.
- Grun, F., Blumberg, B., 2007. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 161–171.
- Hansen, S., Nieboer, E., Odland, J.O., Wilsgaard, T., Veyhe, A.S., Sandanger, T.M., 2010. Levels of organochlorines and lipids across pregnancy, delivery and postpartum periods in women from Northern Norway. *J. Environ. Monit.* 12, 2128–2137.
- Hardell, E., Carlberg, M., Nordstrom, M., van Bavel, B., 2010. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993–2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci. Total Environ.* 408, 4412–4419.
- Henríquez-Hernández, L.A., Luzardo, O.P., Almeida-González, M., Álvarez-Leon, E.E., Serra-Majem, L., Zumbado, M., Boada, L.D., 2011. Background levels of polychlorinated biphenyls in the population of the Canary Islands (Spain). *Environ. Res.* 111, 10–16.

- Howsam, M., Grimalt, J.O., Guino, E., Navarro, M., Martí-Rague, J., Peinado, M.A., Capella, G., Moreno, V., 2004. Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. *Environ. Health Perspect.* 112, 1460–1466.
- Hsu, W.W., Osuch, J.R., Todem, D., Tafle, B., O'Keefe, M., Adera, S., Karmaus, W., 2014. DDE and PCB serum concentration in maternal blood and their adult female offspring. *Environ. Res.* 132, 384–390.
- Huetos, O., Bartolome, M., Aragones, N., Cervantes-Amat, M., Esteban, M., Ruiz-Moraga, M., Perez-Gomez, B., Calvo, E., Vila, M., Castano, A., 2014. Serum PCB levels in a representative sample of the Spanish adult population: the BIOAMBIENTES project. *Sci. Total Environ.* 493, 834–844.
- Hunter, D.J., Hankinson, S.E., Laden, F., Colditz, G.A., Manson, J.E., Willett, W.C., Speizer, F.E., Wolff, M.S., 1997. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 337, 1253–1258.
- Ibarluzea, J., Alvarez-Pedrerol, M., Guxens, M., Marina, L.S., Basterrechea, M., Lertxundi, A., Ekxandia, A., Goni, F., Vioque, J., Ballester, F., Sunyer, J., 2011. Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere* 82, 114–120.
- Jakszyn, P., Goni, F., Etxebarria, A., Vives, A., Millan, E., Lopez, R., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Chiriac, M.D., Dornonoro, M., Laranaga, N., Martinez, C., Navarro, C., Rodriguez, L., Sanchez, M.J., Tommo, M.J., Gonzalez, C.A., Agudo, A., 2009. Serum levels of organochlorine pesticides in healthy adults from five regions of Spain. *Chemosphere* 76, 1518–1524.
- Juberg, D.R., 2000. An evaluation of endocrine modulators: implications for human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 93–105.
- Jung, K.H., Kim, J.K., Kim, M.G., Noh, J.H., Eun, J.W., Bae, H.J., Chang, Y.G., Shen, Q., Park, W.S., Lee, J.Y., Nam, S.W., 2012. Characteristic molecular signature for early detection and prediction of persistent organic pollutants in rat liver. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12882–12889.
- Kalantzi, O.I., Geens, T., Covaci, A., Siskos, P.A., 2011. Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece. *Environ. Int.* 37, 349–353.
- Kang, J.H., Park, H., Chang, Y.S., Choi, J.W., 2008. Distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human serum from urban areas in Korea. *Chemosphere* 73, 1625–1631.
- Karman, A., van Bavel, B., Jarnberg, U., Hardell, L., Lindstrom, G., 2006. Perfluorinated chemicals in relation to other persistent organic pollutants in human blood. *Chemosphere* 64, 1582–1591.
- Kirman, C.R., Aylward, L.L., Hays, S.M., Krishnan, K., Nong, A., 2011. Biomonitoring equivalents for DDT/DDE. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 172–180.
- Kroon, L.A., 2007. Drug interactions with smoking. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 64, 1917–1921.
- Kupferschmid, K., 2011. Dioxin scandal triggers food debate in Germany. *CMAJ* 183, E221–E222.
- Li, J., Li, N., Ma, M., Giesy, J.P., Wang, Z., 2008. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicol. Lett.* 183, 65–71.
- Liu, J., Scheer, E., 2012. Pesticide exposure and child neurodevelopment: summary and implications. *Work. Health Saf.* 60, 235–242.
- Llobet, J.M., Bocio, A., Domingo, J.L., Teixido, A., Casas, C., Muller, L., 2003. Levels of polychlorinated biphenyls in foods from Catalonia, Spain: estimated dietary intake. *J. Food Prot.* 66, 479–484.
- Llop, S., Ballester, F., Vizcaino, E., Murcia, M., Lopez-Espinosa, M.J., Rebagliato, M., Vioque, J., Marco, A., Grimalt, J.O., 2010. Concentrations and determinants of organochlorine levels among pregnant women in Eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 408, 5758–5767.
- Lopes, V.M., Baptista, M., Repolho, T., Rosa, R., Costa, P.R., 2014. Uptake, transfer and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquat. Toxicol.* 146, 205–211.
- Lopez-Espinosa, M.J., Vizcaino, E., Murcia, M., Llop, S., Espada, M., Seco, V., Marco, A., Rebagliato, M., Grimalt, J.O., Ballester, F., 2009. Association between thyroid hormone levels and 4,4'-DDE concentrations in pregnant women (Valencia, Spain). *Environ. Res.* 109 (4), 479–485.
- López-Flores, I., González-Alzaga, B., Casal, A., Lacasaña, M., 2009. Exposición laboral a plaguicidas y efectos en la salud: contribución de factores biológicos y sociales. In: Sanín-Aguirre, L.H., Cedillo, L., Guevara-Godínez, R.M. (Eds.), *Género Salud y Ambiente laboral. Género Salud y Ambiente laboral*. Chihuahua, México.
- Mari, M., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2013. Body burden monitoring of dioxins and other organic substances in workers at a hazardous waste incinerator. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 728–734.
- McFerran, P.G., Anderson, L.A., Anwar, A.J., Eggo, M.C., Crocker, J., Barnett, A.H., Stewart, P.M., Kumar, S., 2002. Glucocorticoid regulation of p450 aromatase activity in human adipose tissue: gender and site differences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1327–1336.
- Mercado, L.A., Freille, S.M., Vaca-Pereira, J., Cuellar, M., Flores, L., Mutch, E., Olea, N., Arrebola, J.P., 2013. Serum concentrations of p, p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (p, p'-DDE) in a sample of agricultural workers from Bolivia. *Chemosphere* 91 (10), 1381–1385.
- Morales, E., Gascon, M., Martínez, D., Casas, M., Ballester, F., Rodríguez-Bernal, C.L., Ibarluzea, J., Marina, L.S., Espada, M., Goni, F., Vizcaino, E., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2013. Associations between blood persistent organic pollutants and 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Environ. Int.* 57–58, 34–41.
- Moser, G.A., McLachlan, M.S., 2001. The influence of dietary concentration on the absorption and excretion of persistent lipophilic organic pollutants in the human intestinal tract. *Chemosphere* 45, 201–211.
- Mrema, E.J., Rubino, F.M., Brambilla, G., Moretto, A., Tzatsakis, A.M., Colosio, C., 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307, 74–88.
- Phillips, D.L., Pirkle, J.L., Buse, V.W., Bernert Jr., J.T., Henderson, L.O., Needham, L.L., 1989. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 495–500.
- Porta, M., Malats, N., Jariod, M., Grimalt, J.O., Rifa, J., Carrato, A., et al., 1999. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Lancet* 354, 2125–2129.
- Porta, M., 2006. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002: response to Lee et al. *Diabetes Care* 29, 2567.
- Porta, M., Zumeta, E., Ruiz, L., Jariod, M., Malats, N., Marco, E., Carrato, A., Real, F.X., Grimalt, J.O., 2002. The influence of age and gender on serum concentrations of p, p'-DDE and the DDT/DDE ratio in subjects with exocrine pancreatic cancer. *Organohalogen Compd.* 59, 351–354.
- Porta, M., Gasull, M., Puigdomenech, E., Gari, M., de Basea, M.B., Guillen, M., Lopez, T., Bigas, E., Pumarega, J., Ibebaria, X., Grimalt, J.O., Tresserras, R., 2010. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Catalonia. *Environ. Int.* 36, 655–664.
- Porta, M., López, T., Gasull, M., Rodríguez-Sanz, M., Gari, M., Pumarega, J., Borrell, C., Grimalt, J.O., 2012. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Barcelona in 2006, and comparison with levels in 2002. *Sci. Total Environ.* 15 (423), 151–161.
- Porta, M., Lopez, T., Gasull, M., Rodríguez-Sanz, M., Gari, M., Pumarega, J., Borrell, C., Grimalt, J.O., 2012a. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Barcelona in 2006, and comparison with levels in 2002. *Sci. Total Environ.* 423, 151–161.
- Porta, M., Pumarega, J., Gasull, M., 2012b. Number of persistent organic pollutants detected at high concentrations in a general population. *Environ. Int.* 44, 106–111.
- Rivas, A., Fernandez, M.F., Cerrillo, I., Ibarluzea, J., Olea-Serrano, M.F., Pedraza, V., Olea, N., 2001. Human exposure to endocrine disruptors: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 109, 185–197.
- Rivas, A., Cerrillo, I., Granada, A., Mariscal-Arcas, M., Olea-Serrano, F., 2007. Pesticide exposure of two age groups of women and its relationship with their diet. *Sci. Total Environ.* 382, 14–21.
- Rusiecki, J.A., Baccarelli, A., Bollati, V., Tarantini, L., Moore, L.E., Bonfeld-Jorgensen, E.C., 2008. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ. Health Perspect.* 116, 1547–1552.
- Sala, M., Sunyer, J., Otero, R., Santiago-Silva, M., Camps, C., Grimalt, J., 1999. Organochlorine in the serum of inhabitants living near an electrochemical factory 39. *Occup. Environ. Med.* 56, 152–158.
- Saoudi, A., Frery, N., Zeghnoun, A., Bidondo, M.L., Deschamps, V., Goen, T., Garnier, R., Guldner, L., 2014. Serum levels of organochlorine pesticides in the French adult population: the French National Nutrition and Health Study (ENNS), 2006–2007. *Sci. Total Environ.* 472, 1089–1099.
- Schuhmacher, M., Kiviranta, H., Vartiainen, T., Domingo, J.L., 2007. Concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in milk of women from Catalonia, Spain. *Chemosphere* 67, S295–S300.
- Sharpe, R.M., Drake, A.J., 2013. Obesogens and obesity—an alternative view? *Obesity (Silver Spring)* 21, 1081–1083.
- Silbergeld, E.K., Flaws, J.A., 2002. Environmental exposures and women's health. *Clin. Obstet. Gynecol.* 45, 1119–1128.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl 7), 113–122.
- Sunyer, J., Garcia-Esteban, R., Alvarez, M., Guxens, M., Goni, F., Basterrechea, M., Vrijheid, M., Guerra, S., Anto, J.M., 2010. DDE in mothers' blood during pregnancy and lower respiratory tract infections in their infants. *Epidemiology* 21, 729–735.
- Thomas, G.O., Wilkinson, M., Hodson, S., Jones, K.C., 2006. Organohalogen chemicals in human blood from the United Kingdom. *Environ. Pollut.* 141, 30–41.
- To-Figueras, J., Sala, M., Otero, R., Barrot, C., Santiago-Silva, M., Rodamilans, M., Herrero, C., Grimalt, J., Sunyer, J., 1997. Metabolism of hexachlorobenzene in humans: association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population. *Environ. Health Perspect.* 105, 78–83.
- To-Figueras, J., Barrot, C., Sala, M., et al., 2000. Excretion of hexachlorobenzene and metabolites in feces in a highly exposed human population. *Environ. Health Perspect.* 108 (7), 595–598.
- Tsukino, H., Hanaoka, T., Sasaki, H., Motoyama, H., Hiroshima, M., Tanaka, T., Kabuto, M., Turner, W., Patterson Jr., D.G., Needham, L., Tsugane, S., 2006. Fish intake and serum levels of organochlorines among Japanese women. *Sci. Total Environ.* 359, 90–100.
- Turó, R., Balducci, C., Brambilla, G., Colosio, C., Imbriani, M., Mantovani, A., Vellere, F., Minoia, C., 2010. A simple and fast method for the determination of selected organohalogenated compounds in serum samples from the general population. *Toxicol. Lett.* 192, 66–71.
- UNEP, 2012. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). www.pops.int (United Nations Environmental Programme).
- van den Berg, H., 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ. Health Perspect.* 117, 1656–1663.
- Veyhe, A.S., Hofoss, D., Hansen, S., Thomassen, Y., Sandanger, T.M., Odland, J.O., Nieboer, E., 2015. The northern Norway mother-and-child contaminant cohort (MISA) study: PCA analyses of environmental contaminants in maternal sera and dietary intake in early pregnancy. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 254–264.
- Vicente, A., Arques, J.F., Vilalbi, J.R., Centrich, F., Serrahima, E., Ibebaria, X., Casas, C., 2004. Pesticides in the diet: adding pieces to the puzzle. *Gac. Sanit.* 18, 425–430.
- Vrijheid, M., Martínez, D., Aguilera, I., Ballester, F., Basterrechea, M., Espigues, A., Guxens, M., Laranaga, M., Lertxundi, A., Mendez, M., Murcia, M., Marina, L.S., Villanueva, C.M., Sunyer, J., 2012. Socioeconomic status and exposure to multiple environmental

- pollutants during pregnancy: evidence for environmental inequity? *J. Epidemiol. Community Health* 66, 106–113.
- Waliszewski, S.M., Pardo, S.V., Infanzon, R.M., Rivera, J., 1995. Determination of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue: 1992 study in Mexico 1. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 43–49.
- WHO, 1979. Environmental Health Criteria No.9. DDT and Its Derivatives. UNEP, WHO, Geneva.
- WHO, 2000. Chapter 5.10 Polychlorinated Biphenyls (PCBs). WHO Regional Office for Europe Air Quality Guidelines.
- WHO, 2010. BMI Classification. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (accessed May 2010). World Health Organisation).
- Wolff, M.S., Anderson, H.A., Britton, J.A., Rothman, N., 2007. Pharmacokinetic variability and modern epidemiology—the example of dichlorodiphenyltrichloroethane, body mass index, and birth cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 1925–1930.
- World Health Organisation, 2013. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
- Zumbado, M., Goethals, M., Alvarez-Leon, E.E., Luzardo, O.P., Cabrera, F., Serra-Majem, L., Dominguez-Boada, L., 2005. Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). *Sci. Total Environ.* 339, 49–62.

Discusión

A pesar de las prohibiciones y restricciones en el uso, la población española continua presentando niveles detectables de diversos COPs, que se encuentran en un rango de medias geométricas de concentraciones comprendido entre 0,24 ng/ml para el HCB y 1,04 ng/ml para el *p,p'*-DDE, aunque es cierto que, en general, existe una tendencia decreciente en los niveles de COPs en muestras biológicas humanas, pero todavía se detectan en prácticamente todos los individuos (Salihovic et al., 2012). Nuestros resultados confirman la tendencia decreciente para la mayoría de los compuestos cuando se compara con otros estudios del mismo ámbito geográfico (Jakszyn et al., 2009) y en un rango de concentraciones similar a estudios recientes (Arrebola et al., 2013a; Gascon et al., 2013; Morales et al., 2013).

Los modelos multivariantes empleados para investigar los factores predictores de la exposición han puesto de manifiesto importantes diferencias relacionadas con el sexo, de tal manera que las mujeres mostraron concentraciones superiores de HCB superiores a los hombres y concentraciones de *p, p'*-DDE inferiores a las de los hombres, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los COPs. Parece ser que los hombres las enzimas relacionadas con el citocromo P-450 ejercen una mayor actividad que en las mujeres (McTernan et al., 2002; Moser and McLachlan, 2001; Silbergeld and Flaws, 2002), lo que podría explicar los niveles más bajos de HCB y mayores niveles de *p, p'*-DDE en los hombres, ya que se trata del resultado de la metabolización del compuesto original, DDT. Además, la existencia de una mayor excreción urinaria de HCB sulfo-conjugado en los hombres (To-Figueras et al., 1997), soporta esta hipótesis. Otras razones para justificar diferencias entre hombre y mujer podrían incluir las diferencias en el porcentaje de grasa corporal entre ambos sexos (López-Flores et al., 2009). Curiosamente, en un estudio de adultos españoles sanos de diferentes regiones del país, Jakszyn et al. (2009), encontraron resultados muy similares a este estudio, con concentraciones séricas de HCB más bajos en los hombres que en las mujeres, pero con mayores concentraciones de *p, p'*-DDE. Además, como se comentará a continuación, la lactancia es una ruta fundamental en la excreción de COPs en mujeres (Cerrillo et al., 2006; Hardell et al., 2010), lo que podría ser más relevante

para el *p, p'*-DDE, que muestra una liposolubilidad moderadamente más alta que la del HCB ($Kow = 5,31$ vs. $6,51$, respectivamente) (EPA, 1989), por tanto, esta vía de eliminación podría ser más efectiva en caso del *p,p'*-DDE y contribuir a las diferencias entre sexos encontrada.

Por otro lado, la edad de los participantes se asoció positivamente con las concentraciones de HCB, *p, p'*-DDE y PCB-180. Esta asociación ha sido referida en estudios previos (Apostoli et al., 2005; Arrebola et al., 2012b; Hansen et al., 2010; Hardell et al., 2010; Jakszyn et al., 2009; Rivas et al., 2007). La asociación positiva entre la edad y la carga de COPs podría explicarse en base a las propiedades de persistencia y bioacumulación de estos compuestos químicos en los tejidos grasos humanos, así como a la exposición continua de la población (Arrebola et al., 2009; Burgaz et al., 1994; Daglioglu et al., 2010; Waliszewski et al., 1995). Esta asociación podría también deberse a un efecto cohorte, por el cual las personas de mayor edad podrían haber acumulado las concentraciones de COPs superiores porque nacieron cuando estos productos químicos estaban siendo usados con mayor frecuencia (Ahlborg et al., 1995; Arrebola et al., 2012c; Glynn et al., 2003; Jakszyn et al., 2009) y pertenecen así a las generaciones de mayor exposición personal.

El grado de obesidad, medido como IMC, se asoció positivamente con los niveles séricos de *p, p'*-DDE y negativamente con los de PCB-138. En la literatura científica existente, hay resultados contradictorios a este respecto, con informes positivos, negativos o incluso de ninguna asociación (Hansen et al., 2010; Hunter et al., 1997; Sala et al., 1999; Wolff et al., 2007). Podría asumirse que el IMC es un indicador de consumo de alimentos, con una mayor ingesta de alimentos grasos y, en consecuencia, una mayor ingesta de COPs, por parte de los individuos más obesos (Hardell et al., 2010). Pero al mismo tiempo, podría existir un efecto de dilución de los residuos a partir de cierto grado de obesidad que puede afectar a las concentraciones de COPs medidas (Arrebola et al., 2012c; Porta et al., 2012b), aunque este fenómeno sería más evidente en las determinaciones sobre muestras de tejido adiposo que en suero (Ben et al., 2014). Esta cuestión se hace todavía más compleja si se tiene en cuenta que también podría considerarse a la obesidad como una consecuencia de la exposición, dado que muchos de estos residuos han sido reconocidos como obesógenos potenciales, es decir, capaces de alterar la acumulación de lípidos en el organismos y la adipogénesis (Grun and

Blumberg, 2007), y por lo tanto inducir obesidad y trastornos relacionados con la misma (Sharpe and Drake, 2013). Ibarluzea et al. (2011) describieron una asociación similar (negativa) entre los niveles séricos de PCB-138 y el grado de obesidad, en una muestra de mujeres españolas embarazadas.

El tiempo acumulado de residencia en zona urbana se asoció positivamente con las concentraciones séricas de PCB-153, lo que sugiere el origen industrial de esta exposición. Es de interés que el área de residencia parezca tener una fuerte influencia en la exposición a COPs, ya que este hallazgo podría estar relacionado con diferentes patrones de exposición de las distintas poblaciones de la muestra o por efecto de otras variables no incluidas en los modelos. Así por ejemplo, los participantes reclutados en Navarra mostraron las mayores concentraciones de los COPs relacionados con las actividades industriales (PCB, HCB), y los de Madrid mostraron los más altos niveles de *p*, *p'*-DDE; mientras que las concentraciones de COPs más bajas siempre se encontraron en los participantes originarios de Cantabria. Es importante señalar que estas regiones del estudio están más industrializadas en comparación al promedio de España.

Diferencias regionales en la exposición COPs en España también han sido documentadas por Jakszyn et al. (2009) y Vrijheid et al. (2012). En nuestro estudio hemos optado por mostrar los resultados de forma global dado que el limitado tamaño de muestra nos impidió realizar un análisis estratificado por zonas de reclutamiento. A pesar de ello, consideramos que los resultados son lo suficientemente llamativos para justificar la necesidad de un mayor número de estudios de biomonitorización de la exposición humana a COPs en muestras de población más grandes, con el fin de esclarecer los diferentes niveles de exposición y los predictores en las diferentes regiones del país. Por último, es cierto que en España también se han identificado ciertos "puntos calientes" de exposición a COPs (Fernandez et al., 2013; Ribas-Fito et al., 2003), relacionados mayoritariamente con una exposición accidental o derivada de actividades industriales o agrícolas locales, aunque en la mayoría de estos estudios se señala también la importancia del estilo de vida y los hábitos alimentarios como determinantes de la exposición (Rusiecki et al., 2008).

La exposición COPs en esta submuestra de la población participante en el proyecto MCC-Spain se asoció inversamente con el número de embarazos previos al nacimiento del participante (embarazos de sus madres) y positivamente con la lactancia materna recibida por parte de sus madres. Es muy interesante la observación de que, en nuestra población de estudio, estas fuentes de exposición influyen en los niveles de exposición de forma más relevante que el número de hijos de la participante o la lactancia que procuraron a sus hijos. Esto enfatiza la importancia de la exposición temprana a estos contaminantes, que puede condicionar la acumulación de estos residuos en el organismo a lo largo de toda la vida, ya que la exposición ambiental y alimentaria a COPs sigue una tendencia decreciente y los niveles actuales son menores que los observados hace décadas. En este sentido, Gallo et al. (2011) también encontraron asociaciones positivas entre la lactancia materna recibida y la exposición a COPs. Tanto paridad como lactancia se han descrito como las principales rutas de eliminación de COPs (Cerrillo et al., 2006; Hansen et al., 2010; Hardell et al., 2010; Veyhe et al., 2015) para la mujer expuesta.

En cuanto a las características específicas de las mujeres, encontramos mayores concentraciones de *p*, *p'*-DDE, HCB, PCB-138 y PCB-180 en mujeres premenopáusicas frente a post-menopáusicas. En este sentido, Rivas et al. (2007), encontraron asociaciones similares con una serie de plaguicidas organoclorados, con la excepción de *p*, *p'*-DDE. Como se mencionó anteriormente, las mujeres mayores suelen mostrar niveles más altos de COPs, aunque probablemente esto no explique la asociación encontrada ya que todos los modelos estadísticos se ajustaron por la variable edad. No podemos excluir que este hallazgo podría relacionarse con diferentes patrones de estilo de vida de las mujeres pre y post menopáusicas que no se hayan recogido para este estudio, por ejemplo cambios recientes en la dieta, pérdida de peso o ejercicio físico.

El hábito tabáquico se asoció negativamente con la exposición a HCB y PCB-153, y se observó un patrón interesante por el que los fumadores actuales mostraron las concentraciones más bajas, seguido por los ex fumadores, y luego los no fumadores. Se ha documentado que los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el humo de los cigarrillos son potentes inductores de citocromo P450, isoformas 1A1 y 1A2 (Kroon, 2007), que son las enzimas que metabolizan sustancias tóxicas, lo que podría

explicar los niveles más bajos de los fumadores. Una asociación similar fue observada con los niveles de exposición a DDT en la cohorte de Santa Cruz de la Sierra en Bolivia, por la cual las personas fumadoras presentaban menores niveles del plaguicida DDT pero mayores de su principal metabolito *p,p'*-DDE, probablemente a consecuencia de un mayor grado de metabolización del compuesto de origen (Arrebola et al., 2012c). Sin embargo, Apostoli et al. (2005) no encontraron ninguna asociación entre el hábito de fumar y las concentraciones de PCBs en una población italiana.

Se estima que la dieta -alimentos grasos, especialmente-, es el principal contribuyente a la exposición a COPs en la población general (Aurrekoetxea Agirre et al., 2011; Llobet et al., 2003; Porta et al., 2012a). La evaluación de predictores dietéticos de las concentraciones de COPs plantea ciertos problemas metodológicos, dadas las diversas posibilidades de estimación del consumo de alimentos. De hecho, Jakszyn et al. (2009) no encontraron ningún predictor de la dieta para los niveles de pesticidas OCs en el estudio EPIC-España, pero Agudo et al. (2009) reportaron una asociación positiva entre el consumo de pescado y la exposición a los PCBs en la misma población de estudio. En el presente trabajo se optó por introducir predictores dietéticos como alimentos individuales y no calcular agregados (por ejemplo, grasa total) dado que no todas las especies animales acumulan estas sustancias lipofílicas en sus tejidos grasos de una manera similar. De hecho, un estudio de la cesta de mercado sueco reveló concentraciones de plaguicidas organoclorados y PCBs mucho más altos en pescado que en la carne (Darnerud et al., 2006). Coincidiendo con Agudo y colaboradores (2009), los predictores dietéticos más consistentes en nuestra población se obtuvieron para los PCBs. En este sentido, los alimentos grasos se asociaron en general con los niveles de COPs, tales como el consumo de pescado azul, que mostró una relación positiva con los niveles de PCB-138, PCB-153, PCB-180 y *p, p'*-DDE, confirmando trabajos anteriores (Agudo et al., 2009; Bjermo et al., 2013; Gallo et al., 2011; Llop et al., 2010; Rivas et al., 2007). De hecho, Llobet et al. (2003) informaron que el PCB-153 fue el más abundante de los COPs en los alimentos, especialmente en el pescado.

Otra asociación con alimentos grasos en la población MCC incluye los niveles más altos de PCB-153 en los consumidores de cordero. Además, se encontró una asociación positiva entre el consumo de huevos y los niveles de PCB-153 y PCB-180, en sintonía con los pocos estudios que han abordado previamente esta cuestión (Boada et al.,

2014;Llop et al., 2010;Schuhmacher et al., 2007), a pesar de que estos han sido reconocidos como un posible marcador de contaminación por su acumulación de COPs (Eens et al., 2013;Gasull et al., 2011;Porta et al., 2002) , ya que hay indicios de que en ciertos casos, las mezclas de aceites que se destinan a ser utilizados en la producción industrial de lubricantes también se usan para alimentación animal (Kupferschmidt, 2011). El consumo de productos lácteos también se asoció positivamente con las concentraciones de PCB-180, al igual que algunos resultados de estudios anteriores (Agudo et al., 2009;Arrebola et al., 2010;Schuhmacher et al., 2007). El contenido de grasa también puede ser responsable de la asociación positiva entre el consumo de legumbres y PCB-138, teniendo en cuenta que, en España, las legumbres son muy a menudo cocinadas con carne y productos grasos. De acuerdo con nuestros resultados anteriores en los que se aprecian asociaciones positivas con alimentos grasos, encontramos asociaciones inversas entre los niveles de COPs y alimentos con bajo contenido de grasa, como pollo con PCB-180, verduras con *p*, *p'*-DDE. Además, la ingesta de pulpo también se asoció negativamente con *p*, *p'*-DDE, PCB-138 y PCB-153. Posibles explicaciones para este hallazgo incluyen el bajo contenido de grasa de este animal y la eliminación de su glándulas digestivas antes del consumo humano, que es el lugar donde se acumulan los COPs, como el resto de moluscos cefalópodo o mariscos, ya que el pulpo no metaboliza este tipo de compuestos (Lopes et al., 2014). No se encontró ninguna asociación de los niveles de COPs con el consumo de fruta, de acuerdo con investigaciones previas llevadas a cabo en España (Gasull et al., 2011;Rivas et al., 2007;Vicente et al., 2004).

Cabe señalar que, dado el diseño transversal, no se puede descartar por completo una causalidad inversa en algunas de las asociaciones encontradas. Otras limitaciones del trabajo incluyen un tamaño de muestra relativamente limitada que no permitía realizar análisis estratificado. Por otro lado, asumimos no se tuvo en cuenta el origen de los alimentos consumidos, lo que podría influir en las concentraciones de COPs. Además, los niveles séricos de COPs pueden ser buenos estimadores de exposición en un momento dado, pero no siempre a largo plazo, ya que pueden ser afectados por la movilización de lípidos y los niveles de exposición actuales (Archibeque-Engle et al., 1997;Crinnion, 2009). Sin embargo, se trató de minimizar este sesgo ajustando todos los modelos por lípidos totales.

En definitiva, aunque los niveles ambientales de COPs están disminuyendo en la mayor parte de las regiones del planeta, existe aun necesidad de un control continuo de la exposición en la población en general, así como el seguimiento de los individuos debido a los efectos potenciales sobre la salud, dado que muchos de estos compuestos pueden interferir con el sistema hormonal, incluso a bajos niveles de exposición (Arrebola et al., 2013b; Porta, 2006). Este estudio muestra los datos de exposición en una cohorte de individuos de diferentes zonas de España e identifica las posibles fuentes de exposición a COPs, lo que debería ser confirmado en futuros estudios de biomonitorización.

6.2 Exposición a pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en la población de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) (Objetivo 2).

Aunque Bolivia no es un país altamente industrializado, un inventario preliminar para el Convenio de Estocolmo estimó que existían en el país unos 17.200 litros de aceite dieléctrico potencialmente contaminados (Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004). La contaminación en Bolivia también se agrava por la falta de una gestión adecuada de los residuos y el comercio ilegal de productos químicos (UNEP, 2002). Una de las principales vías para la liberación de PCBs en el medio ambiente en Bolivia es a través de derrames de fluidos eléctricos de las industrias (Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004). En países sudamericanos, la ausencia de estudios científicos de biomonitorización regulares no permite estimar de forma adecuada la exposición humana a los PCBs y no es posible identificar las poblaciones con un riesgo particular (UNEP, 2002). En Bolivia no existen registros previos de biomonitorización de la exposición humana a COPs y se supone *a priori* que los niveles de residuos y las rutas de exposición podrían ser diferentes a los observados en otras poblaciones, debido a las particularidades en cuanto a estilos de vida, etnia, nivel sociocultural y hábitos dietéticos de la región y el país en general.

Resumen

Los bifenilos policlorados (PCBs) son COPs que se han utilizado durante décadas en varias aplicaciones industriales. Aunque la producción de los bifenilos policlorados se restringió desde la década de 1970 en la mayoría de los países, existen grandes cantidades que permanecen en equipos y edificios antiguos y que se han detectado en diversas matrices ambientales y biológicas. El principal objetivo de este estudio fue analizar los predictores de la exposición combinada a tres PCBs no similares a las dioxinas (congéneres 138, 153 y 180) en suero y tejido adiposo de una cohorte de adultos (n = 112) que viven en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) y sus ciudades / pueblos de alrededor. Un segundo objetivo fue identificar los modificadores que pueden influir en las asociaciones estadísticas encontradas, utilizando modelos crudos, ajustados parcialmente, y múltiples, de regresión lineal globales. Los principales predictores de las concentraciones séricas fueron la ocupación y el consumo de alimentos grasos, mientras que en los de las concentraciones de tejido adiposo se

incluyeron la edad, el hábito de fumar, el consumo de alimentos grasos, y la residencia. Las diferencias entre las dos matrices podrían derivar de su significado biológico, dado que las concentraciones de tejido adiposo son un indicador de la exposición crónica a los PCBs, mientras que los niveles séricos son un buen predictor de la exposición permanente y la movilización de los PCBs almacenados en los tejidos grasos. En este trabajo se evidenció que el índice de masa corporal era un modificador importante de las asociaciones encontradas.

Arrebola JP, Mutch E, Cuellar M, Quevedo M, Claire E, Mejía LM, Fernández-Rodríguez M, Freire C, Olea N, Mercado LA. Factors influencing combined exposure to three indicator polychlorinated biphenyls in an adult cohort from Bolivia. *Environ Res* 2012b; 116: 17-25.

Factor de impacto 2014: 4.373 (Primer decil)



Factors influencing combined exposure to three indicator polychlorinated biphenyls in an adult cohort from Bolivia[☆]

J.P. Arrebola^{a,*}, E. Mutch^b, M. Cuellar^c, M. Quevedo^c, E. Claire^c, L.M. Mejía^c, M. Fernández-Rodríguez^a, C. Freire^a, N. Olea^{a,d}, L.A. Mercado^c

^a Laboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital, University of Granada, 18071 Granada, Spain

^b Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom

^c Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, carreras de Bioquímica y Farmacia, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Calle México s/n. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia

^d CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2011

Received in revised form

5 April 2012

Accepted 19 April 2012

Available online 10 May 2012

Keywords:

Polychlorinated biphenyl

Serum

Adipose tissue

Exposure predictors

Multiple linear regression

ABSTRACT

Polychlorinated biphenyls are persistent organic pollutants that have been used for decades in several industrial applications. Although production of polychlorinated biphenyls was restricted from the 1970s in most countries, substantial amounts remain in old equipment and buildings and they have been detected in various environmental and biological matrices.

The main objective of this study was to analyze predictors of the combined exposure to three non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (congeners 138, 153 and 180) in serum and adipose tissue from an adult cohort ($n=112$) living in the city of Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) and surrounding towns/villages. A second aim was to identify modifiers that might influence the statistical associations found, using crude, partially-adjusted, and global multiple linear regression models.

Main predictors of serum concentrations were occupation and fatty food consumption, while those for adipose tissue concentrations included age, smoking habit, fatty food consumption, and residence. The differences between the two matrices might be derived from their biological meaning, given that adipose tissue concentrations are an indicator of chronic exposure to polychlorinated biphenyls while serum levels are a good predictor of ongoing exposure and the mobilization of polychlorinated biphenyls stored in fatty tissues. Body mass index was found to be an important modifier of these associations.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: PCBs, Polychlorinated Biphenyls; BMI, Body Mass Index

☆ Funding and Ethical Approvals: The study was partially supported by the "Impuesto Directo a Hidrocarburos" (IDH) of the Government of Bolivia, the EU Commission (CONTAMED FP7-ENV-212502), the Spanish Ministry of Health (EUS2008-03574), the Instituto de Salud Carlos III (FIS P111/0610), the Regional Government of Andalusia-Spain (grant numbers P09-CTS-5488 Project of Excellence, and SAS PI-0675-2010), and the Granada Research of Excellence Initiative on BioHealth "GREIB" from the University of Granada (CEB-005).

During the field work and chemical analyses, Dr JP Arrebola was a research fellow of the Spanish Agency for International Cooperation (Agencia Española de Cooperación Internacional) (MUTIS III-B program) and is currently under contract with the PTA-MICINN program (Spanish Ministry of Science and Innovation).

The funding agencies had no role in the analysis of data or preparing the manuscript. This research was approved by the Ethics Committee of the Human Health Sciences Faculty (Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud Humana), Universidad Autónoma Gabriel René Moreno.

* Corresponding author. Fax: +34 958 249953.

E-mail address: jparrebola@ugr.es (J.P. Arrebola).

0013-9351/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2012.04.009>

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are persistent organic pollutants that have been used since 1929 in several industrial applications, such as transformer and capacitor oils, hydraulic and heat exchange fluids, and sealants in buildings (UNEP, 2002). The chemical structure of PCBs is that of two benzene rings, while various chlorine substitutions on the molecule generate 209 congeners (Fig. 1). Due to their lipophilicity, they bioaccumulate and persist in the environment and living organisms, mainly in lipid-rich matrices. PCBs can be transported over long distances via air, water, and animals, and reach places far from the site of their first use.

Although production of PCBs has been restricted since the 1970s in most countries (La Rocca and Mantovani, 2006), substantial amounts remain in old equipment and buildings (Wingfors et al., 2006) and have been detected in various environmental matrices, including outdoor and indoor air (Jamshidi et al., 2007), drinking-water (Salinas et al., 2010), and food, especially of animal origin (Kvale et al., 2009).

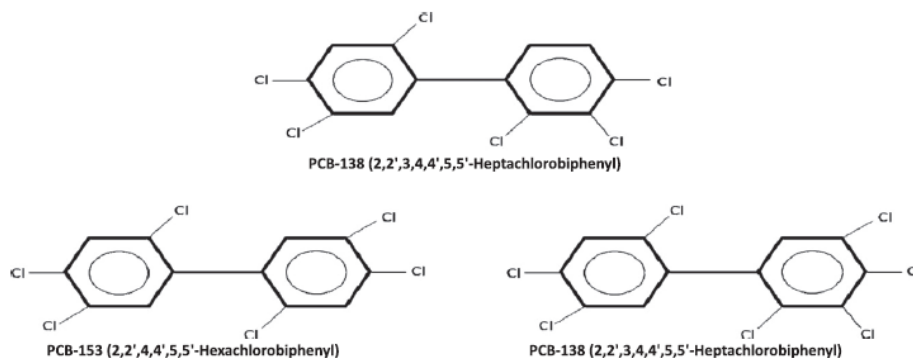


Fig. 1. Chemical structure of the three PCB congeners included in the present study.

Potential health effects derived from exposure to these persistent organic pollutants include neurological changes, endocrine disruption, and carcinogenesis (Longnecker et al., 1997). Exposure to PCBs *in utero* has been linked to impaired neurodevelopment and immune deficiency in children (Longnecker et al., 2003; Dewailly et al., 2000; Heilmann et al., 2006) and neuropsychological effects in adults (Fitzgerald et al., 2008). Additionally, some PCBs have shown estrogenic effects and are reported to be associated with thyroid dysfunction in laboratory animals (Parent et al., 2011), and they have also been linked to increased risk of non-Hodgkin's lymphoma (Engel et al., 2007).

Exposure of the general population to PCBs is largely *via* food (Kvalem et al., 2009) but also *via* inhalation, especially at locations that still use electrical equipment containing PCBs (ATSDR, 2000). Other potential sources of exposure are contact with contaminated ground water or soil (ATSDR, 2000) or materials used in construction works (Herrick et al., 2004) and waste incineration processes (Ikonomou et al., 2002), amongst others.

Detectable concentrations of PCBs in humans have been reported worldwide (Kalantzi et al., 2009; Arrebola et al., 2010; Munoz-de-Toro et al., 2006; Zuberó et al., 2009; CDC, 2009; Fernandez et al., 2008). Concentrations in human tissues are influenced by the exposure pathways and rates of bioaccumulation, metabolism, and elimination, amongst other factors (Covaci et al., 2008). Because these pathways can substantially differ among populations, it is crucial to investigate and characterize the ways in which individuals are exposed to environmental pollutants (Arrebola et al., 2012b).

Although Bolivia is not a highly industrialized country, an estimated 17,200 liters of potentially-contaminated dielectric oils were identified in a preliminary national inventory (Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004). Pollution in Bolivia is also exacerbated by the lack of adequate waste management and the illegal trading of chemicals (UNEP, 2002). Thus, it has been reported that one of the main pathways for the release of PCBs into the environment in Bolivia is through spillages of electric fluids from industries (Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004). In South American countries, the absence of regular scientific biomonitoring studies means that data on human exposure to PCBs are inadequate and fail to identify populations at particular risk (UNEP, 2002).

The use of an "indicator" PCB marker has been reported to be useful in screening programs (Birnbaum and Staskal-Wikoff, 2010). Thus, PCB congeners 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180 are usually described as indicators of human dietary exposure in non-occupationally exposed populations, due to their chemical stability. The sum of the concentrations of congeners 138, 153,

and 180 has been reported as representative of total PCBs in human tissues after multiplication by a factor related to their contribution (Jain and Wang, 2010).

The main objective of this study was to analyze predictors of the combined exposure to three non-dioxin-like PCBs (congeners 138, 153 and 180) in serum and adipose tissue from an adult cohort living in the city of Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) and surrounding towns/villages. A second aim was to identify modifiers that might influence the statistical associations found by using crude, partially-adjusted, and global multiple linear regression models.

2. Material and methods

2.1. Study subjects and sample collection

The present study forms part of a larger investigation of exposure to a group of environmental pollutants in samples from this Bolivian population, and a more extensive description of their characteristics is reported elsewhere (Arrebola et al., 2012a; Arrebola et al., 2012b).

Participants were recruited in Santa Cruz de la Sierra between January and June 2010. Santa Cruz de la Sierra has the largest population (1,500,000 inhabitants) of Bolivian cities and an economy based on hydrocarbon industry, logging, and agriculture.

Human serum and adipose tissue samples were obtained under 12 h fasting conditions from 112 individuals visiting the Hospital Japonés in Santa Cruz de la Sierra for non-cancer-related surgery (56% inguinal hernia or abdominal surgery; 20% gall bladder surgery, and 24% other surgeries). The sources of adipose tissue were the pelvic waist (56%) and front abdominal wall (44%). Inclusion criteria were age over 16 years, absence of hormone-related disease or cancer, non-receipt of hormone therapy, and residence in the study area for at least 10 years. All subjects signed an informed consent form to participate in the study, which was approved by the ethics committee of the hospital.

2.2. Independent variables

Information about possible predictors of PCB exposure was derived from an ad hoc questionnaire completed by each participant before surgery and conducted face-to-face by trained interviewers during the hospital stay. The questionnaires employed to assess dietary habits included the consumption frequency of each food item and the approximate portion size (images were shown for guidance). Based on this information, food consumption was then expressed in standard portions. Questionnaires and research procedures were standardized and validated in a pilot study with 50 subjects.

Socio-demographic characteristics included information on sex, age, body mass index (BMI), residence, occupation, diet, and smoking habit. The height and weight of participants were measured, and their BMI was calculated as weight/height squared (kg/m^2). Subjects were classified into six occupational categories following Goldthorpe's proposal (Regidor, 2001); because of sample size limitations, three grouped categories were formed: social classes I+II+III (non-manual workers), IV+V (manual workers), and homemakers. Homemakers were

considered to be a separate group because previous studies highlighted a different risk of injuries and exposure to chemicals (Yudelman, 1994; McCoy et al., 2002). "Industrial workers" were defined according to the Official Occupational Classification of Bolivia (INE, 2009) as those who worked in the construction or manufacturing industries or were employed as machinists or assembly workers. This was treated as a dichotomous variable in the model (yes/no).

Cigarette smoking and alcohol consumption (beer, wine, spirits) were measured as n° cigs/week and n° bottles/week, respectively. Food consumption was recorded as n° portions of food item consumed per month. In addition, the types of meat (beef, pork, chicken, and/or lamb) mainly consumed by each subject were recorded as dichotomous variables (yes/no). "Cured meat" referred to cured products of any type of meat that do not require cooking for their consumption.

Residence of participants was classified according to the criterion of the Bolivian Institute of Statistics, which considers populations in towns with more than 2000 inhabitants to be urban and those in centers with less than 2000 inhabitants to be rural (INE, 2012). Hence, residents of the city of Santa Cruz de la Sierra (1,500,000 inhabitants) were considered as "urban" and all other subjects, who lived in villages with less than 2000 inhabitants, were considered "rural". We also tested the dichotomous variable "Residence closer than 2 km from industrial activity" (yes/no) in the models.

In the women, oral contraceptive consumption was gathered as total accumulated months of oral contraceptive consumption and also re-coded as a dichotomous variable (yes/no), considering "yes" as any level of consumption. Accumulated breastfeeding time was calculated in months, assigning 0 to women who had never breastfed their children. The number of pregnancies was recorded for the women and "gravidity" was considered as both a continuous and a dichotomous variable (yes/ ≥ 1 pregnancy/no).

The chewing of coca leaf is a popular habit in Bolivia, especially among manual workers, because it alleviates hunger, cold, and fatigue. This habit was tested in the models as n° coca leaves consumed per month and also as dichotomous variable (consumer/non-consumer), considering any level of coca leaf use to define a consumer.

2.3. Extraction and chemical analysis

Adipose tissue samples of 5–10 g and 10 mL of blood were collected from each patient during surgery under fasting conditions. Blood samples were then centrifuged for 5 min at 2500 rpm to separate the serum. Both serum and adipose tissue samples were immediately coded and stored at -80°C until chemical analysis. An adipose tissue sample was available from all 112 patients and a blood sample from 62 of them.

Chemical extraction was performed as described elsewhere (Moreno-Frias et al., 2004; Martínez Vidal et al., 2002). Briefly, 200 mg of adipose tissue was extracted using *n*-hexane, and the solution was then purified through alumina in a glass column and kept in test tubes at -80°C . From each serum sample, 4 mL was extracted with acidified diethyl ether and *n*-hexane, and the cleaned-up extract was eluted through a solid phase silica extraction column (Sep Pack, Waters).

PCB congeners 138, 153, and 180 were quantified by high-resolution gas chromatography with micro-electron capture detection, using an Agilent GC7890A system and 30 m \times 0.32 \times 0.25 mm silica capillary column (J&W Scientific, HP-5). For each chemical, the limit of detection was determined as the smallest amount of analyte that gave a signal-to-noise ratio of ≥ 3 and was set at 1 ppb and calculated on a lipid basis. Non-detected chromatographic concentrations were assigned a random value between zero and the limit of detection, as recommended by Antweiler and Taylor (2008), who reported this substitution to be appropriate in data sets with less than 70% censored data; *p,p'*-dichlorobenzophenone was used as internal standard.

PCB concentrations were confirmed in 1 out of every 10 analyzed samples by gas chromatography coupled with mass spectrometry, using a 6890 Agilent gas chromatograph (Agilent Technologies, Wilmington, USA) with 7683 series injector and a quadruple mass filter 5976 network mass selective detector.

Total lipid content was quantified gravimetrically in adipose tissue using a previously reported method (Rivas et al., 2001). For serum samples, lipid content was calculated as described by Phillips et al. (1989). Concentrations of PCBs were expressed in both wet basis (nanograms per gram of adipose tissue or nanograms per mL) and lipid basis (nanograms per gram of lipid).

A double-blinded procedure was followed so that neither the chemical analysts nor statistical staff knew the identity or characteristics of any study subject. The reproducibility and extraction efficacy of the method were established by running 10 adipose tissue and serum samples spiked with PCBs at an intermediate point on the calibration curve. Samples were processed as described above. Recoveries ranged from 70% to 98%.

2.4. Statistical analysis

In the descriptive analysis, PCB concentrations were expressed as geometric means and 25th and 75th percentiles and independent variables as median, minimum, and maximum values. Σ PCBs was computed as the sum of the individual concentrations of the three congeners.

Analyses of the predictors of accumulated PCB exposure were performed using linear regression, with log-transformed Σ PCBs as the dependent variable. First,

selected independent variables were individually tested in crude models, and the variables sex, age, and/or BMI were then introduced to create partially-adjusted models.

Finally, backward stepwise multiple linear regression global models for wet- and lipid-basis serum and adipose tissue concentrations were performed, based on *p*-values and change in R^2 . Interaction terms were tested after eliminating all variables with non-significant associations. Diagnosis of the model was performed in order to ensure the goodness of fit and the fulfillment of implementation conditions. Generalized standard-error inflation factors were used to verify absence of collinearity between independent variables, while homoscedasticity was assured by using residuals versus fitted plot. The linearity of the quantitative independent variables was checked through partial regression plots, and the normality of errors was verified by normal QQ plot with 95% confidence bands (Fox, 2008).

Because the dependent variables were log-transformed, beta coefficients in the global models are also shown as $\exp(\beta)$, i.e., the quotient between the value of the dependent variable for a subject with independent variable *x* and the value of the dependent variable for another subject with independent variable *x*-1, keeping the remaining independent variables constant. R^2 was computed as the percentage of the variability in concentrations explained by the statistical model. Age and BMI were centered by their median values to assist interpretation of their contribution to the models.

The significance level was set at $p \leq 0.05$; however, we considered $p \leq 0.10$ as borderline statistically significant, following the recommendations of Greenland (1989) and Mickey and Greenland (1989), who suggested that increasing the traditional level of significance of 0.05 would help to detect true predictors.

Data were stored and processed using SPSS v18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), and multivariate analyses were carried out using the R statistical computing environment v2.12.1 (<http://www.r-project.org/>).

3. Results

3.1. Characteristics of the study population and concentrations of PCB congeners

Table 1 summarizes the main characteristics of the study subjects and the PCB concentrations in serum and adipose tissue. There was a higher proportion of women ($n=90$, 80.4%) than men ($n=22$, 19.6%). A total of 80 subjects (71%) resided in an urban area (i.e., within the city of Santa Cruz de la Sierra) and 12 resided closer than 2 km to an industrial activity. Reported industrial activities were food processing plants (45%) and an industrial park (55%) of hydrocarbon and wood companies, among others. Out of the 112 study subjects, 27 (24%) were classified as non-manual workers, 23 (21%) as manual workers, and 61 (55%) as homemakers. In addition, 13 subjects (12%) worked in industrial activities, including construction/metallurgy (47%), transport (20%), food manufacture (20%), and others (13%). A smoking habit was reported by 11 participants (10%), and alcohol was consumed weekly by 32 (29%). A total of 8 subjects (7.2%) declared being habitual consumers of lamb.

PCB congeners 138, 153, and 180 were detected in 56%, 80%, and 38% of serum samples, respectively, and in 87%, 81%, and 40% of adipose tissue samples, respectively.

3.2. Multivariate analyses of PCB exposure predictors

Partially-adjusted linear regression analyses for socio-demographic/lifestyle and dietary predictors of Σ PCBs are displayed in Tables 2 and 3, respectively. The models are shown for lipid-basis serum and adipose tissue concentrations, sequentially adjusted for selected covariates. Because we observed very similar results between wet- and lipid-basis analyses, results are only shown for lipid-basis concentrations.

Global stepwise multiple linear regression models for the predictors of serum and adipose tissue Σ PCBs are shown in Tables 4 and 5, respectively.

3.2.1. Socio-demographic and lifestyle predictors

No association with subjects' residence was found in the crude or partially-adjusted models; however, in the global multivariate model, higher Σ PCB levels were found in adipose tissue of

Table 1
Characteristics of the study population and concentrations of PCBs.

	Adipose tissue (n=112)			Serum (n=62)		
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum
Age (years)	28.0	18.0	70.0	28.5	18.0	70.0
Body mass index (kg/m ²)	26.4	17.8	35.4	26.7	17.8	35.0
Gravidity*	3.0	0.0	9.0	3.0	0.0	9.0
Breastfeeding time (months)*	7.0	0.0	24.0	8.0	0.0	24.0
Smoking habit (n° cigs/week)	0.0	0.0	35.0	0.0	0.0	14.0
Beer consumption (bottles/week)	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	20.0
Wine consumption (bottles/week)	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	8.0
Liquor consumption (bottles/week)	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	4.0
Water consumption (glasses/week)	7.5	2.0	20.0	7.0	2.0	16.0
Fish consumption (portions/month)	1.0	0.0	32.0	2.0	0.0	32.0
Milk consumption (glasses/week)	7.0	0.0	56.0	7.0	0.0	56.0
Butter consumption (portions/month)	4.0	0.0	31.0	4.0	0.0	31.0
Cheese consumption (portions/month)	4.0	0.0	80.0	4.0	0.0	80.0
Cured meat consumption (portions/month)	1.0	0.0	31.0	0.0	0.0	31.0
Meat consumption (portions/month)	31.0	8.0	64.0	31.0	12.0	64.0
Egg consumption (eggs/month)	8.0	0.0	34.0	8.0	0.0	31.0
Legume consumption (portions/month)	12.0	0.0	31.0	12.0	0.0	31.0
Vegetable consumption (portions/month)	31.0	1.0	61.0	31.0	1.0	61.0
Fruit consumption (portions/month)	12.0	0.0	112.0	12.0	1.0	112.0
Bread consumption (portions/month)	31.0	8.0	252.0	31.0	8.0	252.0
Pasta consumption (portions/month)	4.0	0.0	31.0	4.0	0.0	31.0
Coca leaf consumption (portions/month)	0.0	0.0	62.0	0.0	0.0	12.0
Cholesterol (mg/dL)	-	-	-	148.0	44.0	293.0
Triglycerides (mg/dL)	-	-	-	94.5	50.0	351.0
% of lipids	81.3%	-	-	-	-	-
	Geometric Mean	Percentiles		Geometric Mean	Percentiles	
		25th	75th		25th	75th
PCB 138						
ng/mL	84.0	61.6	178.7	0.2	0.0	1.0
ng/g lipid	105.0	77.0	223.4	33.7	3.8	214.5
PCB 153						
ng/mL	52.7	2.7	22.8	0.3	0.4	2.9
ng/g lipid	65.8	33.5	284.8	59.0	61.8	517.2
PCB 180						
ng/mL	32.8	6.8	242.0	0.1	0.0	0.6
ng/g lipid	41.0	8.5	302.5	26.7	3.0	123.6

* Only women.

subjects living in urban versus rural areas ($p=0.088$). Industrial workers showed higher serum levels of Σ PCBs in the partially-adjusted ($p=0.11-0.088$) and global models ($p=0.050$). In the global models, serum Σ PCB concentrations were lower in manual versus non-manual workers ($p=0.089$).

Gravidity was inversely associated with adipose tissue Σ PCBs in both crude and sex- and age-adjusted models ($p=0.004$ and $p=0.020$, respectively), but not when BMI was also introduced as a covariate in the global model.

Smoking habit was related to lower adipose tissue levels of Σ PCBs in the crude and age-sex adjusted models ($p=0.013-0.071$). This negative association remained significant in the global model ($p=0.002$). Age was also negatively related to adipose tissue Σ PCB concentrations in the global model ($p=0.060$).

3.2.2. Dietary predictors

No association was found between Σ PCB values and alcohol consumption, expressed as individual consumption of beer, wine, or liquor (data not shown in tables) or as a dichotomized variable (alcohol consumer/non-consumer; Table 3).

Consumption of butter ($p=0.034-0.040$) and milk ($p=0.080-0.090$) were positively associated with serum Σ PCBs in the partially-adjusted models, but only butter consumption remained in the global model ($p=0.029$) (Table 4). Meat consumption was positively correlated with serum Σ PCBs in the crude model ($p=0.095$) but not in the partially-adjusted or global models

(Tables 3 and 4). No statistically significant correlation was found for the consumption of different types of meats in any model, except for an association between lamb consumption and higher adipose tissue concentrations of Σ PCBs in the global model (each extra portion was associated with 6.8-fold higher Σ PCBs, $p=0.003$) and between cured meat consumption and adipose tissue Σ PCBs in the model adjusted for age, sex, and BMI ($p=0.080$).

Egg consumption was positively associated with Σ PCBs in the crude and partially-adjusted serum models ($p=0.02$) but not in the global model.

Legume and vegetable consumption was negatively associated with Σ PCBs in adipose tissue samples only when the model was adjusted for sex, age, and BMI ($p=0.035$ and 0.055 , respectively).

In the global model for adipose tissue Σ PCBs, a statistically significant interaction ($p=0.003$) was found between BMI and lamb consumption. In addition, an interaction was found between residence closer than 2 km to industrial activity and urban residence ($p=0.066$).

4. Discussion

This study is part of a larger project that aims to characterize exposure to environmental chemicals in a population living in Santa Cruz de la Sierra and surrounding towns and villages. Levels of POPs in this population were described in a previous

Table 2. Sociodemographic and lifestyle predictors of serum and adipose tissue Σ PCBs. Crude and partially-adjusted linear regression analyses.

	Ln Σ PCBs (ng/g lipid serum)										Ln Σ PCBs (ng/g lipid adipose tissue)																													
	Crude ¹					Adjusted ²					Adjusted ³					Crude ⁴					Adjusted ⁵					Adjusted ⁶														
	β	exp(β)	Standard error	P-value	β	exp(β)	Standard error	P-value	β	exp(β)	Standard error	P-value	β	exp(β)	Standard error	P-value	β	exp(β)	Standard error	P-value	β	exp(β)	Standard error	P-value	β	exp(β)	Standard error	P-value												
Residence – Urban ⁴	0.11	1.11	0.17	0.535	-0.12	0.89	0.18	0.506	0.12	1.13	0.18	0.509	-0.21	0.81	0.19	0.272	-0.27	0.77	0.20	0.178	0.10	1.10	0.10	0.337	0.09	1.10	0.21	0.685	0.09	1.09	0.22	0.697	0.02	1.02	0.29	0.951	-1.29	0.27	1.81	0.943
Residence closer than 2 km from industrial activity																																								
Occupational status ⁸																																								
Occupation – Industrial worker ⁷	-0.18	0.83	0.25	0.465	-0.18	0.84	0.27	0.512	-0.17	0.85	0.27	0.536	0.29	1.33	0.27	0.282	0.47	1.60	0.29	0.104	0.37	1.45	0.26	0.157																
Occupation – Industrial worker ⁷	0.37	1.45	0.23	0.109	0.49	1.63	0.28	0.085	0.49	1.63	0.28	0.088	0.12	1.13	0.26	0.630	0.01	1.01	0.31	0.987	-2.30	0.10	1.94	0.906																
Oral contraceptive consumer ⁹	0.11	1.12	0.18	0.542	0.12	1.12	0.18	0.522	0.11	1.11	0.18	0.565	0.37	1.44	0.24	0.139	0.42	1.53	0.24	0.182	2.37	10.66	1.54	0.128																
Postmenopausal status ⁹	-0.10	0.90	0.22	0.633	-0.16	0.85	0.23	0.487	-0.21	0.81	0.24	0.388	0.16	1.17	0.27	0.556	0.02	1.02	0.28	0.943	1.93	6.86	1.75	0.274																
Gravidity ⁹	0.11	1.12	0.18	0.542	-0.01	0.99	0.05	0.847	0.11	1.11	0.18	0.565	-0.16	0.85	0.05	0.004	-0.15	0.86	0.06	0.020	-0.36	0.69	0.41	0.122																
Accumulated breastfeeding time (months) ¹⁰	-0.01	0.99	0.01	0.304	-0.02	0.98	0.02	0.272	-0.02	0.98	0.02	0.219	-0.01	0.99	0.02	0.518	0.00	1.00	0.02	0.594	-0.15	0.86	1.03	0.882																
Current smoker ¹⁰	0.19	1.20	0.34	0.589	0.27	1.31	0.44	0.534	0.28	1.32	0.45	0.538	-0.71	0.49	0.31	0.025	-0.81	0.44	0.32	0.013	-3.56	0.03	1.95	0.071																

1 non-adjusted models; 2 adjusted for sex, age; 3 adjusted for sex, age, BMI; 4 Reference category: manual; 5 Reference category: manual; 6 Reference category: Manual; 7 Reference category: Industrial worker; 8 Reference category: non-consumer; 9 Reference category: Premenopausal status; 10 Reference category: Industrial worker.

* Women only, therefore sex was not included as a covariate in the models.

publication (Arrebola et al., 2012a), finding that they were moderate and not very different from those reported for populations living in more industrialized countries (Kang et al., 2008; CDC, 2009; Arrebola et al., 2010; Ibarluzea et al., 2011; Kalantzi et al., 2011). The present study takes this research a step forward with characterization of the potential POP exposure routes for these individuals. The study of PCB exposure predictors is of special interest in Santa Cruz de la Sierra due to the recent growth of the city and the particular characteristics of the population, whose diet and lifestyle patterns differ from those of most European or North American populations studied in this context to date, as reported elsewhere (Arrebola et al., 2012b).

In the partially-adjusted models (Tables 2 and 3), covariates were introduced step-by-step in order to assess their potential influence on the associations with the predictors. Due to their lipophilicity, PCBs tend to bio-accumulate in the lipid fraction of tissues. It is well known that serum concentrations of PCBs are related to serum lipid levels (Guo et al., 1987; Goncharov et al., 2008) and, under conditions of equilibrium between serum and adipose tissue PCB concentrations, lipid-standardized concentrations might predict the PCB body burden (Brown and Lawton, 1984). Lipid-standardization has also been especially recommended when studying non-fasting populations and for comparisons of POP concentrations across tissue specimens or across study populations (Bergonzi et al., 2009). Caution should be taken in modeling PCB concentrations, because the model selection might be influenced by factors such as the tissue investigated, individual metabolic capacity, laboratory methodology, and the percentage of samples below the limit of detection (Schisterman et al., 2005; Jain and Wang, 2010).

Although Σ PCBs was not associated with residence using the crude and adjusted models, the global models showed higher adipose tissue levels of Σ PCBs for urban residents ($p=0.098$), which may be related to exposure to industrial activities and contaminated buildings, as previously reported (Henriquez-Hernandez et al., 2011). Despite current restrictions on the use of PCBs, they remain in old equipment and buildings; therefore, construction workers engaging in their removal or demolition might be at considerable risk of exposure (Wingfors et al., 2006). In fact, higher serum concentrations were detected in industrial workers than in the rest of our study population ($p=0.050$).

In the global models, age was negatively associated with Σ PCBs in adipose tissue ($p=0.062$). Numerous studies have reported a positive association between PCB body burden and age (Kiviranta et al., 2005; Nichols et al., 2007; Arrebola et al., 2010), which is usually explained by bioaccumulation or the so-called cohort effect (Ahlborg et al., 1995). However, most of these investigations were performed in more industrialized countries, where use of PCBs started earlier than in the area around Santa Cruz de la Sierra. The city grew very recently from 325,000 inhabitants in 1976 to 1,616,063 in 2009 (INE, 2012), which may explain why PCB levels in this population are not positively correlated with age. In fact, exposure to DDT, a chemical that was introduced years before PCBs, was positively associated with age in the same population (Arrebola et al., 2012b). In addition, although only individuals who had lived for at least 10 years in the area were considered in the study, Santa Cruz de la Sierra has received a large number of immigrants from other regions of the country, and we cannot rule out that they might have different cumulated exposures despite meeting this residence criterion.

Gravidity also showed a negative association with adipose tissue Σ PCBs, usually attributed to the placental transfer of PCBs from mother to fetus (Llop et al., 2010), although this association lost significance after adjustment for the BMI and should therefore be interpreted with care.

Cigarette smoking was inversely correlated with Σ PCBs in adipose tissue, and this association was consistent throughout

Table 3
Dietary predictors of serum and adipose tissue Σ PCBs. Crude and partially adjusted linear regression analyses.

	Ln Σ PCBs (ng/g lipid serum)												Ln Σ PCBs (ng/g lipid adipose tissue)												
	Crude ¹			Adjusted ²			Adjusted ³			Crude ¹			Adjusted ²			Adjusted ³									
	β	exp(β)	Standard error	p-value	β	exp(β)	Standard error	p-value	β	exp(β)	Standard error	p-value	β	exp(β)	Standard error	p-value	β	exp(β)	Standard error	p-value					
Beer consumption (botles/week)	0.04	1.04	0.02		0.144	0.04	1.04	0.03	0.141	0.04	1.04	0.03	0.138	0.02	1.02	0.03	0.416	0.03	1.03	0.03	0.405	2.47	11.82	1.96	0.212
Alcohol consumer ⁴	0.17	1.18	0.18		0.351	0.16	1.18	0.18	0.381	0.16	1.18	0.19	0.385	-0.13	0.88	0.20	0.524	-0.12	0.89	0.20	0.556	-0.06	0.94	-0.60	0.553
Water consumption (glasses/week)	-0.01	0.99	0.02		0.529	-0.02	0.98	0.03	0.523	-0.02	0.98	0.03	0.523	-0.01	0.99	0.02	0.957	-0.01	0.99	0.02	0.629	-1.40	0.25	1.36	0.307
Fish consumption (portions/month)	0.00	1.00	0.02		0.861	0.00	1.00	0.02	0.817	0.00	1.00	0.02	0.818	0.02	1.02	0.02	0.421	0.02	1.02	0.02	0.511	1.17	3.22	1.50	0.438
Milk consumption (glasses/week)	0.02	1.02	0.01		0.080	0.02	1.02	0.01	0.087	0.02	1.02	0.01	0.090	-0.01	0.99	0.01	0.338	-0.01	0.99	0.01	0.434	0.23	1.26	0.73	0.749
Butter consumption (portions/month)	0.02	1.02	0.01		0.034	0.02	1.02	0.01	0.038	0.02	1.02	0.01	0.040	-0.01	0.99	0.01	0.601	0.00	1.00	0.01	0.703	-0.19	0.83	0.74	0.800
Cheese consumption (portions/month)	-0.01	0.99	0.20		0.952	-0.03	0.97	0.22	0.890	-0.03	0.97	0.22	0.888	-0.41	0.66	0.26	0.114	-0.34	0.71	0.26	0.197	-2.13	0.12	2.02	0.293
Cured meat consumption (portions/month)	-0.01	0.99	0.02		0.653	-0.01	0.99	0.02	0.693	-0.01	0.99	0.02	0.693	0.03	1.03	0.02	0.215	0.02	1.02	0.02	0.281	2.28	9.82	1.29	0.080
Meat consumption (portions/month)	0.02	1.02	0.01		0.095	0.02	1.02	0.01	0.102	0.02	1.02	0.01	0.197	0.00	1.00	0.01	0.726	0.00	1.00	0.01	0.674	0.41	1.50	0.61	0.502
Chicken consumer ⁴	0.10	1.11	0.18		0.586	0.12	1.12	0.19	0.545	0.12	1.13	0.19	0.550	-0.19	0.83	0.22	0.382	-0.25	0.78	0.22	0.264	1.20	3.32	13.89	0.832
Beef consumption (portions/month)	0.12	1.13	0.16		0.457	0.12	1.13	0.17	0.479	0.12	1.13	0.17	0.482	0.27	1.31	0.20	0.176	0.24	1.27	0.20	0.229	0.95	2.59	12.48	0.431
Lamb consumer ⁴	-0.09	0.91	0.42		0.432	-0.09	0.92	0.43	0.437	-0.09	0.91	0.44	0.429	-0.01	0.99	0.47	0.976	-0.03	0.97	0.46	0.949	-1.79	0.17	2.00	0.375
Pork consumer ⁴	0.16	1.17	0.25		0.513	0.17	1.19	0.26	0.507	0.17	1.19	0.26	0.512	-0.07	0.93	0.28	0.815	-0.10	0.90	0.28	0.722	-2.43	0.09	12.11	0.841
Egg consumption (eggs/month)	0.03	1.03	0.01		0.020	0.03	1.03	0.01	0.021	0.03	1.03	0.01	0.022	-0.01	0.99	0.01	0.346	-0.01	0.99	0.01	0.287	-0.01	0.99	0.80	0.987
Legume consumption (portions/month)	-0.01	0.99	0.01		0.261	-0.01	0.99	0.01	0.277	-0.01	0.99	0.01	0.282	-0.01	0.99	0.01	0.300	-0.01	0.99	0.01	0.171	-0.99	0.37	0.46	0.035
Vegetable consumption (portions/month)	0.00	1.00	0.01		0.962	0.00	1.00	0.01	0.957	0.00	1.00	0.01	0.958	-0.01	0.99	0.01	0.096	-0.01	0.99	0.01	0.120	-1.01	0.37	0.52	0.055
Fruit consumption (portions/month)	0.00	1.00	0.00		0.475	0.00	1.00	0.00	0.469	0.00	1.00	0.00	0.461	0.00	1.00	0.01	0.487	0.00	1.00	0.01	0.414	0.30	1.35	0.35	0.393
Bread consumption (portions/month)	0.00	1.00	0.00		0.538	0.00	1.00	0.00	0.554	0.00	1.00	0.00	0.553	0.00	1.00	0.00	0.552	0.00	1.00	0.00	0.396	0.16	1.18	0.22	0.460
Pasta consumption (portions/month)	0.01	1.01	0.01		0.536	0.01	1.01	0.01	0.519	0.01	1.01	0.01	0.519	-0.01	0.99	0.02	0.679	-0.01	0.99	0.02	0.562	-0.84	0.43	1.00	0.404
Cocoa leaf consumption (portions/month)	-0.02	0.98	0.04		0.684	-0.02	0.98	0.04	0.611	-0.03	0.97	0.05	0.564	0.00	1.00	0.01	0.764	0.00	1.00	0.01	0.928	-0.46	0.63	0.75	0.546

1 no n-adjusted models; 2; adjusted for sex, age; 3 adjusted for sex, age, BMI; 4: Reference category: non-consumers.

* Women only, therefore sex was not included as a covariate in the models.

the partially-adjusted models ($p=0.025-0.075$) and global model ($p=0.002$). This finding may relate to a higher capacity to metabolize PCBs that might be caused by induction of cytochrome P450 (CYP) isoforms 1A1 and 1A2 by the polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke, as reported by Kroon (2007) and Knutsen et al. (2011).

We observed positive associations between Σ PCBs and fatty food consumption, e.g., milk, butter, cured meat, lamb, and eggs. It has been reported that meat, fish, dairy products, and fats usually contribute around 80–90% of the PCB body burden (Domingo and Bocio, 2007; Llobet et al., 2003; Laden et al., 1999; Baars et al., 2004), although Santa Cruz de la Sierra is far from the sea and fish consumption is relatively low. Consumption of the other food groups would likely make a greater dietary contribution to PCB intake, as evidenced in this study.

In the present study, intakes of vegetables and legumes were negatively associated with Σ PCBs only in the partially-adjusted models. Given that these pollutants are lipophilic and not used for agricultural purposes, these matrices are not expected to be sources of dietary exposure to PCBs. Similar results were reported for vegetable consumption by Brauner et al. (2011).

The finding of an interaction between BMI and lamb consumption indicates that the influence of lamb consumption (and probably of other food items) may vary according to the BMI of subjects. This deserves further research, because PCBs have been described as potential obesogens (Valvi et al. 2012). In fact, adjustment for BMI had little effect on our crude and partially-adjusted serum models but was an important modifier of some of the predictors of adipose tissue concentrations. The relationship between BMI and PCB body burden remains unclear, with many studies reporting positive or negative correlations and others finding no association between them (Gallo et al. 2011; Glynn et al. 2007; Fernandez et al. 2008; Brauner et al. 2011; Henriquez-Hernandez et al. 2011). It has been reported that the BMI might

be an indirect surrogate for the exposure to POPs via food (Arrebola et al., 2010,2009) and that a high BMI might exert a dilution effect on stored POPs (Glynn et al. 2007).

We found a higher number of predictors in adipose tissue models than in serum. Despite differences in sample sizes, serum lipid-basis concentrations of POPs usually show higher variability than those in adipose tissue due to the fluctuations in serum lipids in certain physiological conditions (e.g., postprandial) (Waliszewski et al., 2004; Schisterman et al., 2005). This makes serum concentrations a good predictor of point exposure to POPs (including the mobilization from those stored in fatty tissues) but not always of chronic exposure (Archibeque-Engle et al., 1997; Waliszewski et al., 2004). The questionnaire used in the present study was designed to primarily assess usual sociodemographic, lifestyle and dietary patterns and is therefore more appropriate for assessing long-time exposure.

Fatty food consumption appeared to have a positive effect on both serum and adipose tissue while, interestingly, urban residence was only associated with adipose tissue concentrations. We previously reported that residence close to agricultural sites exerted an important influence on long-time exposure to the organochlorine pesticide DDT and its metabolite p,p'-DDE in the same population (Arrebola et al., 2012b). Given that the median time in the current residence was 12 years in our study subjects, it is likely that the local environment made a major contribution to the accumulated exposure (i.e., adipose tissue concentrations).

Global multivariate models can provide an overall view of the exposure scenario, avoiding many confounding effects. However, the effect of some predictors (e.g., certain fatty foods) that are individually a source of PCB exposure but are significantly inter-related might be suppressed when all of them are included together in the model. Crude and partially-adjusted models, as constructed in the present study, can help to identify these predictors. Close comparison of the models is required to rule out the possibility that the suppression is due to a true confounding effect. With the purpose of excluding potential confounders, only statistically significant results from the most adjusted models and the global models were interpreted as potential predictors of PCBs in our population. Additional associations observed with p -values between 0.5 and 0.1 should be interpreted with care and deserve further research.

Although our study sample cannot be considered fully representative of the Bolivian population, these results shed light on the pattern of human exposure to PCBs in Bolivia and complement previous findings on pollution by persistent organic pollutants in this study area. Greater in-depth investigation on human exposure to environmental pollutants is necessary in developing countries.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Table 4
Global multiple linear regression model for Σ PCBs in serum (ng/g serum) ($r^2=0.35$)*.

	β	exp(β)	Standard error	p-value
(Intercept)	3.87	47.94	0.78	< 0.001
Age (years)	-0.02	0.98	0.12	0.789
Occupation—Industrial worker ^a	0.85	2.35	0.43	0.050
Butter consumption (portions/month)	0.02	1.02	0.01	0.029
Manual worker ^b	-0.74	0.48	0.54	0.089

^a Reference category: non-industrial workers.

^b Reference category: non-manual workers.

* Adjusted for sex, BMI.

Table 5
Global multiple linear regression model for Σ PCBs in adipose tissue (ng/g lipid adipose tissue) ($r^2=0.25$)*.

	β	exp(β)	Standard error	p-value
(Intercept)	4.72	112.17	0.69	< 0.001
Age (years)	-0.03	0.97	0.02	0.060
Current smoker ^a	-0.07	0.93	0.02	0.002
Cured meat consumption	0.03	1.04	0.02	0.098
Residence=urban ^b	0.34	1.41	0.21	0.088
Residence closer than 2 km from industrial activity	-0.15	0.86	0.35	0.666
Lamb consumption	1.91	6.77	0.64	0.003
Residence closer than 2 km from industrial activity x Residence=urban	1.19	3.29	0.64	0.066
BMI x lamb consumption	-0.69	0.50	0.22	0.003

^a Reference category: non-smokers.

^b Reference category: rural.

* Adjusted for sex and BMI.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Centro de Investigación y Desarrollo de Tecnología de Alimentos UAGRM (CIDTA-UAGRM), which provided the analytical equipment, and thank the staff from Hospital Japonés in Santa Cruz de la Sierra and Dr María Elena Rocha Romero, Richard Davies, and Dr Ricardo Ocaña Riola for their assistance. The authors are indebted to all of the patients who took part in the study.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.envres.2012.04.009.

References

- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., et al., 1995. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 463–531.
- Antweiler, R.C., Taylor, H.E., 2008. Evaluation of statistical treatments of left-censored environmental data using coincident uncensored data sets: I. Summary statistics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3732–3738.
- Archibeque-Engle, S.L., Tessari, J.D., Winn, D.T., Keefe, T.J., Nett, T.M., Zheng, T., 1997. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J. Toxicol. Environ. Health* 52, 285–293.
- Arrebola, J.P., Martín-Olmedo, P., Fernández, M.F., Sánchez-Cantalejo, E., Jimenez-Rios, J.A., Torne, P., Porta, M., Olea, N., 2009. Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: A multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ. Int.* 35, 27–32.
- Arrebola, J.P., Fernández, M.F., Porta, M., Rosell, J., de la Ossa, R.M., Olea, N., et al., 2010. Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ. Int.* 36, 705–713.
- Arrebola, J.P., Cuellar, M., Claire, E., Quevedo, M., Antelo, S.R., Mutch, E., et al., 2012a. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. *Environ. Res.* 112, 40–47.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Rivero, M., Choque, A., Silvestre, S., Olea, N., et al., 2012b. Contribution of sociodemographic characteristics, occupation, diet and lifestyle to DDT and DDE concentrations in serum and adipose tissue from a Bolivian cohort. *Environ. Int.* 38, 54–61.
- ATSDR, 2000. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
- Baars, A.J., Bakker, M.J., Baumann, R.A., Boon, P.E., Freijer, J.J., Hoogenboom, L.A., et al., 2004. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol. Lett.* 151, 51–61.
- Bergonzi, R., de Palma, G., Tomasi, C., Ricossa, M.C., Apostoli, P., 2009. Evaluation of different methods to determine diet serum lipids for normalization of circulating organochlorine compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 1241–1247.
- Birnbaum, L.S., Staskal-Wikoff, D.S., 2010. 5th international PCB workshop—summary and implications. *Environ. Int.* 36, 814–818.
- Brauner, E.V., Raaschou-Nielsen, O., Gaudreau, E., Leblanc, A., Tjønneland, A., Overvad, K., et al., 2011. Predictors of polychlorinated biphenyl concentrations in adipose tissue in a general Danish population. *Environ. Sci. Technol.* 45, 679–685.
- Brown Jr., J.F., Lawton, R.W., 1984. Polychlorinated biphenyl (PCB) partitioning between adipose tissue and serum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 33, 277–280.
- CDC, 2009. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
- Covaci, A., Voorspoels, S., Rosens, L., Jacobs, W., Blust, R., Neels, H., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. *Chemosphere* 73, 170–175.
- Dewailly, E., Aytotte, P., Bruneau, S., Gingras, S., Belles-Isles, M., Roy, R., 2000. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 108, 205–211.
- Domingo, J.L., Bocio, A., 2007. Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: A literature review. *Environ. Int.* 33, 397–405.
- Engel, L.S., Lan, Q., Rothman, N., 2007. Polychlorinated biphenyls and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 373–376.
- Fernandez, M.F., Kiviranta, H., Molina-Molina, J.M., Laine, O., Lopez-Espinosa, M.J., Vartiainen, T., et al., 2008. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere* 71, 1196–1205.
- Fitzgerald, E.F., Belanger, E.E., Gomez, M.J., Cayo, M., McCaffrey, R.J., Seegal, R.F., et al., 2008. Polychlorinated biphenyl exposure and neuropsychological status among older residents of upper Hudson River communities. *Environ. Health Perspect.* 116, 209–215.
- Fox, J., 2008. *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*. Sage Publications, California.
- Gallo, M.V., Schell, L.M., DeCaprio, A.P., Jacobs, A., 2011. Levels of persistent organic pollutant and their predictors among young adults. *Chemosphere* 83, 1374–1382.
- Glynn, A., Aune, M., Darnerud, P.O., Cnattingius, S., Bjerselius, R., Becker, W., et al., 2007. Determinants of serum concentrations of organochlorine compounds in Swedish pregnant women: A cross-sectional study. *Environ. Health* 6, 2.
- Goncharov, A., Haase, R.F., Santiago-Rivera, A., Morse, C., McCaffrey, R.J., Rej, R., et al., 2008. High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a native American population. *Environ. Res.* 106, 226–239.
- Greenland, S., 1989. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am. J. Public Health* 79, 340–349.
- Guo, Y.L., Emmett, E.A., Pellizzari, E.D., Rohde, C.A., 1987. Influence of serum cholesterol and albumin on partitioning of PCB congeners between human serum and adipose tissue. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87, 48–56.
- Heilmann, C., Grandjean, P., Weihe, P., Nielsen, F., Budtz-Jorgensen, E., 2006. Reduced antibody responses to vaccinations in children exposed to polychlorinated biphenyls. *PLoS Med.* 3, e311.
- Henriquez-Hernandez, L.A., Luzardo, O.P., Almeida-Gonzalez, M., Alvarez-Leon, E.E., Serra-Majem, L., Zumbado, M., et al., 2011. Background levels of polychlorinated biphenyls in the population of the Canary Islands (Spain). *Environ. Res.* 111, 10–16.
- Herrick, R.F., McClean, M.D., Meeker, J.D., Baxter, L.K., Weymouth, G.A., 2004. An unrecognized source of PCB contamination in schools and other buildings. *Environ. Health Perspect.* 112, 1051–1053.
- Ibarluzea, J., Alvarez-Pedrerol, M., Guzmán, M., Marina, L.S., Basterrechea, M., Lertxundi, A., et al., 2011. Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere* 82, 114–120.
- Ikononou, M.G., Sather, P., Oh, J.E., Choi, W.Y., Chang, Y.S., 2002. PCB levels and congener patterns from Korean municipal waste incinerator stack emissions. *Chemosphere* 49, 205–216.
- INE, 2009. Clasificación de ocupaciones de Bolivia "COB 2009". <<http://www.ine.gov.bo/pdf/COB2009/COB2009.pdf>>.
- INE, 2012. Bolivian National Institute of Statistics. <<http://www.ine.gov.bo/>>.
- Jain, R.B., Wang, R.Y., 2010. Regression models to estimate total polychlorinated biphenyls in the general US population: 2001–2002 and 2003–2004. *Chemosphere* 79, 243–252.
- Jamshidi, A., Hunter, S., Hazrati, S., Harrad, S., 2007. Concentrations and chiral signatures of polychlorinated biphenyls in outdoor and indoor air and soil in a major U.K. conurbation. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2153–2158.
- Kalantzi, O.I., Brown, F.R., Caleff, M., Goth-Goldstein, R., Petreas, M., 2009. Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human breast adipose samples from Brazil. *Environ. Int.* 35, 113–117.
- Kalantzi, O.I., Geens, T., Covaci, A., Siskos, P.A., 2011. Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece. *Environ. Int.* 37, 349–353.
- Kang, J.H., Park, H., Chang, Y.S., Choi, J.W., 2008. Distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human serum from urban areas in Korea. *Chemosphere* 73, 1625–1631.
- Kiviranta, H., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J., Tukainen, E., Vartiainen, T., 2005. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in the general population in Finland. *Chemosphere* 60, 854–869.
- Knutsen, H.K., Kvale, H.E., Haugen, M., Meltzer, H.M., Brantsaeter, A.L., Alexander, J., et al., 2011. Sex, BMI and age in addition to dietary intakes influence blood concentrations and congener profiles of dioxins and PCBs. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 772–782.
- Kroon, L.A., 2007. Drug interactions with smoking. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 64, 1917–1921.
- Kvale, H.E., Knutsen, H.K., Thomsen, C., Haugen, M., Stigum, H., Brantsaeter, A.L., et al., 2009. Role of dietary patterns for dioxin and PCB exposure. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1438–1451.
- La Rocca, C., Mantovani, A., 2006. From environment to food: the case of PCB. *Ann. Ist. Super. Sanita* 42, 410–416.
- Laden, F., Neas, L.M., Spiegelman, D., Hankinson, S.E., Willett, W.C., Ireland, K., et al., 1999. Predictors of plasma concentrations of DDE and PCBs in a group of U.S. women. *Environ. Health Perspect.* 107, 75–81.
- Llobet, J.M., Bocio, A., Domingo, J.L., Teixido, A., Casas, C., Müller, L., 2003. Levels of polychlorinated biphenyls in foods from Catalonia, Spain: estimated dietary intake. *J. Food Prot.* 66, 479–484.
- Llop, S., Ballester, F., Vizcaino, E., Murcia, M., Lopez-Espinosa, M.J., Rebagliato, M., et al., 2010. Concentrations and determinants of organochlorine levels among pregnant women in Eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 408, 5758–5767.
- Longnecker, M.P., Rogan, W.J., Lucier, G., 1997. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu. Rev. Public Health* 18, 211–244.
- Longnecker, M.P., Wolff, M.S., Gladen, B.C., Brock, J.W., Grandjean, P., Jacobson, J.L., et al., 2003. Comparison of polychlorinated biphenyl levels across studies of human neurodevelopment. *Environ. Health Perspect.* 111, 65–70.
- Martinez Vidal, J.L., Moreno, F.M., Garrido, F.A., Olea-Serrano, F., Olea, N., 2002. Determination of endocrine-disrupting pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum by GC-ECD and GC-MS-MS and evaluation of contributions to the uncertainty of the results. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 766–775.

- McCoy, C.A., Carruth, A.K., Reed, D.B., 2002. Women in agriculture: risks for occupational injury within the context of gendered role. *J. Agric. Saf. Health* 8, 37–50.
- Mickey, R.M., Greenland, S., 1989. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am. J. Epidemiol.* 129, 125–137.
- Ministerio de Desarrollo Sostenible, 2004. Plan Nacional de implementación de la República de Bolivia para el cumplimiento del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Viceministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Dirección General de Medio Ambiente. La Paz. (<http://www.pops.int/documents/implementation/nips/submissions/bolivia.pdf>).
- Moreno-Frias, M., Jimenez, T.M., Garrido, F.A., Martinez Vidal, J.L., Olea-Serrano, F., Olea, N., 2004. Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.* 18, 102–111.
- Munoz-de-Toro, M., Beldomenico, H.R., Garcia, S.R., Stoker, C., De Jesus, J.J., Beldomenico, P.M., et al., 2006. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environ. Res.* 102, 107–112.
- Nichols, B.R., Hentz, K.L., Aylward, L., Hays, S.M., Lamb, J.C., 2007. Age-specific reference ranges for polychlorinated biphenyls (PCB) based on the NHANES 2001–2002 survey. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 1873–1877.
- Parent, A.S., Naveau, E., Gerard, A., Bourguignon, J.P., Westbrook, G.L., 2011. Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 14, 328–345.
- Phillips, D.L., Pirkle, J.L., Burse, V.W., Bernert Jr., J.T., Henderson, L.O., Needham, L.L., 1989. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 495–500.
- Regidor, E., 2001. The Goldthorpe social class classification: Reference framework for a proposal for the measurement of social class by the Working Group of the Spanish Society of Epidemiology. *Rev. Esp. Salud Publica* 75, 13–22.
- Rivas, A., Fernandez, M.F., Cerrillo, I., Ibarluzea, J., Olea-Serrano, M.F., Pedraza, V., et al., 2001. Human exposure to endocrine disruptors: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 109, 185–197.
- Salinas, R.O., Bermudez, B.S., Tolentino, R.G., Gonzalez, G.D., Leon, S., 2010. Presence of polychlorinated biphenyls (PCBs) in bottled drinking water in Mexico City. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 372–376.
- Schisterman, E.F., Whitcomb, B.W., Louis, G.M., Louis, T.A., 2005. Lipid adjustment in the analysis of environmental contaminants and human health risks. *Environ. Health Perspect.* 113, 853–857.
- UNEP, 2002. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Eastern and Western South America Regional Report. United Nations Environment Programme.
- Valvi, D., Mendez, M.A., Martinez, D., Grimalt, J.O., Torrent, M., Sunyer, J., et al., 2012. Prenatal concentrations of PCBs, DDE, DDT and overweight in children: A prospective birth cohort study. *Environ. Health Perspect.* 120, 451–457.
- Waliszewski, S.M., Carvajal, O., Infanzon, R.M., Trujillo, P., Hart, M.M., 2004. Copartition ratios of persistent organochlorine pesticides between human adipose tissue and blood serum lipids. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 732–738.
- Wingfors, H., Selden, A.L., Nilsson, C., Haglund, P., 2006. Identification of markers for PCB exposure in plasma from Swedish construction workers removing old elastic sealants. *Ann. Occup. Hyg.* 50, 65–73.
- Yudelman, S.W., 1994. Women farmers in Central America: Myths, roles, reality. *Grassroots. Dev.* 18, 2–13.
- Zubero, M.B., Ibarluzea, J.M., Aurrekoetxea, J.J., Rivera, J., Parera, J., Abad, E., et al., 2009. Serum levels of polychlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans and PCBs in the general population living near an urban waste treatment plant in Biscay, Basque Country. *Chemosphere* 76, 784–791.

Discusión

El estudio de predictores de exposición a PCBs es de especial interés en Santa Cruz de la Sierra, debido al reciente crecimiento de la ciudad y de las características particulares de la población, cuyos patrones diferentes de dieta y estilo de vida, son diferentes a los de la mayoría de las poblaciones europeas o norteamericanas estudiado en este contexto hasta la fecha (Arrebola et al., 2012a).

Los niveles de COPs en la población de Santa Cruz de la Sierra fueron descritos en una publicación anterior (Arrebola et al., 2012a), donde se concluía que estos eran moderados y no muy diferentes de los reportados para las poblaciones de países más industrializados (Arrebola et al., 2010; CDC, 2009; Ibarluzea et al., 2011; Kalantzi et al., 2011; Kang et al., 2008).

En los modelos parcialmente ajustados, las covariables se introdujeron paso a paso con el fin de evaluar su influencia potencial en las asociaciones con los niveles de exposición. Debido a su lipofilia, los PCBs tienden a bioacumularse en la fracción lipídica de los tejidos. Es bien sabido que las concentraciones séricas de PCBs están relacionadas con los niveles de lípidos séricos (Goncharov et al., 2008; Guo et al., 1987) y que, en ciertas condiciones de equilibrio, las concentraciones de lípidos estandarizadas podrían predecir la carga corporal de PCBs (Brown and Lawton, 1984). La estandarización por lípidos ha sido también especialmente recomendada cuando el/la participante se encuentra en condiciones de no ayuno en el momento de la extracción de la muestra biológica. La estandarización permite la comparación de los niveles en suero con las concentraciones de COPs en otras muestras de tejido o con otras poblaciones de estudio (Bergonzi et al., 2009). Se debe tener cuidado en los modelos de concentraciones de PCBs, debido a que la selección del modelo podría estar influenciado por factores tales como el tejido investigado, la capacidad metabólica individual, la metodología de laboratorio, y el porcentaje de muestras por debajo del límite de detección (Jain and Wang, 2010; Schisterman et al., 2005).

En los análisis estadísticos, aunque Σ PCBs no se asoció con la variable residencia en el modelo crudo y los ajustados, los modelos globales mostraron mayores niveles de

PCBs en tejido adiposo para los residentes en zona urbana, probablemente debido a la mayor exposición a las actividades industriales y edificios contaminados en este área, tal y como se ha comentado en estudios previos (Henriquez-Hernandez et al., 2011). A pesar de las restricciones actuales en el uso de los PCBs, continúan existiendo en equipos viejos y edificios de construcción previa a la normativa de regulación de PCBs. Además, los trabajadores de la construcción que participan en su remodelación o demolición pueden sufrir un riesgo considerable de exposición (Wingfors et al., 2006). De hecho, en nuestro trabajo detectamos concentraciones séricas más altas en los trabajadores de la industria que en el resto de la población estudiada.

En los modelos globales, la edad se asoció negativamente con Σ PCBs en el tejido adiposo. La asociación positiva entre la carga corporal de PCBs y la edad ha sido objeto de numerosos estudios (Arrebola et al., 2010; Kiviranta, 2005; Nichols et al., 2007), y normalmente se explica por la bioacumulación de estos contaminantes en el organismo, o por el llamado efecto cohorte (Ahlborg et al., 1995). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han llevado a cabo en los países más industrializados, donde el uso de PCBs comenzó antes que en el área de Santa Cruz de la Sierra. La ciudad creció rápidamente de 325.000 habitantes en 1976, a 1.616.063 en 2009 (INE, 2010). Este hecho puede explicar por qué los niveles de PCBs en esta población no están correlacionados positivamente con la edad. De hecho, el DDT, que se utilizó años antes que los PCBs, sí se asoció positivamente con la edad en la misma población (Arrebola et al., 2012c). Además, aunque sólo los individuos que habían vivido durante al menos 10 años en la zona se consideraron en el estudio, Santa Cruz de la Sierra recibe un gran número de inmigrantes de otras regiones del país, y no podemos descartar que tengan diferentes exposiciones acumuladas a pesar de cumplir el criterio de residencia.

En mujeres, el número de embarazos previos también mostró una asociación negativa con la concentración de PCBs en tejido adiposo, lo que es generalmente atribuido a la transferencia (y, por tanto, excreción) de estos contaminantes a través de la placenta de la madre al feto (Llop et al., 2010). Sin embargo esta asociación perdió significación estadística después del ajuste por el IMC, por lo que debe interpretarse con cautela.

El consumo de cigarrillos se correlacionó inversamente con los PCBs en tejido adiposo. Esta asociación fue consistente a través de los modelos parcialmente ajustados y el

modelo global. Este hallazgo puede estar relacionado con una mayor capacidad de metabolizar los PCBs en las personas fumadoras, que podría ser debido a la inducción del citocromo P450 (CYP) 1A1 y 1A2 por los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el humo del cigarrillo, según los estudios de Kroon (2007) y Knutsen (2011).

Por otro lado, se observó una asociación positiva entre Σ PCBs y el consumo de alimentos grasos, por ejemplo, la leche, la mantequilla, la carne curada, cordero y huevos. Estudios previos han estimado que los alimentos grasos aportan de 80-90% de la carga corporal de PCBs en la población general, no expuesta de forma ocupacional (Baars et al., 2004; Domingo and Bocio, 2007; Laden et al., 1999; Llobet et al., 2003). El consumo de pescado azul y de gran tamaño se ha considerado como una de las mayores fuentes dietéticas en la exposición a PCBs. Sin embargo, su consumo en Santa Cruz de la Sierra es muy bajo, ya que la ciudad dista mucho del mar, por lo que el consumo de otros grupos de alimentos grasos (ej. carne, huevos) tendría una mayor contribución dietética a la ingesta de PCBs, como se evidencia en este estudio, donde no se observaron asociaciones con el consumo de ningún tipo de pescado.

Las diferencias entre las dos matrices pueden ser derivadas de su significado biológico, dado que las concentraciones de tejido adiposo son un indicador de la exposición crónica a los PCBs, mientras que los niveles séricos son un buen predictor de la exposición más reciente y la movilización de los PCBs almacenados en los tejidos grasos. El IMC se fue un modificador importante de éstas asociaciones.

En el presente objetivo, la ingesta de verduras y legumbres se asoció negativamente con los niveles de PCBs sólo en los modelos parcialmente ajustados. Teniendo en cuenta que los COPs son lipófilos y no se utilizan para fines agrícolas, no se espera que estas matrices sean fuentes de exposición alimentaria a PCBs. Existen resultados similares para el consumo de verduras en otros trabajos previos (Brauner et al., 2011).

El hallazgo de una interacción entre el IMC y el consumo de cordero indica que la influencia del consumo de cordero (y probablemente de otros alimentos) puede variar de acuerdo con el IMC de los sujetos. Este hecho es importante, porque los PCBs han sido descritos como potenciales obesógenos como se verá en más profundidad en los objetivos 3 y 4 (Valvi et al., 2011). De hecho, un ajuste del IMC tuvo poco efecto en

nuestro modelo crudo y en los parcialmente ajustados en suero, pero fue un modificador importante de algunos de los predictores en relación a las concentraciones en tejido adiposo. La relación entre el IMC y la carga corporal de PCBs sigue siendo poco clara, con muchos estudios que reportan correlaciones positivas o negativas y otros que no encuentran ninguna relación entre ellos (Brauner et al., 2011;Fernandez et al., 2008b;Gallo et al., 2011;Glynn et al., 2007;Henriquez-Hernandez et al., 2011). El IMC podría ser un indicador indirecto para la exposición a los COPs través de los alimentos, según lo comentado en otros estudios (Arrebola et al., 2010;Arrebola et al., 2009) y un elevado grado de obesidad podría ejercer un efecto de dilución sobre los COPs almacenados en el tejido adiposo (Glynn et al., 2007).

Si comparamos los modelos multivariantes de PCBs en suero con los de tejido adiposo, encontramos un mayor número de variables predictoras en los modelos de tejido adiposo. A pesar de las diferencias de tamaño muestral, las concentraciones de los PCBs en suero ajustados por lípidos séricos, generalmente muestran una mayor variabilidad que los de tejido adiposo, debido a las fluctuaciones en los lípidos séricos en ciertas condiciones fisiológicas (por ejemplo, postprandial) (Schisterman et al., 2005;Waliszewski et al., 2004). Esto hace que las concentraciones séricas sean buenas predictoras de la exposición a COPs en un momento determinado (incluyendo la movilización de los almacenados en los tejidos grasos), pero no siempre de la exposición crónica (Archibeque-Engle et al., 1997;Waliszewski et al., 2004). El cuestionario utilizado para la realización del objetivo 4 fue diseñado para evaluar la exposición a largo plazo principalmente, y el más apropiado para caracterizar las variables sociodemográficas, estilo de vida y hábitos alimentarios que se establecen como más adecuadas para la medida de la exposición a largo plazo.

El consumo de alimentos grasos pareció tener un efecto positivo sobre las concentraciones de PCBs en suero y tejido adiposo, mientras que residencia urbana se asoció únicamente con las concentraciones en tejido adiposo. Como se ha descrito anteriormente en el caso de los plaguicidas organoclorados, la residencia cerca de los sitios agrícolas ejerce una influencia importante en la exposición de largo plazo a DDT y su metabolito *p*, *p'*-DDE en la misma población de estudio (Arrebola et al., 2012c). Teniendo en cuenta que el tiempo medio de la actual residencia fue de 12 años en

nuestros sujetos de estudio, es probable que el entorno local realizara una contribución importante a la exposición acumulada (es decir, las concentraciones en tejido adiposo).

Este estudio toma en esta investigación, un paso adelante en la caracterización de las posibles vías de exposición a PCBs para una población poco estudiada en este aspecto. El estudio de predictores de exposición a PCBs es de especial interés en Santa Cruz de la Sierra debido al rápido crecimiento de la ciudad y las características particulares de la población. La dieta, el estilo de vida y los patrones difieren de los de la mayoría de las poblaciones occidentales estudiadas en este contexto hasta la fecha (Arrebola et al., 2012c) y por tanto, aporta una nueva perspectiva en estudios de exposición a PCBs.

7.3 Asociación entre exposición acumulada a contaminantes orgánicos persistentes, lípidos séricos y obesidad en una cohorte de adultos del sudeste español (Objetivo 3).

El trabajo de investigación llevado a cabo para el objetivo 3 fue diseñado para esclarecer el papel de la exposición humana a algunos COPs en los trastornos de la homeostasis de lípidos. Este aspecto de la exposición humana a COPs es de especial interés ya que se ha sugerido que la exposición a PCBs y COPs podría estar relacionada con alteraciones en el metabolismo lipídico que provocarían una elevación de lípidos séricos (Aminov et al., 2013).

Resumen

El objetivo de esta investigación fue estudiar la asociación de la exposición humana acumulada a los contaminantes orgánicos persistentes con los niveles de lípidos en suero y la obesidad, en una cohorte de 298 adultos.

En el análisis multivariante, las concentraciones de HCB evidenciaron una asociación cuadrática significativa con los niveles de colesterol total, HDL, LDL y lípidos totales en suero. Del mismo modo, los PCBs 138 y 180 se asociaron con los triglicéridos y lípidos totales en suero y PCB-153 con LDL. HCB, p, p'-DDE, y β -HCH mostró asociaciones de segundo grado con el IMC. Todos los modelos cuadráticos mostraron una tendencia positiva en los niveles bajos de exposición, mientras que la pendiente disminuye o incluso se convirtió en negativo en los niveles de exposición superiores. Además, PCB-138 se asoció positivamente con el IMC de forma lineal. Nuestros resultados sugieren una posible relación entre la exposición histórica a COPs y lípidos séricos / obesidad, que siguió un patrón no lineal en la mayoría de los casos.

Arrebola JP, Ocana-Riola R, Arrebola-Moreno AL, Fernandez-Rodriguez M, Martin-Olmedo P, Fernandez MF, Olea N. Associations of accumulated exposure to persistent organic pollutants with serum lipids and obesity in an adult cohort from Southern Spain. *Environ Pollut* 2014; 195: 9-15.

Factor de impacto 2014 : 4.143 (Primer decil)



Associations of accumulated exposure to persistent organic pollutants with serum lipids and obesity in an adult cohort from Southern Spain



Juan P. Arrebola^{a, b, c, *}, Ricardo Ocaña-Riola^d, Antonio L. Arrebola-Moreno^e,
María Fernández-Rodríguez^a, Piedad Martín-Olmedo^d, Mariana F. Fernández^{a, c},
Nicolás Olea^{a, c}

^a Instituto de Investigación Biosanitaria IBS GRANADA, University of Granada, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain

^b Radiation Oncology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

^c CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

^d Escuela Andaluza de Salud Pública, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, IBS GRANADA, Cuesta del Observatorio s/n, Campus Universitario de Cartuja s/n, 18080, Granada, Spain

^e Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 December 2013

Received in revised form

1 August 2014

Accepted 2 August 2014

Available online 30 August 2014

Keywords:

Serum lipids

Obesity

Persistent organic pollutants

Organochlorine pesticides

Polychlorinated biphenyls

ABSTRACT

The aim of this research was to study the association of the accumulated human exposure to persistent organic pollutants with serum lipid levels and obesity, in a cohort of 298 adults.

In the multivariable analyses, HCB concentrations evidenced a significant quadratic association with levels of total cholesterol, HDL, LDL, and total serum lipids. Likewise, PCBs 138 and 180 were associated with triglycerides and total serum lipids, and PCB 153 with LDL. HCB, p,p'-DDE, and β -HCH showed quadratic associations with BMI. All quadratic models showed a positive trend at low exposure levels, while the slope decreased or even became negative at higher exposure levels. Additionally, PCB 138 was positively associated with BMI but in a linear manner. Our results suggest a potential relationship between historical POP exposure and serum lipids/obesity, which followed a non-linear pattern in most cases.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are among the most frequent causes of adult mortality in developed countries (Goncharov et al., 2008). In Spain, cardiac and cerebrovascular diseases were, respectively, the 2nd and 3rd causes of death in 2010 (Regidor and Gutiérrez-Fisac, 2013). Main risk factors for CVD include high-fat diet, stress, smoking, genetic susceptibility, obesity, dyslipidemia, diabetes, or hypertension (Meigs, 2000; Lee et al., 2011; Goncharov et al., 2008). Thus, researchers have proposed a cluster of pathophysiological conditions, closely related to CVD, called the "metabolic syndrome", which includes dyslipidemia, obesity, hypertension, and insulin resistance and affects 20–30% of the European population (Branca et al., 2007; Shen et al., 1970).

The prevalence of obesity has tripled over the past few decades in Europe, reaching epidemic proportions (Branca et al., 2007).

Obesity is usually recognized as the result of increased calorie intake and decreased energy expenditure, with a genetic contribution that has been estimated as 20–84% (Sharpe and Drake, 2013). However, there is increasing evidence that environmental factors play a major role in this condition (McAllister et al., 2009). It is well documented that adipose tissue is an endocrine organ that actively participates in the regulation of metabolism (Kershaw and Flier, 2004), and that the accumulation and mobilization of lipids in adipose tissue is highly influenced by hormonal signaling (Grun and Blumberg, 2009b).

Persistent organic pollutants (POPs) are a wide group of highly lipophilic environmental pollutants that tend to accumulate and biomagnify in food chains, resulting in the considerable exposure of living organisms (UNEP, 2003). POPs include organochlorine pesticides, which have long been widely used in agriculture and public health as highly effective pest control agents (UNEP, 2003). POPs also comprise polychlorinated biphenyls (PCBs), used worldwide in numerous industrial and commercial applications. POPs have been detected in virtually all human populations and environmental matrices, and diet (especially fatty food) has been reported to be

* Corresponding author.
E-mail address: jparrebola@ugr.es (J.P. Arrebola).

the main route for human exposure (Brauner et al., 2011). Once absorbed, POPs are mainly stored in the adipose tissue, where they can be released or persist for decades (Yu et al., 2011).

There is scientific evidence that human exposure to some POPs might be involved in lipid homeostasis disorders, and several action mechanisms have been proposed at different levels, including the down-regulation of insulin-induced gene-1 (Insig-1) and Lpin1, two master regulators of lipid homeostasis (Ruzzin et al., 2010). Additionally, dioxin- and non-dioxin-like PCBs have been reported to induce P450 enzymes, causing an over-reactive liver that synthesizes increased levels of cholesterol and triglycerides (Goncharov et al., 2008). Moreover, PCBs can induce oxidative stress in endothelial cells by stimulating inflammatory processes (Choi et al., 2003). Many POPs are also suspected of acting as obesogens, i.e., capable of altering lipid accumulation and adipogenesis (Grun and Blumberg, 2007) and therefore promoting obesity and obesity-related disorders (Sharpe and Drake, 2013). Besides the aforementioned lipid metabolism impairments, other reported mechanisms of action include the enhancement of adipocyte hyperplasia, disruption of energy balance controlling systems, and interaction with the nervous system (Grun and Blumberg, 2009a; Newbold et al., 2009; Heindel and vom Saal, 2009). It has also been suggested that lipophilic chemicals, such as POPs, may facilitate absorption across membranes of hydrophilic endocrine disruptors that would not otherwise be absorbed, which is also potentially related to alterations in lipid levels (Zeliger, 2003, 2013).

Some epidemiological evidence has also been reported on the disruptive potential of POPs in serum lipid homeostasis. Goncharov et al. (2008) found that high serum PCB levels were associated with elevated serum lipids and CVD risk in a native American population, while others have also described these associations in sub-populations highly exposed to PCBs (Chase et al., 1982; Baker et al., 1980; Kreiss et al., 1981; Tokunaga and Kataoka, 2003). Furthermore, Lee et al. (2011) described significant associations between low POP exposure levels and various lipid metabolism parameters (e.g., triglycerides and HDL) in a sample of non-diabetic individuals.

Nevertheless, the health effects of human exposure to chronic low doses of POPs remain poorly understood (Porta et al., 2008) and paradoxical results have been reported, with larger effects from low than high doses in some cases (Hennig et al., 2002).

The study of the potential influence of POP exposure on lipid homeostasis is of special concern, because it has been suggested that POP-mediated elevation in serum lipids might be related to the increased incidence of cardiovascular disease observed in individuals with elevated exposure to PCBs and organochlorine pesticides (Aminov et al., 2013). Therefore, the aim of the present research was to study the relationship of the accumulation of POPs in adipose tissue with serum lipid levels and obesity in a cohort of adults from Southern Spain.

2. Material and methods

2.1. Study area and population

The study population and epidemiological design were extensively described elsewhere (Arrebola et al., 2013a, 2013b, 2009, 2010). In summary, adipose tissue/serum samples and data were collected between July 2003 and June 2004 in two areas of Granada province (Southern Spain) that are approximately 70 km apart (from center to center): a densely populated urban area, corresponding to the city of Granada and metropolitan suburbs (economy based on the service sector and light industry, with high levels of traffic-related air pollution); and a semi-rural area, corresponding to the town of Motril and surroundings (small towns and villages on the Mediterranean coast, with intensive agricultural activity, including greenhouse cultivation). Participants were recruited from among subjects undergoing non-cancer-related surgery (47% inguinal hernia or abdominal surgery; 17% gall bladder surgery, 12% varicose vein surgery, and 24% other surgery) at San Cecilio University Hospital in Granada and Santa Ana Hospital in Motril. Surgical treatment made it ethically and practically feasible to obtain adipose tissue samples. Inclusion

criteria were: age over 16 years, absence of hormone-related disease or cancer, no hormone therapy, and residence in one of the study areas for >10 yrs. Out of the 409 eligible individuals meeting the inclusion criteria and invited to participate, 387 (94.6%) accepted and were included in the study, but 89 individuals were dropped because of missing analytical or covariate data, leaving a final sample of 298 participants (73%). All participants signed their informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee of each hospital.

2.2. Biological samples and chemical analyses

A 5–10 g sample of adipose tissue and 10 mL of blood were collected during surgery and immediately coded and stored at -80°C until chemical analysis. Blood samples were then centrifuged for 5 min at 2500 rpm to separate the serum. Main sources of tissue were pelvic waist (42%), front abdominal wall (39%) and limbs (13%). Samples were all collected under 12-h fasting conditions.

Before chemical analyses, adipose tissue samples were extracted and processed as described elsewhere (Martinez Vidal et al., 2002; Moreno-Frias et al., 2004). Briefly, 200 mg of adipose tissue were mechanically homogenized in the presence of n-hexane, and the solution was then purified through 200 mg alumina in a glass column and kept in test tubes at -80°C .

POP analyses in adipose tissue extracts were performed in the Laboratories of Laboratorio Analítico Bioclínico (LAB) in Almería (Spain). POP residues were quantified by high-resolution gas chromatography with a mass spectrometry detector in tandem mode, using a Saturn 2000 ion trap system (Varian, Walnut Creek, CA) and a 2 m \times 0.25 mm silica capillary column (Bellefonte, PA) coupled to a Factor Four VF-5MS 30 m \times 0.25 mm i.d. analytical column (Varian Inc., Walnut Creek, CA). Residues of *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE, the main metabolite of the pesticide dichlorodiphenyltrichloroethane [DDT]), hexachlorobenzene (HCB), β -hexachlorocyclohexane (β -HCH), and PCB congeners 138, 153 and 180 were quantified. Procedural blanks were extracted with the same methodology, and no sample showed detectable levels of the analytes. Inter- and intra-day variabilities were calculated by analyzing fortified samples within the same day (repeatability) and on different days (intermediate precision), respectively, always yielding a result < 20%. For the quality control, laboratory-fortified matrix samples at different concentrations were used. The limit of detection (LD) and limit of quantification were determined as the smallest amount of the analyte that gave a signal-to-noise ratio ≥ 3 and ≥ 10 , respectively, and were set at 0.01 $\mu\text{g/L}$ and 0.04 $\mu\text{g/L}$ for each POP, respectively. Concentrations below the LD were assigned a random value between zero and the LD, as recommended by Antweiler and Taylor (2008).

POP concentrations were calculated by using matrix-matched calibration and were expressed in lipid basis (nanograms per gram of lipid). C_{13} -labeled *p,p'*-DDE and 3-fluoro-2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB 28F) were used as internal standards in the analyses of organochlorine pesticides and PCBs, respectively. The recovery of POPs from adipose tissue was studied to assess the extraction efficiency of the methods, spiking 10 adipose tissue samples with target analytes at an intermediate point on the calibration curve and processing them as described above. Recoveries ranged from 90 to 98%.

Total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and triglyceride levels were enzymatically quantified in 10 μL of serum from each participant. Total serum lipids were calculated using the standard short formula of Phillips et al. (1989). Total lipid content in adipose tissue was quantified gravimetrically as described by Rivas et al. (2001). BMI was used as a measure of obesity, calculated as weight/height squared (kg/m^2).

2.3. Covariates

Covariates were gathered using an *ad hoc* questionnaire, which was completed by each participant before surgery and administered face-to-face by a trained interviewer during the hospital stay. Socio-demographic characteristics included information on age, education, smoking habit, occupation, medical history, and medication.

Residence in the city of Granada at the time of the surgery was considered "urban" and residence in the area of Motril was considered "semi-rural". A subject was considered a smoker (past or present) at any level of daily tobacco consumption (≥ 1 cig/day).

Subjects were classified into six occupational categories, following Goldthorpe's proposal (Regidor, 2001), and three grouped categories were formed: social classes I + II + III (non-manual workers) and IV + V (manual workers).

Questionnaires and research procedures were standardized and validated in a pilot study of 50 subjects, in which adipose tissue POP concentrations were quantified and questionnaires were completed. Based on this experience, sample collection protocols, analytical methodologies, and data collection criteria were tested and refined.

2.4. Statistical analysis

First, the shape of the relationships between individual POP concentrations and serum lipids or BMI was visually evaluated through locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS), a non-parametric local regression method (Supplementary material). The associations were then tested by using polynomial regression

models with a quadratic term, with the exception of PCB 138 with BMI, and PCB 180 with BMI, whose plots showed associations close to linearity and were therefore evaluated by linear regression.

Simple regression models were built and further adjusted in multivariable models for log-transformed age [log (yrs)], residence (urban/semi-rural), occupational class (manual/non-manual), smoking habit (smoker/non-smoker), sex (man/woman), lipid-lowering treatment (yes/no) and, solely in the models for serum lipids, BMI (kg/m²). A quadratic relationship was assumed in a model when the quadratic term was statistically significant.

Diagnosis of the models was performed in order to ensure the goodness of fit and the fulfillment of implementation conditions. Generalized standard-error inflation factors were used to verify absence of collinearity between independent variables, while homoscedasticity was assured by plotting residual versus fitted values. The linearity of quantitative independent variables was checked with partial regression plots, and the normality of errors was verified by normal QQ plot with 95% confidence intervals (Fox, 2008).

The significance level was set at $p \leq 0.05$; however, $p \leq 0.10$ was considered borderline statistically significant following the recommendations of Greenland (1989) and Mickey and Greenland (1989) who suggested that increasing the traditional level of significance of 0.05 would help to detect true predictors.

Data were stored and processed using the R statistical computing environment v3.0 (<http://www.r-project.org/>).

3. Results

Table 1 summarizes the main characteristics of the study population and the analytical measurements in adipose tissue and serum.

Tables 2 and 3 display the results of the bivariate and multivariable regression models, respectively. In the multivariable models, HCB concentrations evidenced a significant quadratic association with levels of total cholesterol, HDL, LDL, and total serum lipids. Likewise, PCBs 138 and 180 were associated with

triglycerides and total serum lipids, and PCB 153 with LDL. HCB, p,p'-DDE, β -HCH showed quadratic associations with the BMI. All statistically significant quadratic models showed positive beta coefficients for the independent variable (POP concentrations) and negative ones for the quadratic term; thus, the association between POPs and serum lipids/obesity showed a positive trend at low exposure levels, whereas the slope decreased or even became negative at higher exposure levels. Additionally, PCB 138 was positively associated with BMI, but in a linear manner. As examples, Figs. 1 and 2 depict the predicted levels of serum lipids and BMI, respectively, according to the multivariable models. Simulations were performed for age = 50 yrs, residence = semi-rural, occupational class = manual worker, non-smoker, sex = male and no lipid-lowering treatment. Only models with statistically significant results were plotted (see Table 3).

Once the multivariable models were created, the effect of the variable "lipid-lowering treatment (yes/no)" was assessed by introducing it as a covariate and as an interaction term with the independent variables, finding no significant results in any model (data not shown). Additionally, we found no significant changes in the observed associations when "adipose tissue origin" was entered as a covariate in the multivariable analyses; therefore, this variable was not taken into account in the final models (data not shown).

4. Discussion

This study reports associations of POP concentrations in adipose tissue with various blood lipid parameters and with obesity. It is noteworthy that most of the associations found in the present study followed a non-linear pattern, with the regression line showing a positive slope at low exposure levels that decreased or even became negative at higher exposure levels. Lee et al. (2010) also reported non-linear associations, arguing that hormonal receptors typically show a linear dose–response relation up to 10% of occupation but can even be down-regulated at high exposure levels (Medlock et al., 1991). The same research team also found inverted-U-shape associations between serum POPs and triglycerides or BMI in a sample of 90 individuals from CARDIA cohort (Lee et al., 2011). These paradoxical effects have also been demonstrated in *in vitro* assays with other POPs. Thus, low doses of PCB 77 and TCDD resulted in adipocyte differentiation, increased glycerol–3-phosphate dehydrogenase activity, and elevated expression of peroxisome proliferator–activated receptor γ , whereas higher doses exerted no proliferative effect on adipocytes (Arsenescu et al., 2008). Another study found that low but not high doses of PCB 77 induced the release of inflammatory molecules in adipocyte cultures (Crouch et al., 2005).

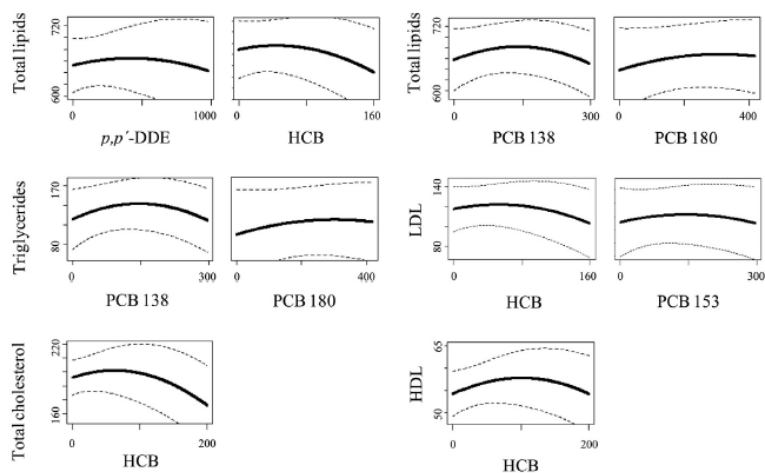
In our study, the lack of statistical significance of the "POPs \times lipid-lowering treatment" interaction might be related to various factors: our utilization of adipose tissue POP concentrations (more indicative of a historical exposure) rather than serum, the small number of participants under treatment ($n = 27$), and the fact that the duration of their treatment was not taken into account.

It is important to note that all POPs in the present study showed positive correlations between them, with Spearman coefficients ranging from 0.6 to 0.9 (data not shown in tables). Therefore, the associations found with single chemicals may be surrogates of exposure to other agents with similar physicochemical characteristics (Brauner et al., 2012b; Arrebola et al., 2013b). It should also be borne in mind that humans are exposed to complex mixtures of environmental pollutants, which represents a complex issue that warrants further research, given published evidence on the adverse effects of exposure to mixtures of chemicals at individual

Table 1
Description of the study population.

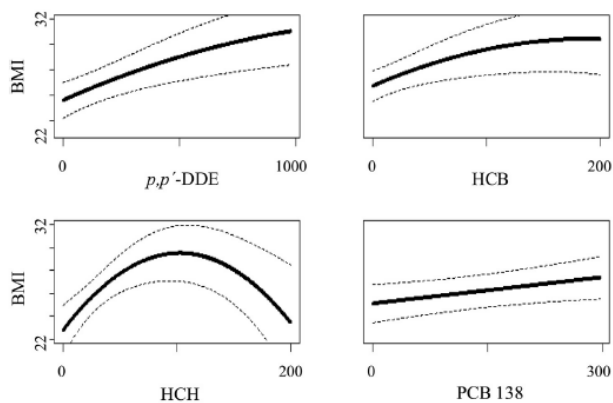
	n	%			
Sex					
Woman	152		51.0		
Man	146		49.0		
Residence					
Urban	140		47.0		
Semi-rural	158		53.0		
Cardiovascular disease	88		29.5		
Hypercholesterolemia	63		21.1		
Lipid-lowering treatment	27		9.1		
Occupational class					
Manual worker	230		77.2		
Non-manual worker	68		22.8		
Current smoker	96		32.2		
HCB > LD	275		92.3		
HCH > LD	253		84.9		
DDE > LD	298		100.0		
PCB 153 > LD	276		92.6		
PCB 138 > LD	258		86.6		
PCB 180 > LD	270		90.6		
	Mean	SD	Median	Percentiles	
				25th	75th
Age (yrs)	50.98	16.90	52.00	38.00	63.25
BMI (Kg/m ²)	27.48	5.35	26.56	23.80	29.72
HCB (ng/g lipid)	32.81	46.15	16.37	5.15	41.56
β -HCH (ng/g lipid)	19.60	28.74	11.25	3.78	22.35
p,p'-DDE (ng/g lipid)	183.99	281.61	98.53	35.20	213.13
PCB 153 (ng/g lipid)	277.83	224.60	237.45	126.21	370.70
PCB 138 (ng/g lipid)	95.13	90.41	80.63	29.89	125.09
PCB 180 (ng/g lipid)	222.62	184.29	184.34	99.58	301.92
Total cholesterol (mg/dL)	187.58	46.62	187.00	154.75	217.00
Triglycerides (mg/dL)	125.02	79.69	105.50	73.75	151.25
HDL (mg/dL)	50.75	15.38	48.00	41.00	58.25
LDL (mg/dL)	113.01	34.39	110.30	89.80	134.60
Total serum lipids (mg/dL)	613.13	154.39	599.53	500.69	694.67

LD: Limit of detection; SD: Standard deviation.



Dotted lines indicate 95% confidence intervals; Simulations were performed for an individual with 50 yrs, BMI=27 kg/m², residence=semi-rural, occupational class>manual worker, non-smoker, sex=male, and not receiving lipid-lowering treatment. Only models with statistically significant results in the quadratic term were plotted (see Table 3).

Fig. 1. Adipose tissue POP concentrations (ng/g lipid) vs predicted concentrations of serum lipids (mg/dL).



Dotted lines indicate 95% confidence intervals; Simulations were performed for an individual with 50 yrs, residence=semi-rural, occupational class>manual worker, non-smoker, sex=male and not receiving lipid-lowering treatment. Only models with statistically significant results in the quadratic term were plotted (see Table 3).

Fig. 2. Adipose tissue POP concentrations (ng/g lipid) vs predicted BMI values (kg/m²).

Table 2
Relationship of adipose tissue POP concentrations (ng/g lipid) with serum lipids (mg/dL) and BMI (kg/m²). Polynomial regression analyses.

	Total cholesterol			Triglycerides			HDL			LDL			Total lipids			BMI		
	Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI	
	Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper	
p,p'-DDE	* 3.1517	-0.3263	6.6297	1.9404	-4.0288	7.9097	0.5295	-0.6246	1.6837	2.1220	-0.4590	4.7026	9.0949	-2.4220	20.6117	** 0.8541	0.4746	1.2337
(p,p'-DDE) ²	** -0.0025	-0.0049	-0.0002	-0.0025	-0.0066	0.0015	-0.0003	-0.0011	0.0004	** -0.0017	-0.0034	0.0001	** -0.0083	-0.0162	-0.0005	** -0.0003	-0.0006	-0.0001
HCB	** 19.9858	0.9764	37.8151	0.7053	-31.3081	32.7188	2.7919	-3.6334	8.9473	** 15.3294	16.5000	29.0088	44.7337	-16.5102	105.9776	** 4.2860	2.2702	6.3018
(HCB) ²	** -0.1585	-0.2488	-0.0682	-0.0867	-0.2436	0.0703	** -0.0302	-0.0604	-0.0004	** -0.1089	-0.1759	-0.0419	** -0.4465	-0.7468	-0.1462	** -0.1339	-0.0242	-0.0036
β-HCH	17.0682	-17.7038	51.8402	16.3762	-43.0918	75.8442	2.2512	-9.2409	13.7432	12.1389	-13.6366	37.9144	55.1210	-59.9540	170.1900	** 9.5410	5.6985	13.3835
(β-HCH) ²	-0.1741	-0.4565	0.1082	-0.2333	-0.7162	0.2496	-0.0234	-0.1167	0.0659	-0.1146	-0.3236	0.0845	-0.6286	-1.5610	0.3059	** -0.0648	-0.0964	-0.0334
PCB 138	* 6.9218	-1.1773	15.0210	9.2594	-4.5298	23.0486	-0.3239	-3.0100	2.3622	* 5.8788	-0.1196	11.8772	* 24.9720	-17.423	51.6863	** 1.0639	0.4399	1.6878
(PCB 138) ²	** -0.0303	-0.0655	0.0049	** -0.0717	-0.1317	-0.0118	0.0008	-0.0109	0.0124	** -0.0203	-0.0463	0.0057	** -0.1405	-0.2566	-0.0244	NQ	NQ	NQ
PCB 153	** 4.2677	1.0002	7.5351	4.3500	-1.2442	9.9441	-0.2325	-1.3248	0.8598	** 3.4826	1.0614	5.9038	** 14.0376	3.2609	24.8143	** 0.5318	0.1744	0.8893
(PCB 153) ²	** -0.0073	-0.0126	-0.0020	** -0.0123	-0.0213	-0.0032	0.0003	-0.0014	0.0021	** -0.0053	-0.0092	-0.0013	** -0.0289	-0.0463	-0.0114	** -0.0005	-0.0010	0.0001
PCB 180	** 4.7444	0.9397	8.5491	3.8200	-2.7028	10.3429	-0.1209	-1.3916	1.1497	** 3.9694	1.1479	6.7909	** 14.5888	2.0207	27.1590	** 0.4431	0.0194	0.8669
(PCB 180) ²	** -0.0088	-0.0155	-0.0020	** -0.0137	-0.0253	-0.0022	-0.0001	-0.0023	0.0021	** -0.0060	-0.0110	-0.0011	** -0.0336	-0.0559	-0.0114	NQ	NQ	NQ

In order to assist the interpretation, estimates were calculated for an increment of 100 ng/g lip in the predictors; *p < 0.10; **p < 0.05; 2 indicates the quadratic term of the equation; NQ, the quadratic term was dropped from the analyses because the independent and dependent variables showed a linear association.

Table 3
Relationship of adipose tissue POP concentrations (ng/g lipid) with serum lipids (mg/dL) and BMI (kg/m²). Multivariable polynomial regression analyses.

	Total cholesterol			Triglycerides			HDL			LDL			Total lipids			BMI		
	Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI		Beta	95% CI	
	Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper	
p,p'-DDE	1.2100	-2.8825	5.3024	0.5697	-6.7653	7.9047	0.6734	-0.6764	2.0233	0.3308	-2.7162	3.3777	3.3163	-10.3555	16.9881	** 0.7207	0.2940	1.1473
(p,p'-DDE) ²	-0.0019	-0.0044	0.0006	-0.0025	-0.0070	0.0020	-0.0003	-0.0012	0.0005	-0.0011	-0.0029	0.0008	-0.0068	-0.0152	0.0016	** -0.0003	-0.0005	0.0000
HCB	8.2063	-14.7853	31.7979	-8.2892	-51.8771	33.2986	4.9294	-2.8336	12.6924	3.5524	-13.8414	20.9462	10.0201	-68.3769	88.4170	** 3.6344	1.1481	6.1207
(HCB) ²	** -0.1316	-0.2297	-0.0336	-0.0539	-0.2332	0.1254	** -0.0352	-0.0679	-0.0025	** -0.0810	-0.1541	20.9462	** -0.3527	-0.8327	-0.0226	** -0.0113	-0.0224	-0.0002
β-HCH	-0.9873	-4.69614	45.0268	-6.3241	-88.8223	76.2741	6.3553	-8.7516	21.4622	-4.5884	-38.8537	29.6768	-8.5199	-162.6608	145.6210	** 9.3126	4.5798	14.0454
(β-HCH) ²	-0.1115	-0.4374	0.2144	-0.0823	-0.6675	0.5030	-0.0594	-0.1664	0.0477	-0.0522	-0.2947	0.1903	-0.3353	-1.4276	0.7569	** -0.0639	-0.0986	-0.0292
PCB 138	1.4496	-8.0638	10.9630	7.2039	-9.6908	24.0986	-0.1873	-3.3184	2.9437	1.2797	-5.8125	8.3719	10.4945	-21.1797	42.1686	** 0.7668	0.9006	1.4430
(PCB 138) ²	-0.0224	-0.0587	0.0140	** -0.0735	-0.1381	-0.0089	0.0010	-0.0110	0.0129	-0.0139	-0.0409	0.0132	** -0.1243	-0.2453	-0.0033	NQ	NQ	NQ
PCB 153	1.7604	-2.2905	5.8113	3.8030	-3.4069	11.0129	-0.3110	-1.6479	1.0259	* 1.3961	-1.6225	4.4146	7.7991	-5.6799	21.2781	** 0.2791	-0.1401	0.6982
(PCB 153) ²	-0.0052	-0.0109	0.0005	-0.0121	-0.0222	-0.0021	0.0005	-0.0014	0.0023	** -0.0036	-0.0078	0.0006	-0.0240	-0.0428	-0.0051	-0.0002	-0.0007	0.0004
PCB 180	1.7604	-2.2905	5.8113	3.8030	-3.4069	11.0129	-0.3110	-1.6479	1.0259	1.1147	-2.3759	4.6052	7.7991	-5.6799	21.2781	0.1323	-0.3552	0.6199
(PCB 180) ²	-0.0052	-0.0109	0.0005	* -0.0121	-0.0222	-0.0021	0.0005	-0.0014	0.0023	-0.0037	-0.0090	0.0016	** -0.0240	-0.0428	-0.0051	NQ	NQ	NQ

In order to assist the interpretation, estimates were calculated for an increment of 100 ng/g lip in the predictors. Models were adjusted for log-transformed age [log (yrs)], residence (urban/semi-rural), occupational class (manual/non-manual), smoking habit (smoker/non-smoker), sex (man/woman), lipid-lowering treatment (yes/no) and, solely in the models for serum lipids, BMI (kg/m²). *p < 0.10; **p < 0.05; 2 indicates the quadratic term of the equation; NQ, the quadratic term was dropped from the analyses because the independent and dependent variables showed a linear association.

concentrations below their no-observed-adverse-effect-level (Rajapakse et al., 2002; Payne et al., 2001, 2000; Orton et al., 2014).

Potential limitations of the present study include its cross-sectional design, which prevents us from completely ruling out reversed-causality in the results. However, the association POPs → serum lipids appears to be more plausible, given that a rise in serum lipids would not necessarily result in higher POP accumulation in adipose tissue, and this direction has been confirmed by a few authors (Lee et al., 2010; Goncharov et al., 2008). For its part, adipose tissue is acknowledged to be the main POP deposit in humans, and obese individuals would be expected to accumulate larger amounts of these chemicals through their diet. In this regard, a potential dilution effect of larger amounts of adipose tissue may explain why the BMI did not augment linearly with POP concentrations in most of the present models, as also reported by Wolff et al. (2000). However, findings on the association of POP concentrations with the BMI have been contradictory, probably due to differences in study designs and populations (Arrebola et al., 2012b; Brauner et al., 2012a; Daglioglu et al., 2010; Vaclavik et al., 2006). Wolff et al. (2007) described a pharmacokinetic model in which a positive relationship might be expected if biological samples were collected at around 10 years after peak exposure because, although there is a dilution effect of body fat, POPs tend to have longer half-lives in obese than in lean persons. An alternative explanation of the present paradoxical findings may be that individuals with increased serum lipids or BMI (resulting, at least partially, from a higher exposure to POPs) may have taken measures to reduce these levels, e.g. pharmacological treatment, diet, or physical exercise. At the sample collection, therefore, they would evidence lower levels of obesity or serum lipids that do not correspond to their exposure to POPs. This is especially likely in our hospital-recruited study population, who would have received medical counseling. The receipt or non-receipt of lipid-lowering treatment had no significant modifying effect on the associations found, although no account was taken of any recent changes in dietary habits or physical activity.

In the present study, we considered adipose tissue POP concentrations because they have been described as the most appropriate matrix for the estimation of cumulative internal exposure to POPs, accounting for all routes and sources of exposure (Kohlmeier and Kohlmeier, 1995; Quintana et al., 2004). Additionally, adipose tissue POP concentrations have been proven to show less variability in comparison to serum concentrations, which can be influenced by point exposures and by the mobilization of POPs stored in fatty tissues (Gaskins and Schisterman, 2009; Archibeque-Engle et al., 1997; Arrebola et al., 2012a).

Diet, especially of animal origin, has been acknowledged as an important risk factor for CVD (Rees et al., 2013). Although information on dietary habits was available for this cohort at its recruitment (Arrebola et al., 2012b, 2010, 2009), no adjustment for food intake was performed. This decision was taken to avoid an over-adjustment of the models, given that diet is also known to be a main source of POP exposure (Bosch de Basea et al., 2011). We hypothesize that POPs present in lipid-rich food items might be one of the promoters of serum lipid disruption and obesity, conditions that are frequently associated with a high intake of fatty food. As proposed by other researchers, further research is required into the potential interactions between nutrients and environmental pollutants (Schechter et al., 2010).

Our results suggest a potential relationship between historical POP exposure and serum lipids/obesity, complementing previous findings of a higher risk of diabetes in relation to POP exposure in the same cohort (Arrebola et al., 2013b). Although restrictions in the use of the studied POPs over the past few decades have caused a

decline in exposure levels in most countries, continuous human biomonitoring studies are required, because some adverse health outcomes only manifest after long-term exposure (Lee et al., 2011). Although POP concentrations accounted for small relative changes in serum lipid levels, the effect of these associations would be considerable at a population level given the almost universal pollution of humans by POPs (Porta, 2006; Porta and Zumeta, 2002).

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge scientific and technical assistance provided by Richard Davies. Dr J.P. Arrebola is currently receiving a postdoctoral fellowship from the Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales (Junta de Andalucía). This study was supported in part by research grants from the Spanish Ministry of Health (FIS 02/974, EUS2008-03574), CIBER de Epidemiología, and Junta de Andalucía (SAS 01/264, P09-CTS-5488, SAS PI-0675-2010 and PI-0513/2012). The results would not have been achieved without the selfless collaboration of the staff from Santa Ana and San Cecilio Hospitals and the patients who took part in the study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.08.003>.

References

- Aminov, Z., Haase, R.F., Pavuk, M., Carpenter, D.O., 2013. Analysis of the effects of exposure to polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides on serum lipid levels in residents of Anniston, Alabama. *Environ. Health* 12, 108.
- Antweiler, R.C., Taylor, H.E., 2008. Evaluation of statistical treatments of left-censored environmental data using coincident uncensored data sets: I. Summary statistics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3732–3738.
- Archibeque-Engle, S.L., Tessari, J.D., Winn, D.T., Keefe, T.J., Nett, T.M., Zheng, T., 1997. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J. Toxicol. Environ. Health* 52, 285–293.
- Arrebola, J.P., Fernandez, M.F., Olea, N., Ramos, R., Martín-Olmedo, P., 2013a. Human exposure to p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) in urban and semi-rural areas in southeast Spain: a gender perspective. *Sci. Total Environ.* 458–460, 209–216.
- Arrebola, J.P., Fernandez, M.F., Porta, M., Rosell, J., de la Ossa, R.M., Olea, N., Martín-Olmedo, P., 2010. Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ. Int.* 36, 705–713.
- Arrebola, J.P., Martín-Olmedo, P., Fernandez, M.F., Sanchez-Cantalejo, E., Jimenez-Rios, J.A., Torne, P., Porta, M., Olea, N., 2009. Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: a multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ. Int.* 35, 27–32.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Cuellar, M., Quevedo, M., Claire, E., Mejia, L.M., Fernandez-Rodriguez, M., Freire, C., Olea, N., Mercado, L.A., 2012a. Factors influencing combined exposure to three indicator polychlorinated biphenyls in an adult cohort from Bolivia. *Environ. Res.* 116, 17–25.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Rivero, M., Choque, A., Silvestre, S., Olea, N., Ocaña-Riola, R., Mercado, L.A., 2012b. Contribution of sociodemographic characteristics, occupation, diet and lifestyle to DDT and DDE concentrations in serum and adipose tissue from a Bolivian cohort. *Environ. Int.* 38, 54–61.
- Arrebola, J.P., Pumarega, J., Gasull, M., Fernandez, M.F., Martín-Olmedo, P., Molina-Molina, J.M., Fernandez-Rodriguez, M., Porta, M., Olea, N., 2013b. Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ. Res.* 122, 31–37.
- Arsenescu, V., Arsenescu, R.J., King, V., Swanson, H., Cassis, L.A., 2008. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* 116, 761–768.
- Baker Jr., E.L., Landrigan, P.J., Glueck, C.J., Zack Jr., M.M., Liddle, J.A., Burse, V.W., Housworth, W.J., Needham, L.L., 1980. Metabolic consequences of exposure to polychlorinated biphenyls (PCB) in sewage sludge. *Am. J. Epidemiol.* 112, 553–563.

- Bosch de Basea, M., Porta, M., Alguacil, J., Puigdomenech, E., Gasull, M., Garrido, J.A., Lopez, T., 2011. Relationships between occupational history and serum concentrations of organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. *Occup. Environ. Med.* 68, 332–338.
- Branca, F., Nikogosian, H., Lobstein, T., World Health Organization, Regional Office for Europe, 2007. The Challenge of Obesity in the WHO European Region and the Strategies for Response. World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen.
- Brauner, E.V., Raaschou-Nielsen, O., Gaudreau, E., Leblanc, A., Tjonneland, A., Overvad, K., Sorensen, M., 2011. Predictors of polychlorinated biphenyl concentrations in adipose tissue in a general Danish population. *Environ. Sci. Technol.* 45, 679–685.
- Brauner, E.V., Raaschou-Nielsen, O., Gaudreau, E., Leblanc, A., Tjonneland, A., Overvad, K., Sorensen, M., 2012a. Predictors of adipose tissue concentrations of organochlorine pesticides in a general Danish population. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 52–59.
- Brauner, E.V., Sorensen, M., Gaudreau, E., Leblanc, A., Eriksen, K.T., Tjonneland, A., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., 2012b. A prospective study of organochlorines in adipose tissue and risk of nonHodgkin lymphoma. *Environ. Health Perspect.* 120, 105–111.
- Chase, K.H., Wong, O., Thomas, D., Berney, B.W., Simon, R.K., 1982. Clinical and metabolic abnormalities associated with occupational exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs). *J. Occup. Med.* 24, 109–114.
- Choi, W., Eum, S.Y., Lee, Y.W., Hennig, B., Robertson, L.W., Toborek, M., 2003. PCB 104-induced proinflammatory reactions in human vascular endothelial cells: relationship to cancer metastasis and atherogenesis. *Toxicol. Sci.* 75, 47–56.
- Croucher, C.R., Lebofsky, M., Schramm, K.W., Terranova, P.F., Rozman, K.K., 2005. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) alter body weight by decreasing insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling. *Toxicol. Sci.* 85, 560–571.
- Daglioglu, N., Gulmen, M.K., Akcan, R., Efeoglu, P., Yener, F., Unal, I., 2010. Determination of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Cukurova, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 97–102.
- Fox, J., 2008. Applied regression analysis and generalized linear models. Sage Publications Inc, California.
- Gaskins, A.J., Schisterman, E.F., 2009. The effect of lipid adjustment on the analysis of environmental contaminants and the outcome of human health risks. *Methods Mol. Biol.* 580, 371–381.
- Goncharov, A., Haase, R.F., Santiago-Rivera, A., Morse, G., McCaffrey, R.J., Rej, R., Carpenter, D.O., 2008. High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a Native American population. *Environ. Res.* 106, 226–239.
- Grun, F., Blumberg, B., 2007. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 161–171.
- Grun, F., Blumberg, B., 2009a. Endocrine disrupters as obesogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 19–29.
- Grun, F., Blumberg, B., 2009b. Minireview: the case for obesogens. *Mol. Endocrinol.* 23, 1127–1134.
- Greenland, S., 1989. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am. J. Public Health* 79, 340–349.
- Heindel, J.J., vom Saal, F.S., 2009. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 90–96.
- Hennig, B., Meerarani, P., Slim, R., Toborek, M., Daugherty, A., Silverstone, A.E., Robertson, L.W., 2002. Proinflammatory properties of coplanar PCBs: in vitro and in vivo evidence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 181, 174–183.
- Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
- Kohlmeier, L., Kohlmeier, M., 1995. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 3), 99–106.
- Kreiss, K., Zack, M.M., Kimbrough, R.D., Needham, L.L., Smrek, A.L., Jones, B.T., 1981. Association of blood pressure and polychlorinated biphenyl levels. *JAMA* 245, 2505–2509.
- Lee, D.H., Steffes, M.W., Sjoдин, A., Jones, R.S., Needham, L.L., Jacobs Jr., D.R., 2010. Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case-control study. *Environ. Health Perspect.* 118, 1235–1242.
- Lee, D.H., Steffes, M.W., Sjoдин, A., Jones, R.S., Needham, L.L., Jacobs Jr., D.R., 2011. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS One* 6, e15977.
- Martinez Vidal, J.L., Moreno, F.M., Garrido, F.A., Olea-Serrano, F., Olea, N., 2002. Determination of endocrine-disrupting pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum by GC-ECD and GC-MS-MS and evaluation of contributions to the uncertainty of the results. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 766–775.
- McAllister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C., Elobeid, M., Fontaine, K.R., Gluckman, P., Hanlon, E.C., Katzmarzyk, P., Pietrobelli, A., Redden, D.T., Ruden, D.M., Wang, C., Waterland, R.A., Wright, S.M., Allison, D.B., 2009. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 868–913.
- Medlock, K.L., Lyttle, C.R., Kelepouris, N., Newman, E.D., Sheehan, D.M., 1991. Estradiol down-regulation of the rat uterine estrogen receptor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196, 293–300.
- Meigs, J.B., 2000. Invited commentary: insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am. J. Epidemiol.* 152, 908–911.
- Mickey, R.M., Greenland, S., 1989. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am. J. Epidemiol.* 129, 125–137.
- Moreno-Frias, M., Jimenez, T.M., Garrido, F.A., Martinez Vidal, J.L., Olea-Serrano, F., Olea, N., 2004. Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.* 18, 102–111.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W.N., 2009. Environmental estrogens and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 84–89.
- Orton, F., Ermiler, S., Kugathas, S., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2014. Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278 (3), 201–208.
- Payne, J., Rajapakse, N., Wilkins, M., Kortenkamp, A., 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 108, 983–987.
- Payne, J., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2001. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ. Health Perspect.* 109, 391–397.
- Phillips, D.L., Pirke, J.L., Burse, V.W., Bernert Jr., J.T., Henderson, L.O., Needham, L.L., 1989. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 495–500.
- Porta, M., 2006. Persistent organic pollutants and the burden of diabetes. *Lancet* 368, 558–559.
- Porta, M., Puigdomenech, E., Ballester, F., Selva, J., Ribas-Fito, N., Llop, S., Lopez, T., 2008. Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience. *Environ. Int.* 34, 546–561.
- Porta, M., Zumeta, E., 2002. Implementing the Stockholm treaty on persistent organic pollutants. *Occup. Environ. Med.* 59, 651–652.
- Quintana, P.J., Delfino, R.J., Korrick, S., Ziogas, A., Kutz, F.W., Jones, E.L., Laden, F., Garshick, E., 2004. Adipose tissue levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Environ. Health Perspect.* 112, 854–861.
- Rajapakse, N., Silva, E., Kortenkamp, A., 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* 110, 917–921.
- Rees, K., Dyakova, M., Wilson, N., Ward, K., Thorogood, M., Brunner, E., 2013. Dietary advice for reducing cardiovascular risk. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12, CD002128.
- Regidor, E., Gutiérrez-Fisac, J.L., 2013. Mortality Patterns in Spain, 2010. Ministry of Health, S.S.a.E.
- Regidor, E., 2001. The goldthorpe social class Classification: reference framework for a proposal for the measurement of social class by the working group of the Spanish society of Epidemiology. *Rev. Esp. Salud Publica* 75, 13–22.
- Rivas, A., Fernandez, M.F., Cerrillo, I., Ibarluzea, J., Olea-Serrano, M.F., Pedraza, V., Olea, N., 2001. Human exposure to endocrine disrupters: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 109, 185–197.
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Look, E.J., Lillefosse, H., Ma, T., Perentis, S., Sonne, S.B., Marstrand, T.T., Malde, M.K., Du, Z.Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundbye, A.K., Brand, C.L., Vidal, H., Kristiansen, K., Froyland, L., 2010. Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environ. Health Perspect.* 118, 465–471.
- Schecter, A., Colacino, J., Haffner, D., Patel, K., Opel, M., Papke, O., Birnbaum, L., 2010. Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. *Environ. Health Perspect.* 118, 796–802.
- Sharpe, R.M., Drake, A.J., 2013. Obesogens and obesity—an alternative view? *Obesity* 21 (Silver Spring), 1081–1083.
- Shen, S.W., Reaven, G.M., Farquhar, J.W., 1970. Comparison of impedance to insulin-mediated glucose uptake in normal subjects and in subjects with latent diabetes. *J. Clin. Invest.* 49, 2151–2160.
- Tokunaga, S., Kataoka, K., 2003. A longitudinal analysis on the association of serum lipids and lipoproteins concentrations with blood polychlorinated biphenyls level in chronic "Yusho" patients. *Fukuoka Igaku Zasshi* 94, 110–117.
- UNEP, 2003. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Mediterranean Regional Report. United Nations Environment Programme on Chemicals (last accessed 01.05.14.) www.chem.unep.ch/pts/regreports/mediterranean.pdf
- Vaclavik, E., Tjonneland, A., Stripp, C., Overvad, K., Weber, J., Raaschou-Nielsen, O., 2006. Organochlorines in Danish women: predictors of adipose tissue concentrations. *Environ. Res.* 100, 362–370.
- Wolff, M.S., Zeleniuch-Jacquotte, A., Dubin, N., Toniolo, P., 2000. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 9, 271–277.
- Wolff, M.S., Anderson, H.A., Britton, J.A., Rothman, N., 2007. Pharmacokinetic variability and modern epidemiology — the example of dichlorodiphenyltrichloroethane, body mass index, and birth cohort. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 16, 1925–1930.
- Yu, G.W., Laseter, J., Mylander, C., 2011. 2011 Persistent organic pollutants in serum and several different fat compartments in humans. *J. Environ. Public Health*, 417980.
- Zeliger, H.L., 2003. Toxic effects of chemical mixtures. *Arch. Environ. Health* 58, 23–29.
- Zeliger, H.L., 2013. Lipophilic chemical exposure as a cause of cardiovascular disease. *Interdiscip. Toxicol.* 6, 55–62.

Discusión

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que la exposición a bajas concentraciones de COPs, acumuladas de forma progresiva a lo largo de la vida, durante largos períodos de tiempo, podría estar relacionada con alteraciones en el metabolismo lipídico de los individuos expuestos, así como con su grado de obesidad. La mayoría de las asociaciones encontradas en este estudio siguieron un patrón no lineal, con unas curvas de regresión que mostraban pendientes positivas a niveles bajos de exposición, pero que disminuían o incluso se convirtieron en negativas en los niveles de exposición más altos. Lee et al. y colaboradores (2010) también constataron asociaciones no lineales similares a las encontradas por nuestro equipo, argumentando que los receptores hormonales muestran una relación dosis-respuesta lineal hasta el 10% de ocupación de receptores, pero que esta respuesta podría ser, incluso, inhibida por niveles de exposición más altos (Medlock et al., 1991). El mismo equipo de investigación también encontró asociaciones en forma de U invertida entre la exposición a COPs en suero y los niveles de triglicéridos séricos y el IMC, en una muestra de 90 individuos de cohorte CARDIA (Lee et al., 2011b).

Comportamientos paradójicos en la relación dosis respuesta también se han descrito en ensayos *in vitro* con otros COPs. Por ejemplo, el PCB-77 y TCDD que a bajas concentraciones dan lugar a un aumento del tamaño celular en cultivos de adipocitos, un incremento de la actividad de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y una estimulación de la expresión del receptor γ activado por el factor de proliferación de peroxisomas (PPAR- γ), están desprovistos de actividad a concentraciones más altas, no ejerciendo ningún efecto proliferativo sobre los adipocitos (Arsenescu et al., 2008). En otro estudio que empleó cultivos de adipocitos, demostró que tan solo las dosis bajas, y no a altas, del PCB-77 inducen la liberación de moléculas inflamatorias (Croutch et al., 2005).

Es importante señalar que todos los COPs incluidos en este trabajo mostraron correlaciones positivas entre ellos, con coeficientes de Spearman que oscilaron entre 0,2 y 0,9. Por lo tanto, las asociaciones encontradas para los compuestos químicos individuales pueden ser sustitutos de exposición a otros agentes con características fisicoquímicas similares (Arrebola et al., 2013b). También debe ser tenido en cuenta

que los individuos están expuestos a mezclas complejas de contaminantes ambientales, lo que representa una situación que añade dificultades a la interpretación de los resultados, y que justifica, por si misma, la observación de efectos adversos cuando la exposición ocurre a mezclas de sustancias químicas a niveles de concentración individual por debajo de su nivel sin efecto adverso observado NOAEL (Orton et al., 2013;Payne et al., 2001;Rajapakse et al., 2002).

Posibles limitaciones de este estudio incluyen su diseño transversal, que impide descartar completamente una causalidad inversa en los resultados. Sin embargo, la asociación COPs - lípidos séricos parece ser más plausible, ya que un aumento de los lípidos séricos no necesariamente resultaría en una acumulación superior de COPs en el tejido adiposo. El sentido de esta asociación ha sido confirmada por otros autores en estudios prospectivos (Goncharov et al., 2008;Lee et al., 2010). El tejido adiposo es reconocido como el depósito principal COPs en los seres humanos, y se espera que las personas obesas acumulen grandes cantidades a través de su dieta. A este respecto, el efecto potencial de dilución de grandes cantidades de tejido adiposo en las personas más obesas puede explicar por qué el IMC no aumenta linealmente con las concentraciones de COPs en la mayoría de los modelos actuales, como también explicaron Wolff y colaboradores. (2000). Sin embargo, los hallazgos de la asociación de las concentraciones de COPs con el IMC han sido contradictorios en la bibliografía consultada, probablemente debido a las diferencias en los diseños de estudio y poblaciones estudiadas (Arrebola et al., 2012c;Brauner et al., 2012b;Daglioglu et al., 2010;Vaclavik E. et al., 2006). En este sentido, Wolff y colaboradores (2007) describieron un modelo farmaco-cinético en el que podría esperarse una relación positiva entre las dos variables si las muestras biológicas eran recolectadas a más de diez años tras el pico de exposición porque, aunque hay un efecto de dilución de la grasa corporal, los COPs tienen vidas medias más prolongadas en obesos que en personas delgadas.

Una explicación alternativa de estos hallazgos paradójicos podría ser que las personas con lípidos séricos elevados o con un IMC alto (resultantes, al menos parcialmente, de una mayor exposición a COPs), podrían haber tomado medidas para reducir estos niveles, por ejemplo, tratamiento farmacológico, dieta especial, o ejercicio físico. En estas personas por lo tanto, se evidenciarían niveles de obesidad o lípidos séricos que no

corresponden a su exposición a COPs. Esto es especialmente probable en la población de estudio del presente trabajo, ya que fue reclutada en entorno hospitalario y, por tanto, sería muy probable que hubieran recibido asesoramiento médico al respecto. Sin embargo, en nuestra población no se observó un papel significativo de la toma o no de tratamientos hipolipemiantes como modificador del efecto de las asociaciones encontradas, aunque no se tuvo en cuenta los cambios recientes en hábitos dietéticos o la actividad física. La falta de significación estadística en el término de interacción entre las concentraciones de COPs y el tratamiento hipolipemiante también podría estar relacionada con otros factores como el empleo de las concentraciones de COPs de tejido adiposo (más indicativo de una exposición histórica) en lugar de suero, el pequeño número de participantes que recibían tratamiento ($n = 27$), y el hecho de no haber tenido en cuenta la duración del tratamiento.

Para los análisis estadísticos se usaron las concentraciones de COPs en tejido adiposo debido a que se ha descrito como la matriz más apropiada para la estimación de la exposición interna acumulada de COPs, representado todas las rutas y fuentes de exposición (Kohlmeier and Kohlmeier, 1995; Quintana et al., 2004). Además, las concentraciones de COPs en tejido adiposo muestran una menor variabilidad en comparación con las concentraciones en suero, que pueden ser influidas por exposiciones puntuales y por la movilización de los COPs almacenados en tejidos grasos (Archibeque-Engle et al., 1997; Gaskins and Schisterman, 2009).

La dieta, especialmente de origen animal, ha sido reconocida como un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares (Rees et al., 2013). Aunque la información en los hábitos dietéticos de la cohorte GraMo estaba disponible en su reclutamiento (Arrebola et al., 2010; Arrebola et al., 2009; Arrebola et al., 2012c), los análisis se realizaron sin ajustar por ingesta de alimentos para evitar un sobre-ajuste de los modelos, dado que la dieta también es conocida por ser una de las principales fuentes de exposición a COPs (Bosch de Basea et al., 2011). La hipótesis que planteamos es que los COPs presentes en los alimentos ricos en lípidos podrían ser unos de los promotores de las alteraciones en los lípidos séricos y la obesidad. Ambas situaciones suelen asociarse con un elevado consumo de alimentos grasos. Tal y como ha sido propuesto por otros investigadores, es necesaria más investigación sobre las

posibles interacciones entre nutrientes y contaminantes ambientales (Schechter et al., 2010).

7.4 Concentraciones de compuestos orgánicos persistentes en tejido adiposo y prevalencia de diabetes tipo 2 en población adulta del Sudeste español (objetivo 4)

En el año 2000, la prevalencia mundial de diabetes tipo 2 fue del 2,8%, y se estima que en el año 2030 alcanzará el 4,4%. Esta tendencia alcista ha sido relacionada tanto con factores genéticos como ambientales. Sin embargo, se estima que sólo el 6% de la diabetes tipo 2 podría explicarse por factores hereditarios, por lo que hábitos y exposiciones juegan tienen que jugar un papel relevante en la prevalencia de esta enfermedad. Recientes estudios científicos han advertido que la exposición a COPs, puede asociarse con un mayor riesgo de diabetes tipo 2 y se han descrito algunos modificadores potenciales de la asociación entre los COPs y la diabetes, incluyendo el sexo y la obesidad y aunque se ha evidenciado que algunos COPs pueden alterar la función de las células beta pancreáticas, no hay resultados concluyentes al respecto y se requiere más investigación en estas cuestiones.

Resumen

Existe una evidencia creciente de que los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Varios COPs son sospechosos de contribuir al aumento de la prevalencia y el riesgo de diabetes tipo 2. El objetivo de este estudio fue investigar la asociación de la carga corporal de tres plaguicidas organoclorados y tres PCBs, y la actividad estrogénica en general con el riesgo de diabetes tipo 2 en una muestra de adultos del sur de España.

Se obtuvieron muestras de tejido adiposo y suero de 386 sujetos sometidos a cirugía no relacionada con cáncer y se extrajeron utilizando metodologías validadas. Los residuos de COPs se analizaron mediante cromatografía de gases de alta resolución con un detector de espectrometría de masas en modo tándem. La estrogénicidad general de los extractos de tejido adiposo se midió mediante el uso del biomarcador de la carga total xenoestrógena efectiva (TEXB). Los datos sobre el estilo de vida, hábitos alimentarios y el estado de salud se obtuvieron de entrevistas personales y la historia clínica. Los análisis estadísticos se realizaron con regresión logística y diferentes niveles de ajuste.

En los modelos ajustados por origen del tejido adiposo, sexo, edad y el índice de masa corporal, el segundo y tercer tercil de las concentraciones en tejido adiposo de p , p

'diclorodifenildicloroetileno (*p*, *p'*-DDE) se asociaron positivamente con el riesgo de diabetes [odds ratio (intervalo de confianza del 95%) = 3,6 (0,8 a 17,3) y 4,4 (1,0-21,0), respectivamente]. Una asociación positiva con β -hexaclorociclohexano también se encontró cuando se eliminaron índice de masa corporal y origen del tejido adiposo de los modelos, con odds ratio (intervalo de confianza del 95%) de 3,3 (1,0 a 10,4) y 5,5 (1,7 a 17,3), para el segundo y tercer tercil de la exposición, respectivamente. Además, se observó una interacción estadísticamente significativa entre *p*, *p'*-DDE y el índice de masa corporal, de tal manera que el riesgo de diabetes aumenta con terciles de la exposición de manera lineal en sujetos no obesos, pero no en los obesos, en los que se observó un patrón de forma de U invertida.

Arrebola JP, Pumarega J, Gasull M, Fernandez MF, Martin-Olmedo P, Molina-Molina JM, Fernandez-Rodriguez M, Porta M, Olea N. Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ Res* 2013; 122: 31-37.

Factor de impacto 2014: 4,373 (Primer decil)



Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain

Juan P. Arrebola^{a,*}, José Pumarega^{b,c}, Magda Gasull^{b,c}, Mariana F. Fernandez^{a,b}, Piedad Martín-Olmedo^{b,d}, José M. Molina-Molina^{a,b}, María Fernández-Rodríguez^a, Miquel Porta^{b,c,e}, Nicolás Olea^{a,b}

^a Laboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital, University of Granada, 18071 Granada, Spain

^b CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

^c Hospital del Mar Research Institute-IMIM, Barcelona, Spain

^d Escuela Andaluza de Salud Pública, Campus Universitario de Cartuja, Cuesta del Observatorio, 4, Apdo. de Correos 2070, 18080 Granada, Spain

^e School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2012

Received in revised form

28 November 2012

Accepted 3 December 2012

Available online 3 January 2013

Keywords:

Persistent organic pollutant

Diabetes

Adipose tissue

Serum

p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene

ABSTRACT

There is increasing evidence that environmental factors play an important role in the development of type 2 diabetes. Several persistent organic pollutants are suspected to contribute to the increasing prevalence and risk of type 2 diabetes. The aim of this study was to investigate the association of the body burden of three organochlorine pesticides and three polychlorinated biphenyls and the overall estrogenic activity with the risk of type 2 diabetes in a sample of adults from Southern Spain.

Samples of adipose tissue and serum were obtained from 386 subjects undergoing non-cancer-related surgery and were extracted using validated methodologies. Residues of persistent organic pollutants were analyzed by means of high-resolution gas chromatography with a mass spectrometry detector in tandem mode. The overall estrogenicity of the adipose tissue extracts was measured by using the total effective xenoestrogen burden (TEXB) biomarker. Data on lifestyle, dietary habits, and health status were gathered from face-to-face interviews and clinical records. Statistical analyses were performed with unconditional logistic regression and different adjustment levels.

In the models adjusted for adipose tissue origin, sex, age, and body mass index, the 2nd and 3rd tertiles of adipose tissue concentrations of *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) were positively associated with the risk of diabetes [odds ratios (95% confidence interval)=3.6 (0.8–17.3) and 4.4 (1.0–21.0), respectively]. A positive association with β -hexachlorocyclohexane was also found when body mass index and adipose tissue origin were removed from the models, with odds ratios (95% confidence interval) of 3.3 (1.0–10.4) and 5.5 (1.7–17.3), for the 2nd and 3rd tertiles of exposure, respectively. In addition, a statistically significant interaction was observed between *p,p'*-DDE and body mass index, such that the risk of diabetes increased with tertiles of exposure in a linear manner in non-obese subjects but not in the obese, in whom an inverted U-shape pattern was observed.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 diabetes is a metabolic disorder characterized by elevated blood glucose due to decreased insulin sensitivity in peripheral tissues, and it usually starts in adulthood. Reported risk

factors for diabetes include obesity, sedentary lifestyle, diet, family history, race/ethnicity, age, impaired fasting glucose, high blood pressure, low high-density lipoprotein, and high triglycerides (Tuomi, 2005). The prevalence of type 2 diabetes worldwide was 2.8% in 2000 and is estimated to reach 4.4% in 2030 (Wild et al., 2004). This increasing trend has been attributed to the conjunction of genetic and environmental factors (Das, 2010). Considering that only 6% of type 2 diabetes can be explained by heritable factors (Manolio et al., 2009), environmental factors may have a major contribution to the increasing incidence of this disease (Patel et al., 2010).

Persistent organic pollutants (POPs) are highly lipophilic chemicals that tend to accumulate and biomagnify in food chains, resulting in considerable exposure of living organisms (UNEP, 2003). POPs include organochlorine pesticides (OCPs), which have

Abbreviations: POP, Persistent organic pollutant; PCB, Polychlorinated biphenyl; OCP, Organochlorine pesticide; IRS-2, Insulin receptor substrate 2; TEXB, Total effective xenoestrogen burden; BMI, Body mass index; LD, Limit of detection; DDE, Dichlorodiphenyldichloroethylene; DDT, Dichlorodiphenyltrichloroethane; HCB, Hexachlorobenzene; β -HCH, β -hexachlorocyclohexane; 95% CI, 95% Confidence interval; Eq, Estradiol equivalents; HPLC, High performance liquid chromatography; OR, Odds ratio

* Corresponding author. Fax: +34 958 249953.

E-mail address: jparrebola@ugr.es (J.P. Arrebola).

0013-9351/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2012.12.001>

long been widely used in agriculture and public health as highly effective pest control agents (UNEP, 2003). POPs also include polychlorinated biphenyls (PCBs), used worldwide in numerous industrial and commercial applications. POPs have been detected in virtually all human populations and environmental matrices, and diet (especially fatty food) has been reported to be the main route for human exposure (Brauner et al., 2011).

Scientific studies have warned that not only high but also low level exposures to POPs may have adverse health effects, including an increased risk of type 2 diabetes (Porta, 2006). Potential modifiers of the association between POPs and diabetes have also been described, including gender and obesity (Lee et al., 2006). In addition, some POPs have been found to influence beta-cell function (Hectors et al., 2011). Beta-cell apoptosis has been implicated in the development of diabetes, probably through an inhibition of the insulin receptor substrate 2, a protein that promotes beta-cell growth and survival (Rhodes, 2005). However, no conclusive results have been published and further research is required on these issues.

Some POPs have been found to be xenoestrogens, i.e., exogenous substances or mixtures with the ability to disrupt hormonal homeostasis via interaction with estrogen receptors. Humans are exposed to complex mixtures of POPs, hampering the establishment of associations between body concentrations of single POPs and health outcomes, possibly attributable to agonistic, antagonistic, and synergistic interactions among the pollutants (Kortenkamp, 2006). Biomarkers of exposure that take account of the combined effect of mixtures of pollutants have emerged as reliable markers to assess human health effects and environmental factors. For instance, our group has successfully applied the total effective xenoestrogen burden (TEXB), a bioassay for measuring the estrogenicity of mixtures of xenoestrogens in the organism, finding interesting associations with breast cancer, urogenital malformations, and body weight at birth (Fernandez et al., 2004, 2007; Ibarluzea et al., 2004; Vilahur et al., in press).

The aim of the present study was to investigate the association of the body burden of three OCPs and three indicator-PCBs and the TEXB levels with the prevalence of type 2 diabetes in a sample of adults from Southern Spain.

2. Material and methods

2.1. Study population

The present research is part of a hospital-based cross-sectional study that characterized the exposure to POPs of an adult cohort from Southern Spain. The study design, recruitment, and methods have been extensively described elsewhere (Arrebola et al., 2010, 2009). In brief, Granada province covers an area of 12 635 km² in Southern Spain. Study subjects were recruited in two public hospitals, San Cecilio University Hospital in the city of Granada (240 000 inhabitants) and Santa Ana Hospital in the town of Motril (50 000 inhabitants).

Study participants were recruited between July 2003 and June 2004 among patients undergoing non-cancer-related surgery (47% inguinal hernia or abdominal surgery, 17% gall bladder surgery, 12% varicose vein surgery, and 24% other surgery). Inclusion criteria were: age over 16 years, absence of cancer, not undergoing hormone therapy, and residence in one of the study areas for ≥ 10 years. All subjects signed their informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee of each hospital. Out of 409 subjects who were contacted, 387 agreed to participate; one subject was excluded for lack of data on history of diabetes, leaving a final study sample of 386 (94.6%) subjects. No statistical differences in sex and age were found between participants and non-participants. The characteristics of the study population are summarized in Table 1.

2.2. Independent variables

Data on socio-demographic characteristics, lifestyle, dietary habits, and health status were gathered in face-to-face interviews conducted by trained personnel during the hospital stay. Questionnaires and research procedures were standardized

and validated in a pilot study with 50 subjects. The prevalence of diabetes was assessed using both self-reported information and clinical records. A subject was considered to have type 2 diabetes if he/she answered "yes" to the following question: "Have you ever been diagnosed with diabetes by a clinician?". Additionally, we reviewed the clinical records, where any subject showing a fasting glucose level ≥ 126 mg/dL in the routine analyses prior the surgery is registered as diabetic. No discrepancies were found between the self-reported prevalence of diabetes and the data reported in the clinical records. Body mass index (BMI) was expressed as weight/height squared (kg/m²). Subjects were considered alcohol consumers when they reported alcohol intake at least once a week. A subject was considered a smoker (past or present) with any level of daily tobacco consumption (≥ 1 cig/day).

2.3. Sampling and chemical analyses

During surgery, samples of 5–10 g adipose tissue and 10 mL serum were collected, immediately coded, and stored at -80 °C until chemical analysis; 200 mg of adipose tissue was extracted using *n*-hexane, and the solution was then purified through 2 g alumina in a glass column (Rivas et al., 2001). From each serum sample, 4 mL was extracted with acidified diethyl ether and *n*-hexane, and the cleaned-up extract was eluted through a solid phase silica extraction column (Sep Pack, Waters) (Martínez Vidal et al., 2002). All extracts were stored in glass tubes at -80 °C.

POPs were quantified by high-resolution gas chromatography with a mass spectrometry detector in tandem mode, using a system Saturn 2000 ion trap (Varian, Walnut Creek, CA). For the analysis, we used a 2 m \times 0.25 mm silica capillary column (Bellefonte, PA) coupled with a 30 m \times 0.25 mm analytical column (Factor FOUR VF-5MS, Varian Inc., Walnut Creek, CA). For all measured POPs, the limit of detection and limit of quantification were set at 0.01 μ g/L and 4 μ g/L, respectively. Chromatographic concentrations below the limit of detection were assigned a random value between 0 and the limit of detection. In adipose tissue, residues of *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE, the main metabolite of the pesticide dichlorodiphenyltrichloroethane [DDT]), hexachlorobenzene (HCB), β -hexachlorocyclohexane (β -HCH), and PCB congeners -138, -153 and -180 were quantified. Serum *p,p'*-DDE concentrations were also analyzed. Recoveries of the POPs from adipose tissue and serum were studied to assess the extraction efficiency of the methods used, spiking 10 blank samples with target analytes at an intermediate point on the calibration curve and processing as described above. Recoveries ranged from 90 to 98%.

In adipose tissue samples, lipid content was quantified gravimetrically as reported by Rivas et al. (2001), including a homogenization step of 100 mg adipose tissue with 5 mL of chloroform:methanol:hydrochloric acid (20:10:0.1) and acidification with hydrochloric acid 0.1 N before collecting and weighting the organic phase.

Total lipids in serum were calculated using the standard short formula of Phillips et al. (1989), based on total cholesterol and triglyceride levels enzymatically quantified in 10 μ L of the same sample used for the POP quantification.

In adipose tissue, lipid-basis concentrations were calculated by dividing the crude adipose tissue concentrations by the total lipid content and were expressed in nanograms per gram lipid (ng/g lipid). In serum samples, crude concentrations of POPs were individually standardized for serum total lipids and expressed in ng/g lipid.

A double-blinded procedure was followed so that neither the chemical analysts nor statistical staff knew the identity of any study subject.

2.4. Total effective xenoestrogen burden (TEXB)

In order to calculate the overall estrogenicity of the adipose tissue extracts, samples were tested in the E-Screen bioassay, which measures the proliferative effect of xenoestrogens on MCF-7 breast cancer cells by comparing cell yield between cultures of MCF-7 human breast cancer cells treated with estradiol and those treated with different concentrations of xenobiotics or extracts (Soto et al., 1992). Each adipose tissue dried extract was resuspended in 5 mL Dulbecco's modified Eagle's medium without phenol red, supplemented with 10% charcoal dextran-treated human serum, and was tested in the E-Screen bioassay for estrogenicity at dilutions of 1:1, 1:5, and 1:10, using a slight modification of the originally described technique. Each sample was assayed in triplicate with a negative (vehicle) and positive (estradiol) control in each plate. The proliferative effect of the adipose tissue extract was referred to the maximal effect obtained with estradiol, transformed into estradiol equivalents (Eq) units by reading from a dose-response curve, and expressed in Eq units per gram of lipid.

In the present study, we quantified the estrogenicity of the whole adipose tissue extract, whereas previous studies of the TEXB in biological samples have measured the estrogenicity of two fractions of each extract, collected using a preparative normal-phase high performance liquid chromatography protocol: the alpha-fraction, which includes non-polar xenoestrogens (e.g., OCPs and PCBs); and the beta-fraction, which contains more polar xenoestrogens, sex steroids, and pharmaceutical estrogens (Fernandez et al., 2004). For the present study, no high performance liquid chromatography fractionation was performed and the overall estrogenicity of the whole extract was designated as TEXB-extract. We previously reported that the TEXB-extract yields information about the overall estrogenicity to which humans are exposed and may be useful to assess its potential contribution to health outcomes (Arrebola et al., 2012a).

Table 1
Main characteristics of the study subjects by diabetes status.

Characteristic	Total N (%)	Type-II diabetes mellitus		P
		No N (%)	Yes N (%)	
Total	386 (100)	352 (91.2)	34 (8.8)	
Age (years)				
Median	52.0	50.0	62.5	< 0.001 ^a
Sex (males)	197 (51.0)	181 (51.4)	16 (47.1)	0.720 ^b
Body mass index (kg/m²)				
Median	26.6	26.4	28.7	0.014 ^a
Underweight (< 18.5)	6 (1.6)	6 (1.8)	0 (0.0)	0.252 ^b
Normal range (18.5–24.9)	122 (33.5)	114 (34.5)	8 (23.5)	
Overweight (25.0–29.9)	156 (42.5)	141 (42.3)	15 (44.1)	
Obese (≥ 30)	82 (22.3)	71 (21.3)	11 (32.4)	
Alcohol consumer (yes)	200 (51.7)	189 (53.7)	11 (32.4)	0.014 ^b
Smoker (yes)	126 (32.7)	122 (34.8)	4 (11.8)	0.007 ^b
PCB-138 (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	38.4 (8.6)	35.4 (9.1)	87.2 (3.4)	0.009 ^a
Min–Max	0.0–564.1	0.0–564.1	1.3–343.5	
Percentiles 10–90	0.9–201.2	0.7–190.5	14.2–285.2	
PCB-153 (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	161.5 (4.4)	152.0 (4.6)	304.2 (1.8)	0.001 ^a
Min–Max	0.1–1519.5	0.1–1519.5	67.9–925.4	
Percentiles 10–90	62.3–505.7	48.5–491.3	158.1–579.9	
PCB-180 (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	111.7 (6.3)	104.0 (6.7)	232.5 (2.0)	0.003 ^a
Min–Max	0.0–1363.2	0.0–1363.2	30.4–635.3	
Percentiles 10–90	21.7–427.6	1.2–415.9	92.7–483.2	
HCB (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	11.1 (6.5)	10.1 (6.6)	28.6 (4.4)	< 0.001 ^a
Min–Max	0.0–395.4	0.0–395.4	0.1–185.0	
Percentiles 10–90	1.7–73.7	1.4–64.8	4.6–150.9	
β-HCH (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	6.6 (6.6)	6.0 (6.8)	18.15 (3.2)	0.001 ^a
Min–Max	0.0–211.9	0.0–211.9	0.9–195.1	
Percentiles 10–90	0.3–38.9	0.3–36.2	4.7–86.9	
p,p'-DDE (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	80.6 (3.9)	73.7 (3.9)	199.5 (2.8)	< 0.001 ^a
Min–Max	1.0–2331.4	1.0–2331.4	13.6–2260.3	
Percentiles 10–90	13.5–409.6	13.2–382.9	58.5–539.2	
p,p'-DDE in serum (ng/g of lipid)				
GM (GSD)	159.5 (3.7)	152.5 (3.7)	243.2 (3.5)	0.008 ^a
Min–Max	1.1–2330.2	1.1–2330.2	1.5–1739.1	
Percentiles 10–90	58.9–586.4	58.0–547.4	101.4–710.8	
TEXB-extract (pM Eq/g lipid)				
GM (GSD)	160.0 (2.4)	162.2 (2.4)	138.3 (2.6)	0.442 ^a
Min–Max	11.3–1652.4	11.3–1652.4	12.5–857.8	
Percentiles 10–90	55.0–520.4	55.6–542.4	47.6–475.7	

GM: Geometric mean; GSD: Geometric standard deviation.

^a Mann–Whitney's U-test.

^b Fisher's exact test; for BMI, excluding "underweight" (only excluded in this analysis and not in subsequent tables).

2.5. Statistical methods

The descriptive analysis included the calculation of medians, geometric means, geometric standard deviations and of percentiles for the interval variables and percentages for the categorical variables. Σ PCBs and Σ POPs were computed as the sum of individual adipose tissue concentrations of the three PCB congeners (–138, –153 and –180) and all six POPs (p,p'-DDE, HCB, β-HCH, and PCBs –138, –153, and –180), respectively.

Mann–Whitney's U-test was used to compare quantitative variables. Fisher's exact test for homogeneity or independence was applied to assess the relationship between two categorical variables, and tendencies were evaluated with Mantel–Haenszel's chi-square test for linear trend. Spearman's rank and Pearson's correlation coefficients were used to evaluate linear correlations between pairs of POPs and between POPs and TEXB-extract levels. To estimate the magnitude of the associations between POPs and diabetes, multivariate-adjusted odds ratios

(ORs) and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated by unconditional logistic regression. Tertiles of POP concentrations and TEXB values were calculated and used as independent variable in the models. Several models were built using different levels of adjustment for potential confounders: adipose tissue origin (abdominal wall, pelvic waist, and others), sex, age, and BMI. Log-transformed POP concentrations and TEXB values were also calculated and tested in the models as continuous variables.

The level of statistical significance was set at 0.05, and all tests were two-tailed. Statistical analyses were performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

3. Results

Out of the 386 adults enrolled in this study, 34 (8.8%) were diagnosed with type 2 diabetes (Table 1). Subjects with diabetes

had significantly higher age and BMI, significantly lower alcohol and tobacco consumption, and significantly higher concentrations of all chemicals measured in comparison to the subjects without diabetes (Table 1). The “underweight” group was excluded in this first analysis, although not in the multivariate models, because of the small number of participants in this category. Geometric mean POP concentrations ranged from 6.6 ng/g lipid (β -HCH) to 161.5 (PCB-153) in the whole sample (Table 1). Frequencies of detection in adipose tissue were 92% (PCB-153), 90% (PCB-180), 86% (PCB-138), 91% (HCB), 100% (*p,p'*-DDE), and 84% (β -HCH). Serum *p,p'*-DDE was detected in 94% of the samples. All POPs showed statistically significant positive correlations between them, with Spearman coefficients ranging from 0.2 to 0.9 (data not shown).

In the unadjusted models, diabetes showed a statistically significant association with the adipose tissue and serum concentrations of all POPs measured but not with TEXB-extract values (Table 2). However, when models were further adjusted for sex, age, BMI, and tissue origin, only adipose tissue *p,p'*-DDE remained significantly associated with diabetes, with ORs (95% CI) for the 2nd and 3rd tertiles of 3.6 (0.8–17.3) and 4.44 (1.0–21.02), respectively (*p*-trend=0.070). A positive association with β -HCH was also found when body mass index and adipose tissue origin were removed from the models, with observed odds ratios (95% confidence interval) of 3.3 (1.0–10.4) and 5.5 (1.7–17.3), for the 2nd and 3rd tertiles of exposure, respectively. All models were tested with and without lipid-standardization of POP concentrations and no significant differences were observed in the results, even when total lipid content was introduced as a covariate in the models without lipid adjusted concentrations. Therefore, results are only shown for lipid-corrected concentrations. Models using the log-transformed concentrations as continuous variables showed similar positive associations at all levels of adjustment.

Fig. 1 shows the ORs for diabetes of the adipose tissue *p,p'*-DDE tertiles for two levels of BMI. In subjects with BMI < 30 kg/m², the risk of diabetes increased with tertiles of exposure in a linear manner. However, in subjects with BMI \geq 30 kg/m², the 2nd tertile of exposure showed the highest diabetes risk. The interaction between *p,p'*-DDE and BMI was statistically significant (*p* < 0.05).

No significant interaction was observed when the product “TEXB \times POP concentrations” was included as a covariate in the model or when the models in Table 2 were stratified as a function of different TEXB-extract cut-off points (data not shown). The potential influence of adipose tissue origin on the association between diabetes and POPs was also assessed using interaction terms, and no statistically significant relation was found (data not shown).

In unadjusted analyses, the risk of diabetes increased by 7.0% (95% CI, 1.5%–12.8%) with each additional unit of BMI; interestingly, this association lost significance after adjustment for adipose tissue concentrations of either *p,p'*-DDE, β -HCH, or HCB (data not shown).

4. Discussion

In this study, statistically significant associations were found between the adipose tissue concentrations of certain POPs and the risk of type 2 diabetes. To the best of our knowledge, this is the first study to explore the association between adipose tissue concentrations of POPs and the risk of this disease. Previous cross-sectional, longitudinal studies and a meta-analysis, with different adjustment levels, reported that serum levels of OCPs and/or PCBs were positively associated with diabetes risk (Airaksinen et al.,

2011; Everett and Matheson, 2010; Gasull et al., 2012; Lee et al., 2007.; 2011; Wu et al., 2012).

Consistent findings of a higher risk of type 2 diabetes in obese subjects led researchers to propose that adipose tissue plays an important role in the pathogenesis of this disease (Ogunbode et al., 2011). However, others reported that the risk of type 2 diabetes is reduced in subjects with a low body burden of POPs, independently of their BMI, indicating that POPs stored in adipose tissue may be the true promoters of the disease (Lee et al., 2006; Porta, 2006). This proposition is supported by the present finding of a positive trend in the OR for diabetes in non-obese subjects with increased levels of POPs (Fig. 1). Furthermore, it has been reported (Verhulst et al., 2009) that POPs may themselves induce obesity (obesogenic effect). Hence, POP concentrations would act as confounders in the association between BMI and diabetes. This hypothesis is supported by the results of the present study, which found an initial positive association between BMI and diabetes that disappeared after adjustment for *p,p'*-DDE concentrations.

The association between *p,p'*-DDE and diabetes in the obese subjects in our sample did not follow a linear trend, with higher ORs in the 2nd than 3rd tertile (Fig. 1). Similar inverted-U-shape associations have been previously described but with serum concentrations (Lee et al., 2011). In our case it may be attributable to a dilution effect of very high BMI levels on POP concentrations (Wolff et al., 2000). More evidence is needed to shed light on this complex dose–response relationship.

Among the chemicals investigated in the present study, only adipose tissue *p,p'*-DDE showed a significant association with diabetes risk in all models. BMI was included in the models as a covariate because we considered that it might be associated with both the concentrations and the effect. However, there are two scenarios in which the use of BMI as a covariate might cause an over-adjustment of the models, i.e., if we assume that BMI is in the causal pathway between POPs and diabetes and/or that BMI is only a result of the high intake of fatty foods (one of the main sources of POP exposure) and not a direct cause of diabetes. Considering these assumptions, only results from model A (sex- and age-adjusted) would be valid, in which a higher risk of diabetes was associated with *p,p'*-DDE and β -HCH concentrations. This hypothesis is supported by the finding by Lee et al. (2006) of a low risk of diabetes in subjects with low concentrations of POPs, independently of their BMI. It is noteworthy that positive Spearman correlations were observed between all POPs in our study; therefore the associations found in single chemicals may also be surrogates of exposure to mixtures of POPs (Lee et al., 2006).

Chronic exposure to low doses of environmental pollutants has been suggested as one of the causes of the increasing incidence of diabetes worldwide in a context of declining environmental POP levels. The mechanisms involved may include potential synergisms between adipose tissue and POPs, epigenetic changes over generations, and a “cocktail effect” of mixtures of POPs and/or other chemicals currently in use (Lee et al., 2011; Porta et al., 2012). Indeed, it has been reported that endocrine disrupting activity may be induced by mixtures of low doses of POPs that would not individually exert any effect (Rajapakse et al., 2002). Virtually all populations show detectable levels of at least one POP; therefore, even minimum effects on the risk of diabetes might have a major impact on the general population (Porta, 2006).

It has been suggested that diabetes may be promoted by an immunotoxic effect of POPs via their binding with estrogenic receptors (Wang et al., 2007). This mechanism would induce a chronic low-grade inflammation process, decreased mitochondrial function, fatty acid oxidation, and increased lipolysis, which are related to the insulin resistance syndrome (Guilherme et al., 2008). Furthermore, previous research described an association of

Table 2
Multiple logistic regression models for POP concentrations and diabetes.

	Crude model			Adjusted model ^a			Adjusted model ^b			Adjusted model ^c		
	OR	(95% CI)	P	OR	(95% CI)	P	OR	(95% CI)	P	OR	(95% CI)	P
PCB-138 (ng/g lip)												
≤ 13.73	1.00		0.053	1.00		0.716 ^d	1.00		0.099	1.00		0.784 ^d
13.74–30.07	2.28	(0.84–6.19)		1.53	(0.55–4.30)		1.98	(0.72–5.47)		1.34	(0.47–3.86)	
> 30.07	2.67	(1.00–7.13)		1.38	(0.49–3.88)		2.36	(0.87–6.41)		1.02	(0.35–3.03)	
PCB-153 (ng/g lip)												
≤ 161.52	1.00		0.006	1.00		0.146 ^d	1.00		0.008	1.00		0.173 ^d
161.52–301.02	5.48	(1.55–19.43)		3.63	(0.10–13.18)		4.72	(1.32–16.92)		3.41	(0.90–12.94)	
> 301.02	5.90	(1.67–20.78)		2.76	(0.74–10.21)		5.55	(1.56–19.71)		2.13	(0.56–8.11)	
PCB-180 (ng/g lip)												
≤ 137.13	1.00		0.006	1.00		0.263	1.00		0.006	1.00		0.558 ^d
137.13–251.40	1.52	(0.53–4.42)		1.04	(0.35–3.09)		1.33	(0.45–3.92)		0.86	(0.28–2.64)	
> 251.40	3.51	(1.35–9.11)		1.66	(0.59–4.61)		3.47	(1.32–9.10)		1.40	(0.48–4.05)	
HCB (ng/g lip)												
≤ 7.37	1.00		0.001	1.00		0.061	1.00		0.003	1.00		0.293
7.37–30.07	2.65	(0.81–8.67)		1.90	(0.56–6.39)		2.30	(0.68–7.73)		1.40	(0.40–4.91)	
> 30.07	5.73	(1.90–17.29)		3.03	(0.91–10.07)		5.27	(1.62–17.14)		1.91	(0.54–6.84)	
β-HCH (ng/g lip)												
≤ 6.23	1.00		0.003	1.00		0.195	1.00		0.006	1.00		0.437
6.23–16.81	3.20	(1.00–10.22)		3.25	(1.02–10.38)		0.014 ^d	2.79	(0.86–9.07)		1.84	(0.54–6.24)
> 16.81	5.11	(1.68–15.57)		5.46	(1.73–17.25)		4.87	(1.50–15.81)		1.81	(0.51–6.45)	
p,p'-DDE (ng/g lip)												
≤ 45.56	1.00		<0.001	1.00		0.014	1.00		0.002	1.00		0.070
45.56–154.88	5.92	(1.28–27.26)		4.09	(0.87–19.25)		5.37	(1.15–25.00)		3.61	(0.75–17.35)	
> 154.88	12.46	(2.86–54.37)		6.15	(1.34–28.22)		11.36	(2.54–50.78)		4.44	(1.03–21.02)	
p,p'-DDE in serum (ng/g lip)												
≤ 127.33	1.00		0.019	1.00		0.234	1.00		0.038	1.00		0.289
127.33–266.91	1.86	(0.61–5.74)		1.39	(0.44–4.39)		1.66	(0.53–5.18)		0.99	(0.29–3.35)	
> 266.91	3.32	(1.17–9.46)		1.90	(0.64–5.64)		2.93	(1.01–8.47)		1.69	(0.54–5.22)	
TEXB-extract (Eq/g lipid)												
≤ 103.69	1.00		0.360	1.00		0.804 ^d	1.00		0.723 ^d	1.00		0.825 ^d
103.69–217.67	0.67	(0.28–1.64)		1.29	(0.49–3.07)		1.40	(0.57–3.46)		0.84	(0.31–2.26)	
> 217.67	0.67	(0.27–1.63)		0.91	(0.34–2.47)		1.06	(0.40–2.82)		0.90	(0.34–2.35)	
∑PCBs (ng/g lip)												
≤ 354.18	1.00		0.032	1.00		0.846 ^d	1.00		0.043	1.00		0.992
354.18–651.72	2.08	(0.76–5.74)		1.33	(0.47–3.79)		1.76	(0.53–5.18)		1.11	(0.37–3.31)	
> 651.72	2.88	(1.09–7.61)		1.32	(0.47–3.74)		2.69	(1.01–8.47)		1.03	(0.35–3.03)	
∑OCs (ng/g lip)												
≤ 461.05	1.00		0.002	1.00		0.135	1.00		0.002	1.00		0.305
461.05–901.46	2.94	(0.91–9.48)		1.74	(0.52–5.85)		2.42	(0.74–7.95)		1.37	(0.39–4.80)	
> 901.46	5.40	(1.78–16.35)		2.40	(0.74–7.82)		4.98	(1.62–15.27)		1.81	(0.54–6.09)	

Unless otherwise specified, p-value derived from Multivariate analogue of Mantel's extension test for linear trend.

^a Adjusted by sex and age.^b Adjusted by sex and BMI.^c Adjusted by sex, age, BMI and tissue origin; 95% CI: 95% confidence interval.^d Wald test.

POP concentrations with altered substrate oxidation patterns, lower glucose oxidation, and higher lipid oxidation in non-diabetic individuals (Faerch et al., 2012). In the present study, however, the overall estrogenicity of the adipose tissue (TEXB-extract) was not associated with the risk of diabetes and did not modify the effect of POPs on the disease, indicating that estrogenicity may not play an important role in the pathogenesis of diabetes. This is consistent with the finding by Lee et al. (2011) that the estrogenic PCB-187 and anti-estrogenic PCB-170 are similarly associated with the risk of diabetes. However, there are inadequate data on the underlying mechanisms of POP toxicity in relation to different estrogenic receptors, which is a relevant issue given that estrogen receptors might be over-expressed in some populations, e.g., in patients with certain types of cancer. It should also be taken into account that the TEXB-extract represents the overall estrogenicity of the adipose tissue, which might be influenced by the action of endogenous hormones

with estrogenic potential and individually variable tissue levels (Arrebola et al., 2012a). Hence, further research is needed to elucidate this issue.

The prevalence of diabetes in our study subjects (8.8%) was relatively low in comparison to the level of 13.8% recently estimated for the Spanish population (Soriguer et al., 2012). We consider that we were able to diagnose most of the subjects with diabetes in our population by using the combination of self-reported diabetes with a review of the clinical records, and the above discrepancy might be explained by the differences in age, sampling period, and study area between the two studies. Another reason for the observed difference in prevalence is that our hospital-based population might not be entirely representative of the adult general population of Spain, although we believe that the associations found in the present study may be reproduced at least in the general population of the study area. In addition, our study includes subjects from 16 years of age and

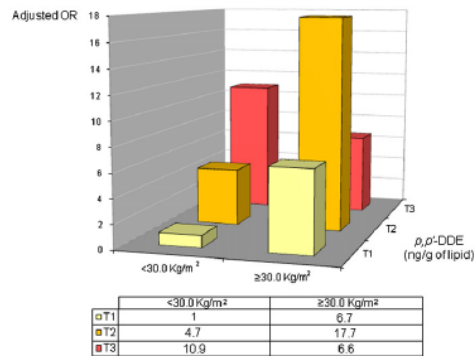


Fig. 1. Adjusted odds ratios (OR) for diabetes in the tertiles (T) of adipose tissue concentration of *p,p'*-DDE and two levels of BMI.

there may be some risk of misclassification, with the erroneous inclusion of some type-I diabetics in the type-II group. However, we believe that any such error would be very insignificant due to the low prevalence of type I diabetes.

In our study, some associations were found between serum *p,p'*-DDE concentrations and the risk of diabetes but they were not consistent at all adjustment levels. Results for individual serum POPs and risk of type 2 diabetes are not entirely consistent across studies (Wu et al., 2012). This may be caused by the relatively high variability of concentrations of POPs in serum in comparison to adipose tissue (Gaskins and Schisterman, 2009). In fact, serum concentrations have been found to be a good predictor of point exposure to POPs (including the mobilization of those stored in fatty tissues) but not always of chronic exposure (Archibeque-Engle et al., 1997; Arrebola et al., 2012b). Despite the difficulty in obtain samples, concentrations in adipose tissue offer a good estimation of cumulative internal exposure to POPs, accounting for all routes and sources of exposure (Kohlmeier and Kohlmeier, 1995), and it is therefore a suitable matrix for assessing the impact of chronic exposure to environmental pollutants on human health.

Adipose tissue *p,p'*-DDE concentrations were positively associated with the prevalence of type 2 diabetes in this sample of adults from Southern Spain, and this association cannot be solely explained by differences in adipose tissue origin, BMI, age, or sex. Adipose tissue has an important role in the development of diabetes and, although some mechanisms have been suggested in the literature, further research is needed to clarify the action mechanism of POP toxicity.

Funding and ethical approvals

This study was supported in part by research grants from the Spanish Ministry of Health (FIS 02/974, EUS2008-03574); CIBER de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Government of Spain, the Regional Government of Andalucía-Spain (SAS 01/264, grant numbers P09-CTS-5488 Project of Excellence, and SAS PI-0675-2010), Spanish Ministry of Science and Innovation (Ramon y Cajal Program-MFFC), the EU Commission (CONTAMED FP7-ENV-212502), Instituto de Salud Carlos III (FIS PI11/0610), and the Granada Research of Excellence Initiative on BioHealth "GREIB" from the University of Granada (CEB-005).

The funding agencies had no role in the analysis of data or preparation of the manuscript. This research was approved by the ethics committees of San Cecilio University Hospital and Santa Ana Hospital.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge scientific and technical assistance provided by Richard Davies and by Tomás López, and Yolanda Rovira (Hospital del Mar Research Institute-IMIM). Dr JP Arrebola is under contract with the PTA-MICINN program (Spanish Ministry of Science and Innovation). The results would not have been achieved without the selfless collaboration of the staff from Santa Ana and San Cecilio Hospitals and the patients who took part in the study.

References

- Airaksinen, R., Rantakokko, P., Eriksson, J.G., Blomstedt, P., Kajantie, E., Kiviranta, H., 2011. Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. *Diabetes Care* 34, 1972–1979.
- Archibeque-Engle, S.L., Tessari, J.D., Winn, D.T., Keefe, T.J., Nett, T.M., Zheng, T., 1997. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J. Toxicol. Environ. Health* 52, 285–293.
- Arrebola, J.P., Fernandez, M.F., Molina-Molina, J.M., Martin-Olmedo, P., Exposito, J., Olea, N., 2012a. Predictors of the total effective xenoestrogen burden (TEXB) in human adipose tissue. A pilot study. *Reprod. Toxicol.* 33, 45–52.
- Arrebola, J.P., Fernandez, M.F., Porta, M., Rosell, J., de la Ossa, R.M., Olea, N., Martin-Olmedo, P., 2010. Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ. Int.* 36, 705–713.
- Arrebola, J.P., Martin-Olmedo, P., Fernandez, M.F., Sanchez-Cantalejo, E., Jimenez-Rios, J.A., Torne, P., Porta, M., Olea, N., 2009. Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: a multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ. Int.* 35, 27–32.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Cuellar, M., Quevedo, M., Claire, E., Mejia, L.M., Fernandez-Rodriguez, M., Freire, C., Olea, N., Mercado, L.A., 2012b. Factors influencing combined exposure to three indicator polychlorinated biphenyls in an adult cohort from Bolivia. *Environ. Res.* 116, 17–25.
- Brauner, E.V., Raaschou-Nielsen, O., Gaudreau, E., Leblanc, A., Tjonneland, A., Overvad, K., Sorensen, M., 2011. Predictors of polychlorinated biphenyl concentrations in adipose tissue in a general danish population. *Environ. Sci. Technol.* 45, 679–685.
- Das, U.N., 2010. Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* 26, 459–473.
- Everett, C.J., Matheson, E.M., 2010. Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999–2004 national health and nutrition examination survey. *Environ. Int.* 36, 398–401.
- Faerch, K., Hojlund, K., Vind, B.F., Vaag, A., Dalgard, C., Nielsen, F., Grandjean, P., 2012. Increased serum concentrations of persistent organic pollutants among prediabetic individuals: potential role of altered substrate oxidation patterns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1705–E1713.
- Fernandez, M.F., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Cerrillo, L., Molina-Molina, J.M., Araque, P., Martinez-Vidal, J.L., Olea, N., 2004. Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 163–170.
- Fernandez, M.F., Santa-Marina, L., Ibarluzea, J.M., Exposito, J., Aurrekoetxea, J.J., Torne, P., Laguna, J., Rueda, A.J., Pedraza, V., Olea, N., 2007. Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: a biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 43, 1290–1299.
- Gaskins, A.J., Schisterman, E.F., 2009. The effect of lipid adjustment on the analysis of environmental contaminants and the outcome of human health risks. *Methods Mol. Biol.* 580, 371–381.
- Gasull, M., Pumarega, J., Tellez-Plaza, M., Castell, C., Tresserras, R., Lee, D.H., Porta, M., 2012. Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of Catalonia. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7799–7810.
- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., Czech, M.P., 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 367–377.
- Hectors, T.L., Vanparys, C., Van, D.V., Martens, G.A., Jorens, P.G., Van Gaal, L.F., Covaci, A., De, C.W., Blust, R., 2011. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia* 54, 1273–1290.
- Ibarluzea, J.J., Fernandez, M.F., Santa-Marina, L., Olea-Serrano, M.F., Rivas, A.M., Aurrekoetxea, J.J., Exposito, J., Lorenzo, M., Torne, P., Villalobos, M., Pedraza, V., Sasco, A.J., Olea, N., 2004. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Cause. Control* 15, 591–600.

- Kohlmeier, L., Kohlmeier, M., 1995. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 3), 99–106.
- Kortenkamp, A., 2006. Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective. *Int. J. Androl.* 29, 193–198.
- Lee, D.H., Lee, I.K., Song, K., Steffes, M., Toscano, W., Baker, B.A., Jacobs Jr., D.R., 2006. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* 29, 1638–1644.
- Lee, D.H., Lee, I.K., Steffes, M., Jacobs Jr., D.R., 2007. Extended analyses of the association between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes. *Diabetes Care* 30, 1596–1598.
- Lee, D.H., Lind, P.M., Jacobs Jr., D.R., Salihovic, S., van, B.B., Lind, L., 2011. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plasma predict development of type 2 diabetes in the elderly: the prospective investigation of the vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Diabetes Care* 34, 1778–1784.
- Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorf, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.L., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., Cho, J.H., Guttma-cher, A.E., Kong, A., Kong, L., Mardis, E., Rotimi, C.N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A.S., Boehnke, M., Clark, A.G., Eichler, E.E., Gibson, G., Haines, J.L., Mackay, T.F., McCarroll, S.A., Visscher, P.M., 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.
- Martinez Vidat, J.L., Moreno, F.M., Garrido, F.A., Olea-Serrano, F., Olea, N., 2002. Determination of endocrine-disrupting pesticides and polychlorinated biphe-nyls in human serum by GC-ECD and GC-MS-MS and evaluation of contribu-tions to the uncertainty of the results. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 766–775.
- Ogunbode, A.M., Ladipo, M., Ajayi, I.O., Fatiregun, A.A., 2011. Obesity: an emerging disease. *Niger. J. Clin. Pract.* 14, 390–394.
- Patel, C.J., Bhattacharya, J., Butte, A.J., 2010. An environment-wide association study (EWAS) on type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 5, e10746.
- Phillips, D.L., Pirkle, J.L., Buse, V.W., Bernert Jr., J.T., Henderson, L.O., Needham, L.L., 1989. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 495–500.
- Porta, M., 2006. Persistent organic pollutants and the burden of diabetes. *Lancet* 368, 558–559.
- Porta, M., Pumarega, J., Gasull, M., 2012. Number of persistent organic pollutants detected at high concentrations in a general population. *Environ. Int.* 44, 106–111.
- Rajapakse, N., Silva, E., Kortenkamp, A., 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* 110, 917–921.
- Rhodes, C.J., 2005. Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380–384.
- Rivas, A., Fernandez, M.F., Cerrillo, I., Ibarluzea, J., Olea-Serrano, M.F., Pedraza, V., Olea, N., 2001. Human exposure to endocrine disruptors: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 109, 185–197.
- Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiu, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castano, L., Castell, C., Catala, M., Delgado, E., Franch, J., Gaztambide, S., Girbes, J., Gomis, R., Gutierrez, G., Lopez-Alba, A., Martinez-Larrad, M.T., Menendez, E., Mora-Peces, I., Ortega, E., Pascual-Manich, G., Rojo-Martinez, G., Serrano-Rios, M., Valdes, S., Vazquez, J.A., Vendrell, J., 2012. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 55, 88–93.
- Soto, A., Lin, T., Justicia, H., Silvia RM, Sonnenschein, C., 1992. An "In Culture" Bioassay to Assess the Estrogenicity of Xenobiotics (E-SCREEN). Princeton Scientific, Princetown, NJ.
- Tuomi, T., 2005. Type 1 and type 2 diabetes: what do they have in common? *Diabetes* 54 (Suppl. 2), S40–S45.
- UNEP, 2003. Regionally based assessment of persistent toxic substances. Mediter-ranean regional report. United Nations Environment Programme on Chemi-cals. <www.chem.unep.ch/pts/regreports/mediterranean.pdf> (last accessed August 31st 2012).
- Verhulst, S.L., Nelen, V., Hond, E.D., Koppen, G., Beunckens, C., Vael, C., Schoeters, G., Desager, K., 2009. Intrauterine exposure to environmental pollutants and body mass index during the first 3 years of life. *Environ. Health Perspect.* 117, 122–126.
- Vilábur, N., Molina-Molina, J.M., Bustamante, M., Murcia, M., Arrebola, J.P., Ballester, F., Mendez, M.A., Garcia-Esteban, R., Guxens, M., Santa-Marina, L., Tardín, A., Sunyer, J., Olea, N., Fernandez, M.F. Male specific association between xenoestrogen levels in placenta and birthweight. *Environ. Int.*, in press.
- Wang, F., Roberts, S.M., Butfiloski, E.J., Morel, L., Sobel, E.S., 2007. Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides: a comparison of splenic B-cell effects of chlordecone and estradiol in (NZBxNZW)F1 mice. *Toxicol. Sci.* 99, 141–152.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053.
- Wolff, M.S., Zeleniuch-Jacquotte, A., Dubin, N., Toniolo, P., 2000. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 271–277.
- Wu, H., Bertrand, K.A., Choi, A.L., Hu, F.B., Laden, F., Grandjean, P., Sun, Q., 2012. Persistent organic pollutants and type 2 diabetes: a prospective analysis in the nurses' health study and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.*

Discusión

El resultado más relevante del presente trabajo es la asociación estadísticamente significativa encontrada entre las concentraciones de ciertos COPs en tejido adiposo y el riesgo de padecer diabetes tipo 2. Aunque en la revisión bibliográfica diversos estudios previos transversales, longitudinales y un meta-análisis, con diferentes niveles de ajuste, describían asociaciones positivas y estadísticamente significativas entre los niveles séricos de COPs con el riesgo de diabetes (Airaksinen et al., 2011; Everett and Matheson, 2010; Gasull et al., 2012; Lee et al., 2007b; Wu et al., 2012), este es el primer estudio que evaluó la asociación entre las concentraciones en tejido adiposo de los COPs y el riesgo de esa enfermedad.

Se estima que el tejido adiposo juega un papel muy importante en la génesis de la diabetes, debido a que las personas obesas suelen presentar un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 (Ogunbode et al., 2011). Sin embargo, hay estudios recientes que han sugerido que los COPs almacenados en el tejido adiposo podrían ser los verdaderos promotores de la enfermedad, ya que se ha observado que el riesgo de padecer diabetes tipo 2 disminuye en personas con bajas concentraciones de COPs, independientemente de grado de obesidad (Lee et al., 2006; Porta, 2006b). De hecho, en el presente trabajo encontramos un riesgo mayor de diabetes en personas no obesas, con niveles altos de COPs en tejido adiposo, en comparación con las obesas con niveles bajos de estos contaminantes. Es necesario tener en cuenta que, tal y como se ha mencionado anteriormente, los COPs podrían ejercer un efecto obesógeno (Verhulst et al., 2009), es decir, que podrían inducir estados de obesidad en el ser humano. Por lo tanto, las concentraciones de COPs pueden actuar como factores confusores en la asociación entre IMC y diabetes. De hecho, en nuestra población encontramos una asociación positiva y estadísticamente significativa entre el IMC y diabetes, la cual deja de ser evidente al ajustar el modelo por las concentraciones de *p,p'*-DDE en tejido adiposo.

Por otro lado, es interesante que en la cohorte GraMo, la asociación entre las concentraciones de *p,p'*-DDE y el riesgo de diabetes no siguió una tendencia lineal en personas obesas, las cuales mostraron Odds Ratios (ORs) mayores en el segundo tercil de exposición que en el primero o el tercero. Este tipo de asociación en forma de “U invertida” se había descrito previamente en otra población, cuando se midieron las

concentraciones de COPs en suero en lugar de en tejido adiposo (Lee et al., 2011b). En el caso actual, no puede descartarse un efecto dilución, es decir, que las personas más obesas a pesar de tener una mayor carga bruta de COPs en el organismo, presenten aparentemente concentraciones más bajas al considerar su alto IMC. El efecto dilución producido por niveles muy elevados de obesidad fue previamente descrito por Wolff et al. (2000).

De todos los COPs analizados en el presente estudio, y si tenemos en cuenta todos los niveles de ajuste, sólo las concentraciones de p,p' -DDE en tejido adiposo se asociaron de forma estadísticamente significativa con el riesgo de padecer diabetes. El IMC fue incluido en los modelos como covariable porque se consideró que podría estar asociado de forma independiente con tanto con la exposición como con el efecto: concentraciones de COPs y riesgo de diabetes. De cualquier modo, existen dos situaciones en las que el uso de IMC como covariable puede causar un sobreajuste en los modelos, por ejemplo, si se asume que el IMC está en el camino causal entre los COPs y la diabetes y/o que el IMC es sólo un resultado de la alta ingesta de alimentos grasos (una de las principales fuentes de exposición a COPs) y no una causa directa de la diabetes. En el caso de sobreajuste, sólo los resultados del modelo ajustado por edad y sexo serían válidos, en el que se asoció un mayor riesgo de diabetes con las concentraciones de p, p' -DDE y, además, β -HCH. Esta hipótesis está basada en el hallazgo de un riesgo disminuido de diabetes en sujetos con concentraciones bajas de COPs por Lee y colaboradores (2006), independientemente de su IMC. Cabe destacar que en el presente estudio se observaron correlaciones positivas entre todos los COP medidos, por lo que las asociaciones encontradas con los COPs individuales también pueden ser indicativas de exposición a mezclas o, incluso, a otros COPs no analizados en nuestro estudio (Lee et al., 2006).

En definitiva, creemos que la exposición crónica a bajas dosis de contaminantes del medio ambiente, especialmente COPs, podría ser una de las causas de la creciente incidencia de diabetes. Los mecanismos involucrados podrían incluir una interacción entre el tejido adiposo y COPs, ciertos cambios epigenéticos, así como un “efecto cóctel” de las mezclas de los COPs y otros productos químicos en uso actualmente (Lee et al., 2011a; Porta et al., 2012b). De hecho, se ha sugerido que las mezclas COPs en bajas concentraciones, que individualmente carecerían de efecto biológico, podrían ejercer un efecto disruptor endocrino de forma combinada o efecto cóctel (Rajapakse et

al., 2002). Prácticamente todas las poblaciones humanas contienen niveles detectables de al menos un COP, por lo tanto, incluso efectos mínimos sobre el riesgo de diabetes podría tener un impacto importante en la población general (Porta, 2006a).

El desencadenamiento de la diabetes podría venir mediado por un efecto inmunotóxico derivado de la unión de los COPs a los receptores estrogénicos (Wang et al., 2007). Este mecanismo sería capaz de inducir un proceso inflamatorio leve, que provocaría una disminución de la función mitocondrial, la oxidación de los ácidos grasos y una lipólisis aumentada, factores que se relacionan con el síndrome de resistencia a la insulina (Guilherme et al., 2008). Además, existen estudios previos que describen una asociación entre los niveles de COPs y la alteración del patrón de oxidación de los sustratos, baja oxidación de la glucosa y mayor oxidación lipídica (Faerch et al., 2012). En el presente estudio, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los niveles de estrogenicidad de los extractos de tejido adiposo (TEXB-extract) con el riesgo de diabetes, ni tampoco un efecto modificador de las mismas sobre las asociaciones entre COPs y el riesgo de la enfermedad, indicando que quizás la estrogenicidad pueda no jugar un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad. Esto corrobora los hallazgos de Lee et al. (2011a), que describieron una asociación positiva entre el riesgo de diabetes y las concentraciones tanto de PCB-187 (de naturaleza estrogénica) y como de PCB-170 (antiestrogénico). Una limitación de nuestro trabajo es que el efecto estrogénico del tejido adiposo cuantificado en el presente estudio (TEXB-extract) puede estar influenciado por la acción de las hormonas endógenas estrogénicas (Arrebola et al., 2012b) ya que el proceso no incluye la separación y fraccionamiento de las muestras de tejido adiposo en función de la polaridad y lipofiliidad de sus componentes.

La prevalencia de diabetes en nuestro estudio fue baja (8,8%) en comparación con el 13,8% estimado para la población española (Soriguer et al., 2012). Sin embargo, se considera que, en este estudio, se ha podido diagnosticar a la mayoría de los sujetos con diabetes, ya que para el diagnóstico se usaron tanto la combinación de las encuestas como la revisión de las historias clínicas. Por tanto, la discrepancia con la estimación poblacional podría explicarse por las diferencias de edad o el período de muestreo entre los dos estudios. Otra razón podría estar relacionada con la base hospitalaria del estudio, lo que provocaría que la población reclutada no sea enteramente representativa de la

población general adulta de España. No obstante, creemos que las asociaciones encontradas pueden ser extrapolables a la población general del área de estudio.

Nuestro equipo de investigación considera que es necesario profundizar en este campo e investigar el posible papel de los COPs en el desarrollo de diabetes tipo 2. Dada la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial y su tendencia al alza, así como el gasto sanitario ligado a las actuaciones en esta enfermedad, es necesario considerar todos los factores involucrados en su desarrollo, a pesar de que algunos casos como en el presente las evidencias sean solo preliminares, para poder actuar con carácter preventivo.

7. 5 Discusión general

7.5.1 Exposición a COPs en España y Bolivia

Una de las hipótesis de partida del presente trabajo de investigación es que tanto los niveles de exposición a COPs como las rutas de entrada de los contaminantes pueden variar en función de la población de estudio. La respuesta a este objetivo es de un gran interés para los programas de salud pública, ya que podría afectar a la toma de decisiones en materia de prevención de la exposición y de información a diferentes grupos de población general. En base a estas premisas, nuestro equipo optó por la comparación de dos muestras de población provenientes de dos países muy distintos, con diferentes hábitos alimentarios, estilos de vida, y nivel sociocultural, como son España y Bolivia. Los resultados de los estudios realizados en ambas poblaciones están presentados en las respuestas a los Objetivos 1 y 2 y ahí se ha incluido la discusión particular para cada una de las poblaciones. En este apartado analizaremos de forma pormenorizada las similitudes y diferencias encontradas para ambas poblaciones.

En principio, las dos poblaciones mostraron ciertas diferencias en las características sociodemográficas y en segundo lugar, las diferencias en tamaño muestral han condicionado que se obtuviera un mayor número de variables predictoras en la población reclutada en el proyecto MCC-Spain cuando se compara con el trabajo realizado en Bolivia.

De forma detallada, en la muestra de Bolivia existía una mayor proporción de mujeres ($n = 90$, 80,4%) que en hombres ($n = 22$, 19,6%), lo que también se observó, aunque con menor diferencia, en la población española ($n=213$, 65% mujeres y $n=109$, 35% hombres). En la población de Bolivia, un total de 80 sujetos (71%) residía en zona urbana y 12 residían cerca de 2 km de alguna zona de actividad industrial, mientras que en la población española el 100% de las personas reclutadas vivían o vivieron en una zona urbana en algún momento de su vida. La mediana de edad en la cohorte MCC-Spain fue de 62,5 años y su IMC de 26,1 Kg/m² mientras que en la población de Santa Cruz de la Sierra, la mediana de edad fue de 28 años y su IMC de 26,4 Kg/m².

Santa Cruz de la Sierra	% > LOD	GM	25th	75th
PCB -138	56	33,7	3,8	214,5
PCB -153	80	59,0	61,8	517,2
PCB -180	38	26,7	3	123,6
Santa Cruz de la Sierra	Frecuencia	GM	25th	75th
PCB -138	87	105,0	77,0	223,4
PCB -153	81	65,8	33,5	284,8
PCB -180	40	41,0	26,7	302,5
MCC-Spain	Frecuencia	GM	25th	75th
PCB -138	93	128,4	56,7	158,7
PCB -153	93	204,4	50,6	172,7
PCB -180	92	101,2	39,8	107,4

Tabla 2. Niveles de PCBs en suero y tejido adiposo en la cohorte de Santa Cruz de la Sierra y en suero en MCC-Spain. Azul: niveles en suero; Blanco: niveles en tejido adiposo LOD: Límite de detección (%), GM: Media geométrica (ng/g lípido); 25th y 75th: primer y tercer tercil (ng/g lípido).

Debido a las diferencias mencionadas hemos optado por la realización de análisis multivariantes, donde la influencia de cada variable está evaluada a igualdad de otras posibles variables confusoras potencialmente relacionadas con la exposición. En la tabla 3 se muestra un resumen de los niveles séricos y frecuencias de detección de los tres congéneres de PCBs cuantificados en las muestras de población española y boliviana y en la Tabla 2 se muestra una comparación de los niveles de PCBs en ambas cohortes. Se puede observar que la exposición medida en suero a los tres PCBs es mayor en la corte MCC-Spain que en la cohorte de Bolivia, tanto en concentración como en frecuencia de detección. Por otra parte, la distribución de las concentraciones es más heterogénea en la cohorte de Santa Cruz de la Sierra, hallándose mayores diferencias inter-cuartílicas. Ha de tenerse en cuenta que la población MCC-Spain es de una edad considerablemente mayor que la de Santa Cruz de la Sierra, lo que puede condicionar una mayor

acumulación de contaminantes persistentes, y que el grado de industrialización de los dos países participantes es distinto (INE, 2010).

Los análisis multivariantes mostraron muchas similitudes en los predictores de la exposición a PCBs en ambas poblaciones, pero también ciertas discrepancias en ciertas variables, que incluso mostraron signos opuestos en sus asociaciones. En la población de Santa Cruz de la Sierra se hallaron mayor número de predictores con respecto a las concentraciones de tejido adiposo que en suero, hecho que refuerza la hipótesis de que las concentraciones medidas en tejido adiposo son un mejor indicador de la exposición acumulada (Archibeque-Engle et al., 1997; Waliszewski et al., 2004), y por tanto necesitaría un menor tamaño muestral para obtener resultados robustos. Se hallaron también algunas diferencias marcadas en el sentido de las asociaciones con ciertas variables ya que la edad, por ejemplo, se asocia de forma positiva a las concentraciones séricas de PCBs en España y negativa en el caso de las concentraciones en tejido adiposo en la población de Santa Cruz de la Sierra. En este caso, la diferencia de edad de las personas que conforman los diferentes estudios, marcan la diferencia en este aspecto (28 años en Bolivia y 62 años en MCC-Spain). También puede observarse una discrepancia en el grupo de mujeres, ya que en el estudio MCC-Spain, las mujeres postmenopáusicas mostraron una menor acumulación de PCBs en suero, mientras que en Bolivia son las premenopáusicas las que refieren este hecho. Esta diferencia puede deberse a los diferentes estilos de vida llevados por las mujeres de mayor edad en cada país, ya no disponemos de evidencias lo suficientemente robustas como para asegurar que la menopausia en sí podría alterar los niveles de COPs en el organismo.

En la población boliviana, el número de embarazos se asoció inversamente con las concentraciones de PCBs en tejido adiposo en ambos modelos crudos y ajustados por edad y sexo, pero no cuando el IMC también se introdujo como covariable en el modelo global. En los modelos de la cohorte MCC-Spain, los embarazos de las mujeres participantes en el estudio no se asociaron con los niveles de PCBs en suero, sin embargo, al incluir la variable de número de embarazos de las madres previos al nacimiento de los participantes, sí se obtuvo una correlación inversa con las concentraciones en suero de los tres congéneres estudiados. Es interesante resaltar que la exposición en edad temprana es un factor predictor de la exposición de cierta importancia debido a que el tamaño corporal del recién nacido es menor y, por tanto las

concentraciones a las que se expone son mayores (Olea et al., 1999), además de que los sistemas de detoxificación del feto o recién nacido son menos efectivos (VEST and ROSSIER, 1963). Esta hipótesis debe ser estudiada con más profundidad ya que, como se ha podido apreciar en la población de Santa Cruz de la Sierra, la inclusión de ciertas covariables, modifican las asociaciones halladas.

Cohorte Santa Cruz de la Sierra (Bolivia)		Cohorte MCC-Spain (España)
Suero	Tejido adiposo	Suero
Ocupación (+)	Edad (-)	Edad (+)
Consumo de alimentos grasos(+)	Consumo de alimentos grasos (+)	Consumo de alimentos grasos (+)
	Hábito tabáquico (-)	Hábito tabáquico (-)
Residencia (+)	Residencia	Área de estudio (+)
Lactancia acumulada (+)		Lactancia recibida (+)
	Embarazos (-)	Sexo (+)
	Consumo de alimentos no grasos (-)	Consumo de alimentos no grasos (-)
Postmenopausia (+)		Pre-menopausia (+)
		IMC (+)

Tabla 3. Predictores de las concentraciones de PCBs en suero y tejido adiposo en la cohorte de Santa Cruz de la Sierra y en suero en la cohorte MCC-Spain. (+) Asociación positiva; (-) asociación negativa

El consumo de tabaco se asoció inversamente con la exposición en ambas poblaciones, española y boliviana, observación que refuerza la hipótesis de una activación inducida de las isoformas del citocromo P-450 como mecanismo de detoxificación del organismo

(Kroon, 2007) que favorece la transformación y eliminación de los residuos contaminantes.

En las dos cohortes, el consumo de alimentos grasos se asoció positivamente a la exposición a PCBs, también de forma individual con ciertos grupos de alimentos. Por ejemplo, el consumo de huevos se asoció positivamente con Σ PCBs en los modelos de suero parcialmente ajustados en el estudio de Santa Cruz de la Sierra. En la cohorte MCC-Spain el consumo de huevos se asoció positivamente en los congéneres PCBs 153 y 180. En el caso de la carne, en ambos casos los consumidores de cordero mostraron niveles más altos de PCBs en ambas matrices, tal y como ocurre también para el consumo de lácteos.

En España, el consumo de pescado azul se asoció con mayores concentraciones de los tres congéneres de PCBs, sin embargo, no encontramos este tipo de asociación en Bolivia en ninguna de las matrices estudiadas. Las diferencias en los hábitos alimentarios de ambas regiones en el consumo de alimentos procedentes del mar puede ser la causa de esta discrepancia, ya que en Santa Cruz de la Sierra el consumo de pescado es muy bajo, por ser una población muy alejada de la costa, mientras que España se encuentra entre los países que más pescado consumen de la UE (Agudo et al., 2009).

En la población boliviana, el consumo de legumbres y verduras se asoció negativamente con Σ PCBs en muestras de tejido adiposo en los modelos ajustados por sexo, edad y el IMC. Encontramos una asociación negativa igualmente en la población española, entre el consumo de legumbres y los niveles séricos de PCB-138. En el caso de la fruta, esta no se asoció a los niveles hallados en ninguna de las dos cohortes.

7.5.2 Exposición a COPs como posible factor etiológico del síndrome metabólico (SM)

Los resultados obtenidos en la cohorte GraMo y la discusión pormenorizada que acompaña a los Objetivos 3 y 4 del presente trabajo nos han inducido a establecer un vínculo entre ambos objetivos según el cual la exposición a COPs, obesidad, trastornos del metabolismo lipídico y diabetes deben ser consideradas de forma conjunta. En este apartado abordamos la hipótesis de la disrupción endocrina y metabólica y sentamos las bases para su estudio.

El síndrome metabólico (SM) incluye un conjunto de patologías consideradas como factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, que incluyen exceso de grasa corporal, hipertensión arterial, dislipemia y una elevada concentración de glucosa en sangre (Eze et al., 2015). Según la definición de la National Cholesterol Education Program (NCEP), una persona padece SM cuando presenta tres o más de los mencionados factores de riesgo (Bhowmik et al., 2015). El SM se caracteriza, por tanto, por la convergencia de varios factores de riesgo cardiovascular en un solo sujeto, con un marcado carácter de alteración metabólica subyacente.

Los problemas de hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes tipo 2 han sido tradicionalmente asociados a personas de edad avanzada. Sin embargo, en la sociedad actual está aumentando sensiblemente la prevalencia de estas patologías en personas jóvenes (Heindel et al., 2015). Las probabilidades de desarrollar este tipo de problemas aumentan cuando la persona padece sobrepeso, y hoy en día, muchos niños y adolescentes caen dentro de esta categoría (Hillman et al., 2009). Además, existe una tendencia al aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adolescentes y niños. Así, algunos ejemplos de prevalencia de obesidad en este grupo de edad son: Medio Oriente, 7%; Norte de África, 8%; y América Latina y el Caribe, 4,5-7% (Speiser et al., 2005).

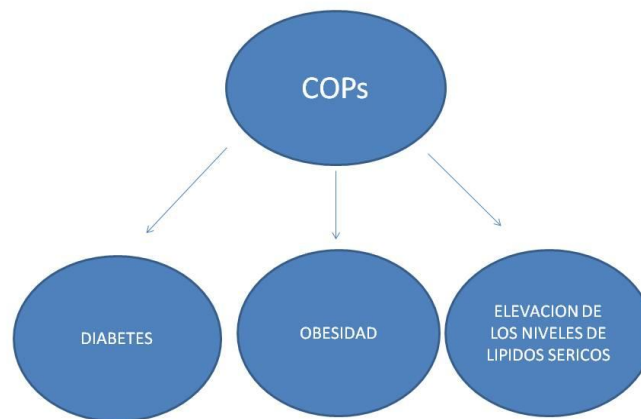


Figura 11. Asociaciones encontradas entre la exposición a COPs y factores relacionados con SM en la cohorte GraMo

El análisis combinado de los resultados del presente trabajo sugieren una posible relación entre la exposición histórica a COPs con los niveles lípidos séricos y la obesidad, de una parte, y con un mayor riesgo de diabetes en relación con la exposición a COPs de otra parte, pero en la misma cohorte poblacional. Esto sugiere que diversos COPs estarían relacionados con factores de riesgo individuales, haciendo de la exposición global a estas sustancias un condicionante importante del SM y, por tanto, de enfermedad cardiovascular, que es una de las causas de mortalidad más frecuentes en el mundo (Goncharov et al., 2008).

Se ha demostrado que el tejido adiposo es un importante productor de citoquinas y hormonas, por ejemplo, la leptina (regulador del apetito), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), interleucina-6 (IL-6), resistina y adiponectina, interviniendo así en diversas funciones del organismo como el metabolismo lipídico, la homeostasis energética, el apetito, la termogénesis, la función reproductiva, el sistema inmunológico, la hemostasis, la presión arterial y la angiogénesis (Kershaw and Flier, 2004; Kolovou et al., 2014). Por lo tanto, el tejido adiposo es ahora considerado un órgano endocrino y por tanto una diana potencial para los disruptores endocrinos. En nuestros estudios, la asociación entre los niveles de COPs en tejido adiposo y el grado de obesidad (IMC) es destacable a pesar de la

complejidad de su interpretación. Por el contrario, la exposición a COPs medida en suero dio resultados contradictorios, ya que se encontraron tanto asociaciones positivas como negativas respecto al IMC.

Los resultados del presente trabajo de tesis doctoral sugieren la necesidad de esclarecer de forma más sólida el sentido de la asociación entre el grado de obesidad y la exposición a COPs. Esto es debido a que, si atendemos a la teoría de los obesógenos, la exposición a estos contaminantes podría considerarse como causa de la obesidad (García-Mayor et al., 2012), pero también podría darse el caso de que los niveles elevados de COPs fueran el resultado de una mayor ingesta de grasas por parte de la población obesa (Darnerud et al., 2006; Tornkvist et al., 2011). Además, y como ya se explicó con anterioridad en el apartado correspondiente, es necesario tener en cuenta el efecto dilución que tendría una elevada cantidad de grasa corporal sobre las concentraciones de COPs. Esta cuestión se hace incluso más compleja si tenemos en cuenta que las poblaciones presentan patrones dietéticos y de estilo de vida específicos, por lo que se hace indispensable el estudio de poblaciones específicas antes de asumir los resultados generados en otras cohortes (Arrebola et al., 2012c). Se estima que el tejido adiposo juega un papel muy importante en la génesis de la diabetes y enfermedades cardiovasculares (Ogunbode et al., 2011), aunque las causas no son del todo conocidas. Nuestros propios resultados, comparados y confrontados con los de otros autores, sugieren que los COPs almacenados en el tejido adiposo a lo largo de la vida podrían ser una de las causas de esta asociación (Lee et al., 2007b; Porta, 2006b)

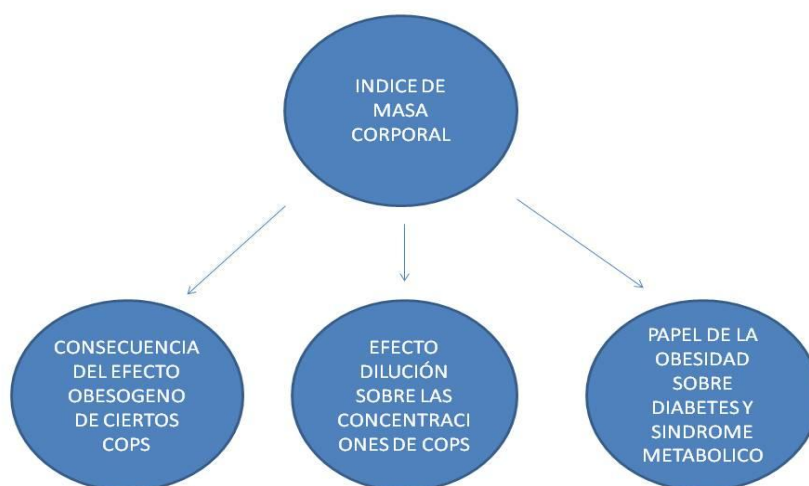


Figura 12. Posibles escenarios para la relación entre el índice de masa corporal y las concentraciones de COPs y la aparición de enfermedades de carácter metabólico

La existencia de compuestos químicos, contaminantes ambientales, que pueden ejercer efectos diversos sobre el metabolismo abre un interesante debate sobre la patogenia de enfermedades comunes y sustenta el concepto enunciado por Casas-Casas Desvergne (Casals-Casas and Desvergne, 2011) sobre la hipótesis de disrupción metabólica, en la que se engloba tanto el concepto de obesógenos como otras alteraciones en el metabolismo. No sólo existen compuestos que funcionan como obesógenos, sino que se evidencian aquellos que actúan a otros niveles, promoviendo otros aspectos del SM como la diabetes (Heindel et al., 2015).

La complejidad del estudio de los múltiples efectos de los COPs en su capacidad de disruptora de sistemas hormonales y metabolismo se acompaña de la propia complejidad de la regulación de la homeostasis hormonal en los organismos vivos. Las interacciones de los COPs con los sistemas biológicos y los mecanismos de acción a muy diferentes niveles son tan solo parcialmente conocidos y ahora empezamos a tener evidencia de su intervención en la patogenia de procesos complejos. Creemos que es un objetivo de continuidad de este trabajo de tesis doctoral el proveer a los investigadores con argumentos de peso para que incluyan la hipótesis disruptora endocrina y metabólica entre las premisas de trabajo y a los responsables de los programas de salud pública con pruebas suficientemente sólidas para actuar de forma preventiva limitando la exposición en poblaciones especialmente sensibles.

8. Conclusiones

El análisis pormenorizado de los resultados experimentales del presente trabajo y su discusión a la luz de las investigaciones más recientes en este campo, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. Desde el punto de vista sanitario, la exposición humana a plaguicidas organoclorados y PCBs en España es relevante, ya que a pesar de la prohibición de uso de estos compuestos químicos, la totalidad de la población estudiada presenta niveles detectables de, al menos, uno de los COPs investigados (HCB, *p,p'*-DDE y PCBs 138, 153 y 180). Las concentraciones (medianas) oscilaron entre 0,24 y 1,04 ng/ml para el HCB y el *p,p'*-DDE, respectivamente. Comparando con estudios previos, se ponen de manifiesto tanto la tendencia decreciente a lo largo del tiempo de los niveles de la mayoría de los COPs, así como importantes diferencias regionales en el grado de exposición. Determinantes de la exposición han resultado ser el sexo, la edad y el IMC entre las características individuales, así como la lactancia recibida, la transferencia transplacentaria y el consumo de alimentos grasos de origen animal, entre las posibles vías y fuentes de exposición.

2. El presente trabajo supone el primer estudio de biomonitorización de la exposición humana a COPs en Bolivia y muestra, tal y como ocurre en la población española, que la mayoría de la población boliviana presenta niveles detectables de PCBs en el organismo. Las concentraciones en suero (medias geométricas) se situaron en el rango 26,7-59,0 ng/g de lípido para los PCB-180 y 153 y en tejido adiposo en el rango 41,0-105,0 ng/g de lípido para los PCB-180 y 138. Se trata de unas concentraciones en el rango medio-bajo en comparación con estudios similares en Europa y Norteamérica, probablemente debido al menor grado de industrialización del país. Los principales predictores de las concentraciones en sangre incluyen la ocupación relacionada con actividad industrial y el consumo de alimentos grasos, mientras que para las concentraciones en tejido adiposo fueron la edad, el hábito tabáquico, el consumo de alimentos grasos y la residencia.

3. Dado el carácter lipofílico de los compuestos estudiados en este trabajo ha sido del mayor interés investigar la asociación entre la exposición a COPs y el metabolismo lipídico. A este respecto dos observaciones deben ser destacadas:

i) en el análisis multivariante, las concentraciones de HCB evidenciaron una asociación cuadrática con los niveles de colesterol total, HDL, LDL y lípidos totales en suero; del mismo modo, los niveles de PCB-138 y 180 se asociaron de la misma forma con los triglicéridos y lípidos totales en suero, y PCB-153 con LDL; además los residuos de HCB, *p*, *p'*-DDE, y β -HCH mostraron asociaciones de segundo grado con el IMC.

ii) todos los modelos cuadráticos mostraron una tendencia positiva en los niveles bajos de exposición, mientras que la pendiente disminuyó o incluso se convirtió en negativa en los niveles de exposición más altos.

Nuestros resultados sugieren una posible relación entre la exposición histórica a COPs y lípidos séricos / obesidad, que sigue un patrón no lineal en la mayoría de los casos. La hipótesis que planteamos es que los COPs presentes en los alimentos ricos en grasa pueden ser promotores de las alteraciones en los lípidos séricos y la obesidad. Ambas situaciones, exposición a COPs y trastornos lipídicos, se asocian con un elevado consumo de alimentos grasos, por lo que tal y como ha sido propuesto por otros investigadores, se requieren más estudios sobre el papel de los contaminantes lipofílicos presentes en la dieta.

4. La interferencia de los compuestos químicos disruptores endocrinos, como es el caso de los COPs estudiados, sobre la homeostasis hormonal y el metabolismo es un hecho confirmado en esta tesis doctoral, ya que los niveles de *p,p'*-DDE, principal metabolito del plaguicida DDT, presentes en el tejido adiposo se asociaron positivamente con la prevalencia de diabetes tipo 2, independientemente de la edad de los individuos, su sexo o su IMC. Es de resaltar el papel que juega la obesidad, aparentemente paradójico, en esta asociación de tal manera que la linealidad existente entre la concentración de *p,p'*-DDE y riesgo de diabetes tipo 2 para las personas con un IMC inferior a 30 kg/m², se pierde en el caso de los individuos mas obesos, obteniéndose una figura en forma de U-invertida. Este tipo de asociación, así como las dificultades en su interpretación, se ha

descrito con anterioridad en la relación entre la exposición a DE y enfermedad. No se puede descartar un efecto dilución, es decir, que las personas más obesas a pesar de tener una mayor carga bruta de COPs en el organismo, presenten aparentemente concentraciones más bajas al considerar su alto IMC. Nuevos estudios deberían aclarar el verdadero papel de la obesidad en la exposición a COPs, ya que podría ser tanto causa como efecto o, incluso, factor mediador del efecto.

9. Bibliografía

References

- Addae C, Cheng H, Martinez-Ceballos E. Effect of the environmental pollutant hexachlorobenzene (HCB) on the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 5244-5256.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma, and delta-hexachlorocyclohexane. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43.pdf>. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Ga., 2005.
- Agudo A, Goni F, Etxeandia A, Vives A, Millan E, Lopez R, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Jakszyn P, Larranaga N, Martinez C, Navarro C, Rodriguez L, Sanchez MJ, Tormo MJ, Gonzalez CA. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: determinants of serum concentrations. *Environ Res* 2009; 109: 620-628.
- Ahlborg UG, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, Hsieh CC, Hanberg A, Baron J, Trichopoulos D, Adami HO. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25: 463-531.
- Airaksinen R, Rantakokko P, Eriksson JG, Blomstedt P, Kajantie E, Kiviranta H. Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. *Diabetes Care* 2011; 34: 1972-1979.
- Albertini RJ. The use and interpretation of biomarkers of environmental genotoxicity in humans. *Biotherapy* 1998; 11: 155-167.
- Alegria EE, Castellano Vazquez JM, Alegria BA. [Obesity, metabolic syndrome and diabetes: cardiovascular implications and therapy]. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61: 752-764.
- Alvarez-Pedrerol M, Guxens M, Ibarluzea J, Rebagliato M, Rodriguez A, Espada M, Goni F, Basterrechea M, Sunyer J. Organochlorine compounds, iodine intake, and thyroid hormone levels during pregnancy. *Environ Sci Technol* 2009; 43: 7909-7915.
- Aminov Z, Haase RF, Pavuk M, Carpenter DO. Analysis of the effects of exposure to polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides on serum lipid levels in residents of Anniston, Alabama. *Environ Health* 2013; 12: 108.
- Antweiler RC, Taylor HE. Evaluation of statistical treatments of left-censored environmental data using coincident uncensored data sets: I. Summary statistics. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 3732-3738.
- Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006; 147: S43-S49.
- Apostoli P, Magoni M, Bergonzi R, Carasi S, Indelicato A, Scarcella C, Donato F. Assessment of reference values for polychlorinated biphenyl concentration in human blood. *Chemosphere* 2005; 61: 413-421.

Archibeque-Engle SL, Tessari JD, Winn DT, Keefe TJ, Nett TM, Zheng T. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J Toxicol Environ Health* 1997; 52: 285-293.

Aronson KJ, Miller AB, Woolcott CG, Sterns EE, McCreedy DR, Lickley LA, Fish EB, Hiraki GY, Holloway C, Ross T, Hanna WM, SenGupta SK, Weber JP. Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 55-63.

Arrebola JP, Cuellar M, Claire E, Quevedo M, Antelo SR, Mutch E, Ramirez E, Fernandez MF, Olea N, Mercado LA. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. *Environ Res* 2012a; 112: 40-47.

Arrebola JP, Fernandez MF, Molina-Molina JM, Martin-Olmedo P, Exposito J, Olea N. Predictors of the total effective xenoestrogen burden (TEXB) in human adipose tissue. A pilot study. *Reprod Toxicol* 2012b; 33: 45-52.

Arrebola JP, Fernandez MF, Olea N, Ramos R, Martin-Olmedo P. 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, Fernandez MF, Porta M, Rosell J, de la Ossa RM, Olea N, Martin-Olmedo P. Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ Int* 2010; 36: 705-713.

Arrebola JP, Martin-Olmedo P, Fernandez MF, Sanchez-Cantalejo E, Jimenez-Rios JA, Torne P, Porta M, Olea N. Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: A multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ Int* 2009; 35: 27-32.

Arrebola JP, Mutch E, Rivero M, Choque A, Silvestre S, Olea N, Ocaña-Riola R, Mercado LA. Contribution of sociodemographic characteristics, occupation, diet and lifestyle to DDT and DDE concentrations in serum and adipose tissue from a Bolivian cohort. *Environ Int* 2012c; 38: 54-61.

Arrebola JP, Pumarega J, Gasull M, Fernandez MF, Martin-Olmedo P, Molina-Molina JM, Fernandez-Rodriguez M, Porta M, Olea N. Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ Res* 2013b; 122: 31-37.

Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, Swanson H, Cassis LA. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 761-768.

ATSDR. Toxicological Profile for Hexachlorobenzene. 1996. Atlanta, GA, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Ref Type: Report

ATSDR. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2000. Atlanta, US Department of Health and Human Services.

Ref Type: Generic

Aurrekoetxea Agirre JJ, Zubero MB, Jimenez Garcia C, Goñi Irigoyen F, Cambra Contin K, Alonso Fustel E, Cadiñanos Diaz-Tejeiro MC. Exposure to lindane, other pesticides and organochlorines in the general population Barakaldo, Spain. *Rev Esp Salud Publica* 2011; 85: 189-204.

Auxietre TA, Dumontier MF, Balguy I, Frapart Y, Canivenc-Lavier MC, Berges R, Boudalia S, Auger J, Corvol MT, Savouret JF. Sub-NOAEL amounts of vinclozolin and xenoestrogens target rat chondrogenesis in vivo. *Biochimie* 2014; 99: 169-177.

Baars AJ, Bakker MI, Baumann RA, Boon PE, Freijer JI, Hoogenboom LA, Hoogerbrugge R, van Klaveren JD, Liem AK, Traag WA, de VJ. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol Lett* 2004; 151: 51-61.

Ballester F, Saez M, Daponte A, Ordonez JM, Taracido M, Cambra K, Arribas F, Bellido JB, Guillen JJ, Aguinaga I, Canada A, Lopez E, Iniguez C, Rodriguez P, Perez-Hoyos S, Barcelo MA, Ocana R, Aranguiz E. [The EMECAS Project: Spanish multicentre study on short-term health effects of air pollution]. *Rev Esp Salud Publica* 2005; 79: 229-242.

Barquero M, Constenla MA. [Organochlorine pesticide residues in human adipose tissue in Costa Rica]. *Rev Biol Trop* 1986; 34: 7-12.

Ben HS, Hammami B, Ben AW, El mY, Barhoumi B, El AR, Driss MR. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and their relation with age, gender, and BMI for the general population of Bizerte, Tunisia. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014; 21: 6303-6313.

Bergonzi R, De PG, Tomasi C, Ricossa MC, Apostoli P. Evaluation of different methods to determine total serum lipids for normalization of circulating organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 2009; 82: 1241-1247.

Berk M, Williams LJ, Andreazza AC, Pasco JA, Dodd S, Jacka FN, Moylan S, Reiner EJ, Magalhaes PV. Pop, heavy metal and the blues: secondary analysis of persistent organic pollutants (POP), heavy metals and depressive symptoms in the NHANES National Epidemiological Survey. *BMJ Open* 2014; 4: e005142.

Bhalla M, Thami GP. Reversible neurotoxicity after an overdose of topical lindane in an infant. *Pediatr Dermatol* 2004; 21: 597-599.

Bhatia R, Shiao R, Petreas M, Weintraub JM, Farhang L, Eskenazi B. Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 220-224.

Bhowmik B, Afsana F, Siddiquee T, Munir SB, Sheikh F, Wright E, Bhuiyan FR, Ashrafuzzaman SM, Mahtab H, Azad Khan AK, Hussain A. Comparison of the prevalence of metabolic syndrome and its association with diabetes and cardiovascular disease in the rural population of Bangladesh using the modified National Cholesterol Education Program Expert Panel Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation definitions. *J Diabetes Investig* 2015; 6: 280-288.

Billi de Catabbi SC, Faletti A, Fuentes F, San Martin de Viale LC, Cochon AC. Hepatic arachidonic acid metabolism is disrupted after hexachlorobenzene treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 187-195.

Birnbaum LS, Staskal-Wikoff DS. 5th International PCB Workshop--summary and implications. *Environ Int* 2010; 36: 814-818.

Bissantz C, Folkers G, Rognan D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem* 2000; 43: 4759-4767.

Bjermo H, Darnerud PO, Pearson M, Barbieri HE, Lindroos AK, Nalsen C, Lindh CH, Jonsson BA, Glynn A. Serum concentrations of perfluorinated alkyl acids and their associations with diet and personal characteristics among Swedish adults. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 2206-2215.

Boada LD, Lara PC, Alvarez-Leon EE, Losada A, Zumbado ML, Liminana-Canal JM, Apolinario R, Serra-Majem L, Luzardo OP. Serum levels of insulin-like growth factor-I in relation to organochlorine pesticides exposure. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17: 506-511.

Boada LD, Sangil M, Alvarez-Leon EE, Hernandez-Rodriguez G, Henriquez-Hernandez LA, Camacho M, Zumbado M, Serra-Majem L, Luzardo OP. Consumption of foods of animal origin as determinant of contamination by organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls: results from a population-based study in Spain. *Chemosphere* 2014; 114: 121-128.

Bonefeld-Jorgensen EC. Biomonitoring in Greenland: human biomarkers of exposure and effects - a short review. *Rural Remote Health* 2010; 10: 1362.

Bosch de Basea M, Porta M, Alguacil J, Puigdomenech E, Gasull M, Garrido JA, Lopez T. Relationships between occupational history and serum concentrations of organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. *Occup Environ Med* 2011; 68: 332-338.

Brauner EV, Raaschou-Nielsen O, Gaudreau E, Leblanc A, Tjonneland A, Overvad K, Sorensen M. Predictors of Polychlorinated Biphenyl Concentrations in Adipose Tissue in a General Danish Population. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 679-685.

Brauner EV, Raaschou-Nielsen O, Gaudreau E, Leblanc A, Tjonneland A, Overvad K, Sorensen M. Predictors of adipose tissue concentrations of organochlorine pesticides in a general Danish population. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2012a; 22: 52-59.

Brauner EV, Sorensen M, Gaudreau E, Leblanc A, Eriksen KT, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. A prospective study of organochlorines in adipose tissue and risk of nonHodgkin lymphoma. *Environ Health Perspect* 2012b; 120: 105-111.

Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2012; 122: 3035-3043.

Bridgen P. Protecting Native Americans through the risk assessment process: A commentary on "an examination of U.S. EPA risk assessment principles and practices". *Integr Environ Assess Manag* 2005; 1: 83-85.

Brown JF Jr, Lawton RW. Polychlorinated biphenyl (PCB) partitioning between adipose tissue and serum. *Bull Environ Contam Toxicol* 1984; 33: 277-280.

Burgaz S, Afkham BL, Karakaya AE. Organochlorine pesticide contaminants in human adipose tissue collected in Ankara (Turkey) 1991-1992. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994; 53: 501-508.

Cabral JR, Shubik P, Mollner T, Raitano F. Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in hamsters. *Nature* 1977; 269: 510-511.

Campoy, C, Jiménez, M, Olea-Serrano MF, Moreno-Frias, M, Cañabate, F, Olea, N, Bayes, R, and Molina-Font, JA. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Human Development* 65(S), 183-190. 2001.

Ref Type: Abstract

Camps M, Planas J, Gomez-Catalan J, Sabroso M, To-Figueras J, Corbella J. Organochlorine residues in human adipose tissue in Spain: study of an agrarian area

20. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989; 42: 195-201.

Carreno J, Rivas A, Granada A, Jose Lopez-Espinosa M, Mariscal M, Olea N, Olea-Serrano F. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 2007; 103: 55-61.

Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 2011; 73: 135-162.

Castano-Vinyals G, Aragones N, Perez-Gomez B, Martin V, Llorca J, Moreno V, Altzibar JM, Ardanaz E, de SS, Jimenez-Moleon JJ, Tardon A, Alguacil J, Peiro R, Marcos-Gragera R, Navarro C, Pollan M, Kogevinas M. Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): rationale and study design. *Gac Sanit* 2015.

CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Atlanta.

Ref Type: Report

Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Ibarluzea J, Exposito J, Torne P, Laguna J, Pedraza V, Olea N. Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 2006; 62: 1917-1924.

Chamorro-Garcia R, Blumberg B. Transgenerational effects of obesogens and the obesity epidemic. *Curr Opin Pharmacol* 2014; 19: 153-158.

Chevrier J, Warner M, Gunier RB, Brambilla P, Eskenazi B, Mocarelli P. Serum dioxin concentrations and thyroid hormone levels in the Seveso Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 2014; 180: 490-498.

Choi W, Eum SY, Lee YW, Hennig B, Robertson LW, Toborek M. PCB 104-induced proinflammatory reactions in human vascular endothelial cells: relationship to cancer metastasis and atherogenesis. *Toxicol Sci* 2003; 75: 47-56.

Chowdhury, AR, Venkatakrishna-Bhatt, H, and Gautam, AK. Testicular changes of rats under lindane treatment. *Bull Environ Contam Toxicol* 38, 154-156. 1987.

Ref Type: Abstract

Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1406-1414.

Colborn T. Pesticides--how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 6: 81-85.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans

1. Environ Health Perspect 1993; 101: 378-384.
- Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 2013; 307: 35-41.
- Cookman CJ, Belcher SM. Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex concentration response relationships for endocrine active compounds. *Curr Opin Pharmacol* 2014; 19: 112-119.
- Covaci A, Voorspoels S, Roosens L, Jacobs W, Blust R, Neels H. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. *Chemosphere* 2008.
- Crinnion WJ. Chlorinated pesticides: threats to health and importance of detection. *Altern Med Rev* 2009; 14: 347-359.
- Croutch CR, Lebofsky M, Schramm KW, Terranova PF, Rozman KK. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) alter body weight by decreasing insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling. *Toxicol Sci* 2005; 85: 560-571.
- Daglioglu N, Gulmen MK, Akcan R, Efeoglu P, Yener F, Unal I. Determination of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Cukurova, Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol* 2010; 85: 97-102.
- Darnerud PO, Atuma S, Aune M, Bjerselius R, Glynn A, Grawe KP, Becker W. Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1597-1606.
- De CS, van LN. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012; 2012: 713696.
- Domingo JL, Bocio A. Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environ Int* 2007; 33: 397-405.
- Domingo-Salvany A, Regidor E, Alonso J, Alvarez-Dardet C. [Proposal for a social class measure. Working Group of the Spanish Society of Epidemiology and the Spanish Society of Family and Community Medicine]. *Aten Primaria* 2000; 25: 350-363.
- Donato F, Zani C, Magoni M, Gelatti U, Covolo L, Orizio G, Speziani F, Indelicato A, Scarcella C, Bergonzi R, Apostoli P. Polychlorinated biphenyls and thyroid hormone serum concentrations among people living in a highly polluted area: a cross-sectional population-based study. *Environ Res* 2008; 108: 380-386.
- Eens M, Jaspers VL, Van den Steen E, Bateson M, Carere C, Clergeau P, Costantini D, Dolenc Z, Elliott JE, Flux J, Gwinner H, Halbrook RS, Heeb P, Mazgajski TD, Moksnes A, Polo V, Soler JJ, Sinclair R, Veiga JP, Williams TD, Covaci A, Pinxten R. Can starling eggs be useful as a biomonitoring tool to study organohalogenated contaminants on a worldwide scale? *Environ Int* 2013; 51: 141-149.
- Eguchi A, Nomiyama K, Devanathan G, Subramanian A, Bulbule KA, Parthasarathy P, Takahashi S, Tanabe S. Different profiles of anthropogenic and naturally produced organohalogen compounds in serum from residents living near a coastal area and e-waste recycling workers in India. *Environ Int* 2012; 47: 8-16.

EPA. Environmental Fate and Effects Division, Pesticide Environmental Fate One Line Summary: DDT (p, p'). 1989. Washington, DC, **US Environmental Protection Agency**.

Ref Type: Report

Eriksson P, Talts U. Neonatal exposure to neurotoxic pesticides increases adult susceptibility: a review of current findings. *Neurotoxicology* 2000; 21: 37-47.

Everett CJ, Matheson EM. Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999-2004 national health and nutrition examination survey. *Environ Int* 2010; 36: 398-401.

Eze IC, Schaffner E, Foraster M, Imboden M, von EA, Gerbase MW, Rothe T, Rochat T, Kunzli N, Schindler C, Probst-Hensch N. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Metabolic Syndrome in Adults. *PLoS One* 2015; 10: e0130337.

Faerch K, Hojlund K, Vind BF, Vaag A, Dalgard C, Nielsen F, Grandjean P. Increased Serum Concentrations of Persistent Organic Pollutants among Prediabetic Individuals: Potential Role of Altered Substrate Oxidation Patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E1705-E1713.

Feldmann RJ, Maibach HI. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974; 28: 126-132.

Fernandez J, Arjol MA, Cacho C. POP-contaminated sites from HCH production in Sabinanigo, Spain. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20: 1937-1950.

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

Fernandez MF, Kiviranta H, Molina-Molina JM, Laine O, Lopez-Espinosa MJ, Vartiainen T, Olea N. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere* 2008b; 71: 1196-1205.

Fernandez MF, Olmos B, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, Cruz M, Olea-Serrano F, Olea N. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 2007a; 115 Suppl 1: 8-14.

Fernandez MF, Santa-Marina L, Ibarluzea JM, Exposito J, Aurrekoetxea JJ, Torne P, Laguna J, Rueda AI, Pedraza V, Olea N. Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: A biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *Eur J Cancer* 2007b; 43: 1290-1299.

Fernandez-Berges D, Cabrera de LA, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, Vega-Alonso T, Felix-Redondo FJ, Ortiz-Marron H, Rigo F, Lama C, Gavrila D, Segura-Fragoso A, Lozano L, Marrugat J. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012; 65: 241-248.

Ferrer A. [Pesticide poisoning]. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26 Suppl 1: 155-171.

Ferrer A, Bona MA, Castellano M, To-Figueras J, Brunet M. Organochlorine residues in human adipose tissue of the population of Zaragoza (Spain). *Bull Environ Contam Toxicol* 1992; 48: 561-566.

Forde MS, Dewailly E. What Is in the Caribbean Baby? Assessing Prenatal Exposures and Potential Health Outcomes to Environmental Contaminants in 10 Caribbean Countries. *West Indian Med J* 2015; 64.

Freire C, Koifman RJ, Koifman S. Hematological and hepatic alterations in Brazilian population heavily exposed to organochlorine pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 2015; 78: 534-548.

Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le PY, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 144-159.

Gallo MV, Schell LM, DeCaprio AP, Jacobs A. Levels of persistent organic pollutant and their predictors among young adults. *Chemosphere* 2011; 83: 1374-1382.

Garcia AM. Pesticide exposure and women's health. *Am J Ind Med* 2003; 44: 584-594.

Garcia AM, Boix P, Canosa C. Why do workers behave unsafely at work? Determinants of safe work practices in industrial workers. *Occup Environ Med* 2004; 61: 239-246.

Garcia-Mayor RV, Larranaga VA, Docet Caamano MF, Lafuente GA. [Endocrine disruptors and obesity: obesogens]. *Endocrinol Nutr* 2012; 59: 261-267.

Gascon M, Verner MA, Guxens M, Grimalt JO, Forn J, Ibarluzea J, Lertxundi N, Ballester F, Llop S, Haddad S, Sunyer J, Vrijheid M. Evaluating the neurotoxic effects of lactational exposure to persistent organic pollutants (POPs) in Spanish children. *Neurotoxicology* 2013; 34: 9-15.

Gaskins AJ, Schisterman EF. The effect of lipid adjustment on the analysis of environmental contaminants and the outcome of human health risks. *Methods Mol Biol* 2009; 580: 371-381.

Gasull M, Bosch de BM, Puigdomenech E, Pumarega J, Porta M. Empirical analyses of the influence of diet on human concentrations of persistent organic pollutants: A systematic review of all studies conducted in Spain. *Environ Int* 2011; 37: 1226-1235.

Gasull M, Pumarega J, Tellez-Plaza M, Castell C, Tresserras R, Lee DH, Porta M. Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of catalonia. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 7799-7810.

Glynn A, Aune M, Darnerud PO, Cnattingius S, Bjerselius R, Becker W, Lignell S. Determinants of serum concentrations of organochlorine compounds in Swedish pregnant women: a cross-sectional study. *Environ Health* 2007; 6: 2.

Glynn AW, Granath F, Aune M, Atuma S, Darnerud PO, Bjerselius R, Vainio H, Weiderpass E. Organochlorines in Swedish women: determinants of serum concentrations. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 349-355.

Gomez-Catalan J, Planas J, To-Figueras J, Camps M, Corbella J. Organochlorine pesticide residues in the population of Catalonia (Spain). *Bull Environ Contam Toxicol* 1993; 51: 160-164.

Goncharov A, Haase RF, Santiago-Rivera A, Morse G, McCaffrey RJ, Rej R, Carpenter DO. High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a Native American population. *Environ Res* 2008; 106: 226-239.

Gonzalez CA, Kogevinas M, Huici A, Gadea E, Ladona M, Bosch A, Bleda MJ. Blood levels of polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in the general population of a Spanish Mediterranean city. *Chemosphere* 1998; 36: 419-426.

Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health* 79, 340-349. 1989.

Ref Type: Abstract

Grun F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8: 161-171.

Grun F, Blumberg B. Endocrine disrupters as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 304: 19-29.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 367-377.

Guo YL, Emmett EA, Pellizzari ED, Rohde CA. Influence of serum cholesterol and albumin on partitioning of PCB congeners between human serum and adipose tissue. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 87: 48-56.

Hansen S, Nieboer E, Odland JO, Wilsgaard T, Veyhe AS, Sandanger TM. Levels of organochlorines and lipids across pregnancy, delivery and postpartum periods in women from Northern Norway. *J Environ Monit* 2010; 12: 2128-2137.

Hardell E, Carlberg M, Nordstrom M, van BB. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993-2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci Total Environ* 2010; 408: 4412-4419.

Hayes W, Laws E. Handbook of pesticide toxicology. Academic Press, Inc, 1991, 743-780 pp.

Heindel JJ, vom Saal FS, Blumberg B, Bovolín P, Calamandrei G, Ceresini G, Cohn BA, Fabbri E, Gioiosa L, Kassotis C, Legler J, La MM, Rizzir L, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, Montanini L, Molteni L, Nagel SC, Parmigiani S, Panzica G, Paterlini S, Pomatto V, Ruzzin J, Sartor G, Schug TT, Street ME, Suvorov A, Volpi R, Zoeller RT, Palanza P. Parma consensus statement on metabolic disruptors. *Environ Health* 2015; 14: 54.

Hennig B, Meerarani P, Slim R, Toborek M, Daugherty A, Silverstone AE, Robertson LW. Proinflammatory properties of coplanar PCBs: in vitro and in vivo evidence. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 181: 174-183.

Henriquez-Hernandez LA, Luzardo OP, Almeida-Gonzalez M, Alvarez-Leon EE, Serra-Majem L, Zumbado M, Boada LD. Background levels of polychlorinated biphenyls in the population of the Canary Islands (Spain). *Environ Res* 2011; 111: 10-16.

Hillman JB, Corathers SD, Wilson SE. Pediatricians and screening for obesity with body mass index: does level of training matter? *Public Health Rep* 2009; 124: 561-567.

Hjelmborg PS, Andreassen TK, Bonefeld-Jorgensen EC. Cellular uptake of lipoproteins and persistent organic compounds--an update and new data. *Environ Res* 2008; 108: 192-198.

Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 2000; 347: 321-337.

Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 79-105.

Hunter DJ, Hankinson SE, Laden F, Colditz GA, Manson JE, Willett WC, Speizer FE, Wolff MS. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997; 337: 1253-1258.

IARC. Report of an ad-hoc IARC *Monographs Advisory Group* on Priorities for Future Evaluations. 1998. International Agency for Research on Cancer. IARC Internal Report No. 98/004.

Ref Type: Report

Ibarluzea J, Alvarez-Pedrerol M, Guxens M, Marina LS, Basterrechea M, Lertxundi A, Etxeandia A, Goni F, Vioque J, Ballester F, Sunyer J. Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere* 2011; 82: 114-120.

INE. Bolivian National Institute of Statistics. <http://www.ine.gov.bo/>. 2010.

Ref Type: Electronic Citation

Jain RB, Wang RY. Regression models to estimate total polychlorinated biphenyls in the general US population: 2001-2002 and 2003-2004. *Chemosphere* 2010; 79: 243-252.

Jakszyn P, Goni F, Etxeandia A, Vives A, Millan E, Lopez R, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Larranaga N, Martinez C, Navarro C, Rodriguez L, Sanchez MJ, Tormo MJ, Gonzalez CA, Agudo A. Serum levels of organochlorine pesticides in healthy adults from five regions of Spain. *Chemosphere* 2009; 76: 1518-1524.

Jensen AA. Chemical contaminants in human milk

3. *Residue Rev* 1983; 89: 1-128.

Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1070.

Juberg DR. An evaluation of endocrine modulators: implications for human health. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000; 45: 93-105.

Kalantzi OI, Alcock RE, Johnston PA, Santillo D, Stringer RL, Thomas GO, Jones KC. The global distribution of PCBs and organochlorine pesticides in butter

2. *Environ Sci Technol* 2001; 35: 1013-1018.

Kalantzi OI, Geens T, Covaci A, Siskos PA. Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece. *Environ Int* 2011; 37: 349-353.

Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M, Palimeri S, Panidis D, Diamanti-Kandarakis E. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E480-E484.

Kang JH, Park H, Chang YS, Choi JW. Distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human serum from urban areas in Korea. *Chemosphere* 2008; 73: 1625-1631.

Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-163.

Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 1995; 375: 581-585.

Kennedy SM, Koehoorn M. Exposure assessment in epidemiology: does gender matter? *Am J Ind Med* 2003; 44: 576-583.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-2556.

Kininis M, Kraus WL. A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal* 2008; 6: e005.

Kirman CR, Aylward LL, Hays SM, Krishnan K, Nong A. Biomonitoring equivalents for DDT/DDE. *Regul Toxicol Pharmacol* 2011; 60: 172-180.

Kiviranta H. Exposure and human PCDD/F and PCB Body Burden in Finland. National Public Health Institute (KTL), Kuopio (Finland), 2005.

Knutsen HK, Kvalem HE, Haugen M, Meltzer HM, Brantsaeter AL, Alexander J, Papke O, Liane VH, Becher G, Thomsen C. Sex, BMI and age in addition to dietary intakes influence blood concentrations and congener profiles of dioxins and PCBs. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 772-782.

Kobayashi S, Sugaya T, Sakata N, Uebayasi M, Sameshima K, Tanaka A. Prediction of endocrine disruptors based on a new structure-activity relationship for sex and environmental hormones using chemical hardness concept. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001; 49: 680-688.

Kohlmeier L, Kohlmeier M. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 3: 99-106.

Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Salpea KD, Mikhailidis DP. The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *Am J Med Sci* 2007; 333: 362-371.

Kolovou GD, Kolovou V, Kostakou PM, Mavrogeni S. Body mass index, lipid metabolism and estrogens: their impact on coronary heart disease. *Curr Med Chem* 2014; 21: 3455-3465.

Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* 2007; 115 Suppl 1: 106-114.

Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N. Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women

57. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 589-599.
- Kroon LA. Drug interactions with smoking. Am J Health Syst Pharm 2007; 64: 1917-1921.
- Kupferschmidt K. Dioxin scandal triggers food debate in Germany. CMAJ 2011; 183: E221-E222.
- Laden F, Neas LM, Spiegelman D, Hankinson SE, Willett WC, Ireland K, Wolff MS, Hunter DJ. Predictors of plasma concentrations of DDE and PCBs in a group of U.S. women. Environ Health Perspect 1999; 107: 75-81.
- Lazaro R, Herrera A, Conchello MP, Arino AA, Bayarri S, Yague C, Peiro JM. Levels of selected polychlorinated biphenyl congeners in total diet samples from Aragon, Spain. J Food Prot 1999; 62: 1054-1058.
- Lee DH, Lee IK, Porta M, Steffes M, Jacobs DR, Jr. Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. Diabetologia 2007a; 50: 1841-1851.
- Lee DH, Lee IK, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, Jacobs DR, Jr. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. Diabetes Care 2006; 29: 1638-1644.
- Lee DH, Lee IK, Steffes M, Jacobs DR, Jr. Extended analyses of the association between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes. Diabetes Care 2007b; 30: 1596-1598.
- Lee DH, Lind PM, Jacobs DR, Jr., Salihovic S, van BB, Lind L. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plasma predict development of type 2 diabetes in the elderly: the prospective investigation of the vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. Diabetes Care 2011a; 34: 1778-1784.
- Lee DH, Steffes MW, Sjodin A, Jones RS, Needham LL, Jacobs DR, Jr. Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case-control study. Environ Health Perspect 2010; 118: 1235-1242.
- Lee DH, Steffes MW, Sjodin A, Jones RS, Needham LL, Jacobs DR, Jr. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. PLoS One 2011b; 6: e15977.
- Li J, Li N, Ma M, Giesy JP, Wang Z. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. Toxicol Lett 2008; 183: 65-71.
- Liu J, Schelar E. Pesticide exposure and child neurodevelopment: summary and implications. Workplace Health Saf 2012; 60: 235-242.
- Llobet JM, Bocio A, Domingo JL, Teixido A, Casas C, Muller L. Levels of polychlorinated biphenyls in foods from Catalonia, Spain: estimated dietary intake. J Food Prot 2003; 66: 479-484.

Llop S, Ballester F, Vizcaino E, Murcia M, Lopez-Espinosa MJ, Rebagliato M, Vioque J, Marco A, Grimalt JO. Concentrations and determinants of organochlorine levels among pregnant women in Eastern Spain. *Sci Total Environ* 2010; 408: 5758-5767.

Lopes VM, Baptista M, Repolho T, Rosa R, Costa PR. Uptake, transfer and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquat Toxicol* 2014; 146: 205-211.

López-Flores I, González-Alzaga B, Casal A, Lacasaña M. Exposición laboral a plaguicidas y efectos en la salud: contribución de factores biológicos y sociales. In: Sanín-Aguirre LH, Cedillo L, Guevara-Godínez RM. Género Salud y Ambiente laboral. Género Salud y Ambiente laboral . Chihuahua, México, 2009.

Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE, Toppari J. Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24: 279-289.

Malaj E, von der Ohe PC, Grote M, Kuhne R, Mondy CP, Usseglio-Polatera P, Brack W, Schafer RB. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 9549-9554.

Martinez Vidal JL, Moreno FM, Garrido FA, Olea-Serrano F, Olea N. Determination of endocrine-disrupting pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum by GC-ECD and GC-MS-MS and evaluation of contributions to the uncertainty of the results. *Anal Bioanal Chem* 2002; 372: 766-775.

McTernan PG, Anderson LA, Anwar AJ, Eggo MC, Crocker J, Barnett AH, Stewart PM, Kumar S. Glucocorticoid regulation of p450 aromatase activity in human adipose tissue: gender and site differences. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1327-1336.

Medlock KL, Lyttle CR, Kelepouris N, Newman ED, Sheehan DM. Estradiol down-regulation of the rat uterine estrogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 196: 293-300.

Meeker JD, Altshul L, Hauser R. Serum PCBs, p,p'-DDE and HCB predict thyroid hormone levels in men. *Environ Res* 2007; 104: 296-304.

Mercado, L. A., Freille, S. M., Vaca-Pereira, J., Cuellar, M., Flores, L., Mutch, E., Olea, N., and Arrebola, J. P. Serum concentrations of p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDE) in a sample of agricultural workers from Bolivia. *Chemosphere* (in press) . 2013.

Ref Type: Abstract

Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 125-137.

Miller, W R. and Sharpe, R M. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related Cancer* 5, 89-96. 1998.

Ref Type: Abstract

Ministerio de Desarrollo Sostenible.

Plan Nacional de implementación de la República de Bolivia para el cumplimiento del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes.
<http://www.pops.int/documents/implementation/nips/submissions/bolivia.pdf>.

Viceministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Dirección General de Medio Ambiente. 2004. La Paz.

Ref Type: Report

Morales E, Gascon M, Martinez D, Casas M, Ballester F, Rodriguez-Bernal CL, Ibarluzea J, Marina LS, Espada M, Goni F, Vizcaino E, Grimalt JO, Sunyer J. Associations between blood persistent organic pollutants and 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Environ Int* 2013; 57-58: 34-41.

Moreno-Frias M., Jimenez TM, Garrido FA, Martinez Vidal JL, Olea-Serrano F, Olea N. Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 102-111.

Moser GA, McLachlan MS. The influence of dietary concentration on the absorption and excretion of persistent lipophilic organic pollutants in the human intestinal tract. *Chemosphere* 2001; 45: 201-211.

Mrema EJ, Rubino FM, Brambilla G, Moretto A, Tsatsakis AM, Colosio C. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 2013; 307: 74-88.

Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11603-11608.

Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 304: 84-89.

Nichols BR, Hentz KL, Aylward L, Hays SM, Lamb JC. Age-specific reference ranges for polychlorinated biphenyls (PCB) based on the NHANES 2001-2002 survey. *J Toxicol Environ Health A* 2007; 70: 1873-1877.

Nielsen JB, Nielsen F, Sorensen JA. In vitro percutaneous penetration of five pesticides--effects of molecular weight and solubility characteristics. *Ann Occup Hyg* 2004; 48: 697-705.

Odabasi M, Falay EO, Tuna G, Altioek H, Kara M, Dumanoglu Y, Bayram A, Tolunay D, Elbir T. Biomonitoring the spatial and historical variations of persistent organic pollutants (POPs) in an industrial region. *Environ Sci Technol* 2015; 49: 2105-2114.

Ogunbode AM, Ladipo M, Ajayi IO, Fatiregun AA. Obesity: An emerging disease. *Niger J Clin Pract* 2011; 14: 390-394.

Olea, N, Fernandez, M. F., Araque, P., and Olea-Serrano MF. Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit* 16[261], 267. 2002.

Ref Type: Abstract

Olea N, Fernandez MF, Martin-Olmedo P. Endocrine Disrupters. The Case of oestrogenic xenobiotics. *Rev Salud Ambient* 2001; 1: 6-11.

Olea N, Fernandez M. Endocrine disruption. *J Epidemiol Community Health* 2007; 61: 372-373.

Olea N, Olea-Serrano F, Lardelli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol Ind Health* 1999; 15: 151-158.

Oostenbrink BC, Pitera JW, van Lipzig MM, Meerman JH, van Gunsteren WF. Simulations of the estrogen receptor ligand-binding domain: affinity of natural ligands and xenoestrogens. *J Med Chem* 2000; 43: 4594-4605.

Orton F, Ermler S, Kugathas S, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A. Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013.

Payne J, Scholze M, Kortenkamp A. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 391-397.

Pearce N, de SS, Boffetta P, Kogevinas M, Saracci R, Savitz D. Limitations of biomarkers of exposure in cancer epidemiology. *Epidemiology* 1995; 6: 190-194.

Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol* 2011; 31: 363-373.

Perez-Maldonado IN, Herrera C, Batres LE, Gonzalez-Amaro R, Diaz-Barriga F, Yanez L. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ Res* 2005; 98: 177-184.

Phillips DL, Pirkle JL, Burse VW, Bernert JT, Jr., Henderson LO, Needham LL. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch Environ Contam Toxicol* 1989; 18: 495-500.

Pimenta AM, Bes-Rastrollo M, Gea A, Sayon-Orea C, Zazpe I, Lopez-Iracheta R, Martinez-Gonzalez MA. Snacking between main meals is associated with a higher risk of metabolic syndrome in a Mediterranean cohort: the SUN Project (Seguimiento Universidad de Navarra). *Public Health Nutr* 2015; 1-9.

PLAGBOL. PLAGBOL (Plaguicidas Bolivia, Salud, Agricultura y Medio Ambiente). . 2008.
Ref Type: Electronic Citation

PNA. Ministerio de Medioambiente. Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y del reglamento 850/2004. 2007.
Ref Type: Statute

Porta M. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002: response to Lee et al. *Diabetes Care* 2006a; 29: 2567.

Porta M. Persistent organic pollutants and the burden of diabetes. *Lancet* 2006b; 368: 558-559.

Porta M, Gasull M, Puigdomenech E, Gari M, de Basea MB, Guillen M, Lopez T, Bigas E, Pumarega J, Llebaria X, Grimalt JO, Tresserras R. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Catalonia. *Environ Int* 2010; 36: 655-664.

Porta M, Kogevinas M, Zumeta E, Sunyer J, Ribas-Fito N, Ruiz L, Jarrod M, Vioque J, Alguacil J, Martin P, Malats N, Ayude D. 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.

Porta M, Lopez T, Gasull M, Rodriguez-Sanz M, Gari M, Pumarega J, Borrell C, Grimalt JO. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Barcelona in 2006, and comparison with levels in 2002. *Sci Total Environ* 2012a.

Porta M, Malats N, Jarrod M, Grimalt JO, Rifa J, Carrato A, Guarner L, Salas A, Santiago-Silva M, Corominas JM, Andreu M, Real FX. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group
1. *Lancet* 1999; 354: 2125-2129.

Porta M, Puigdomenech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fito N, Dominguez-Boada L, Martin-Olmedo P, Olea N, Llop S, Fernandez M. [Studies conducted in Spain on concentrations in humans of persistent toxic compounds]. *Gac Sanit* 2008a; 22: 248-266.

Porta M, Puigdomenech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fito N, Llop S, Lopez T. Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: The international experience. *Environ Int* 2008b; 34: 546-561.

Porta M, Pumarega J, Gasull M. Number of persistent organic pollutants detected at high concentrations in a general population. *Environ Int* 2012b; 44: 106-111.

Porta M, Zumeta E, Ruiz L, Sunyer J, Kogevinas M, Ribas N, Jarrod M. Persistent toxic substances and public health in Spain. *Int J Occup Environ Health* 2003; 9: 112-117.

Quintana PJ, Delfino RJ, Korricks S, Ziogas A, Kutz FW, Jones EL, Laden F, Garshick E. Adipose tissue levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 854-861.

Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 917-921.

Recio-Vega R, Velazco-Rodriguez V, Ocampo-Gomez G, Hernandez-Gonzalez S, Ruiz-Flores P, Lopez-Marquez F. Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican women and breast cancer risk. *J Appl Toxicol* 2011; 31: 270-278.

Rees K, Dyakova M, Wilson N, Ward K, Thorogood M, Brunner E. Dietary advice for reducing cardiovascular risk. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 12: CD002128.

Regidor E. [The Goldthorpe Social Class Classification: reference framework for a proposal for the measurement of social class by the Working Group of the Spanish Society of Epidemiology]. *Rev Esp Salud Publica* 2001; 75: 13-22.

Ribas-Fito N, Sunyer J, Sala M, Grimalt JO. [Changes in concentrations of organochloride compounds in women from Flix, Tarragona [Spain]]
1. *Gac Sanit* 2003; 17: 309-311.

Risbridger GP. Are we disrupted? *Endocr Relat Cancer* 2014; 21: E1-E2.

Rivas A, Cerrillo I, Granada A, Mariscal-Arcas M, Olea-Serrano F. Pesticide exposure of two age groups of women and its relationship with their diet. *Sci Total Environ* 2007; 382: 14-21.

Rivas A, Fernandez MF, Cerrillo I, Ibarluzea J, Olea-Serrano MF, Pedraza V, Olea N. Human exposure to endocrine disruptors: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 2001; 109: 185-197.

Rogan WJ, Gladen BC, McKinney JD, Carreras N, Hardy P, Thullen J, Tinglestad J, Tully M. Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J Pediatr* 1986; 109: 335-341.

Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE, Bonefeld-Jorgensen EC. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 1547-1552.

Sala M, Sunyer J, Otero R, Santiago-Silva M, Camps C, Grimalt J. Organochlorine in the serum of inhabitants living near an electrochemical factory
39. *Occup Environ Med* 1999; 56: 152-158.

Salihovic S, Lampa E, Lindstrom G, Lind L, Lind PM, van BB. Circulating levels of persistent organic pollutants (POPs) among elderly men and women from Sweden: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS). *Environ Int* 2012; 44: 59-67.

Saoudi A, Frery N, Zeghnoun A, Bidondo ML, Deschamps V, Goen T, Garnier R, Guldner L. Serum levels of organochlorine pesticides in the French adult population: the French National Nutrition and Health Study (ENNS), 2006-2007. *Sci Total Environ* 2014; 472: 1089-1099.

Schechter A, Colacino J, Haffner D, Patel K, Opel M, Papke O, Birnbaum L. Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 796-802.

Schell LM, Gallo MV, Denham M, Ravenscroft J, DeCaprio AP, Carpenter DO. Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p,p'-DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk youth. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 806-813.

Schisterman EF, Whitcomb BW, Louis GM, Louis TA. Lipid adjustment in the analysis of environmental contaminants and human health risks. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 853-857.

Schmidt CW. The low down on low-dose endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 2001; 109: A420-A421.

Schuhmacher M, Kiviranta H, Vartiainen T, Domingo JL. Concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in milk of women from Catalonia, Spain. *Chemosphere* 2007; 67: S295-S300.

SCPOP. Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. 2001. Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
Ref Type: Report

Shanle EK, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 6-19.

Sharpe RM, Drake AJ. Obesogens and obesity--an alternative view? *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21: 1081-1083.

Silbergeld EK, Flaws JA. Environmental exposures and women's health. *Clin Obstet Gynecol* 2002; 45: 1119-1128.

Skinner MK, Guerrero-Bosagna C. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics* 2009; 1: 111-117.

Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65: 143-150.

Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-Lopez MD. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem* 1995; 41: 1888-1895.

Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castano L, Castell C, Catala M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbes J, Gomis R, Gutierrez G, Lopez-Alba A, Martinez-Larrad MT, Menendez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Rojo-Martinez G, Serrano-Rios M, Valdes S, Vazquez JA, Vendrell J. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012; 55: 88-93.

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 7: 113-122.

Soto A, Lin T, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. An "In Culture" Bioassay to Assess the Estrogenicity of Xenobiotics (E-SCREEN). *Princeton Scientific, Princeton, NJ*, 1992.

Speiser PW, Rudolf MC, Anhalt H, Camacho-Hubner C, Chiarelli F, Eliakim A, Freemark M, Gruters A, HersHKovitz E, Iughetti L, Krude H, Latzer Y, Lustig RH, Pescovitz OH, Pinhas-Hamiel O, Rogol AD, Shalitin S, Sultan C, Stein D, Vardi P, Werther GA, Zadik Z, Zuckerman-Levin N, Hochberg Z. Childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1871-1887.

Steinmetz R, Young PC, Caperell-Grant A, Gize EA, Madhukar BV, Ben Jonathan N, Bigsby RM. Novel estrogenic action of the pesticide residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56: 5403-5409.

Sunyer J, Garcia-Esteban R, Alvarez M, Guxens M, Goni F, Basterrechea M, Vrijheid M, Guerra S, Anto JM. DDE in mothers' blood during pregnancy and lower respiratory tract infections in their infants. *Epidemiology* 2010; 21: 729-735.

Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobni EZ, Redmon JB, Wang C, Brazil C, Overstreet JW. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1478-1484.

Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Hyer M, Wise LA, Palmer JR, Kaufman R, Adam E, Noller K, Herbst AL, Strohshnitter W, Cole BF, Hartge P, Hoover RN. Offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES): a preliminary report of benign and malignant pathology in the third generation. *Epidemiology* 2008; 19: 251-257.

Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Wise LA, Palmer J, Hyer M, Kaufman R, Adam E, Strohsnitter W, Noller K, Herbst AL, Gibson-Chambers J, Hartge P, Hoover RN. Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Int J Epidemiol* 2006; 35: 862-868.

To-Figueras J, Sala M, Otero R, Barrot C, Santiago-Silva M, Rodamilans M, Herrero C, Grimalt J, Sunyer J. Metabolism of hexachlorobenzene in humans: association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 78-83.

Tong W, Perkins R, Xing L, Welsh WJ, Sheehan DM. QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor alpha and beta subtypes. *Endocrinology* 1997; 138: 4022-4025.

Tornkvist A, Glynn A, Aune M, Darnerud PO, Ankarberg EH. PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005--levels and dietary intake estimations. *Chemosphere* 2011; 83: 193-199.

Turci R, Balducci C, Brambilla G, Colosio C, Imbriani M, Mantovani A, Vellere F, Minoia C. 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.

Uemura H, Arisawa K, Hiyoshi M, Kitayama A, Takami H, Sawachika F, Dakeshita S, Nii K, Satoh H, Sumiyoshi Y, Morinaga K, Kodama K, Suzuki T, Nagai M, Suzuki T. Prevalence of metabolic syndrome associated with body burden levels of dioxin and related compounds among Japan's general population. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 568-573.

UNEP. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Eastern and Western South America Regional Report. 2002. United Nations Environment Programme.
Ref Type: Generic

Vaclavik E., Tjonneland A., Stripp C., Overvad K., Weber J-P., and Raaschou-Nielsen O. Organochlorines in Danish women: Predictors of adipose tissue concentrations. *Environ.Res.* 100[3], 363-370. 2006.
Ref Type: Abstract

Valvi D, Mendez MA, Martinez D, Grimalt JO, Torrent M, Sunyer J, Vrijheid M. Prenatal Concentrations of PCBs, DDE, DDT and Overweight in Children: A Prospective Birth Cohort Study. *Environ Health Perspect* 2011.

van den Berg H. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 1656-1663.

van Lipzig MM, ter Laak AM, Jongejan A, Vermeulen NP, Wamelink M, Geerke D, Meerman JH. Prediction of ligand binding affinity and orientation of xenoestrogens to the estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method. *J Med Chem* 2004; 47: 1018-1030.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012; 33: 378-455.

Verhulst SL, Nelen V, Hond ED, Koppen G, Beunckens C, Vael C, Schoeters G, Desager K. Intrauterine exposure to environmental pollutants and body mass index during the first 3 years of life. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 122-126.

VEST MF, ROSSIER R. DETOXIFICATION IN THE NEWBORN: THE ABILITY OF THE NEWBORN INFANT TO FORM CONJUGATES WITH GLUCURONIC ACID, GLYCINE, ACETATE AND GLUTATHIONE. *Ann N Y Acad Sci* 1963; 111: 183-198.

Veyhe AS, Hofoss D, Hansen S, Thomassen Y, Sandanger TM, Odland JO, Nieboer E. The Northern Norway Mother-and-Child Contaminant Cohort (MISA) Study: PCA analyses of environmental contaminants in maternal sera and dietary intake in early pregnancy. *Int J Hyg Environ Health* 2015; 218: 254-264.

Vicente A, Arques JF, Villalbi JR, Centrich F, Serrahima E, Llebaria X, Casas C. [Pesticides in the diet: adding pieces to the puzzle]. *Gac Sanit* 2004; 18: 425-430.

Vilahur N, Bustamante M, Byun HM, Fernandez MF, Santa ML, Basterrechea M, Ballester F, Murcia M, Tardon A, Fernandez-Somoano A, Estivill X, Olea N, Sunyer J, Baccarelli AA. Prenatal exposure to mixtures of xenoestrogens and repetitive element DNA methylation changes in human placenta. *Environ Int* 2014a; 71: 81-87.

Vilahur N, Fernandez MF, Bustamante M, Ramos R, Fornis J, Ballester F, Murcia M, Riano I, Ibarluzea J, Olea N, Sunyer J. In utero exposure to mixtures of xenoestrogens and child neuropsychological development. *Environ Res* 2014b; 134: 98-104.

Vilahur N, Molina-Molina JM, Bustamante M, Murcia M, Arrebola JP, Ballester F, Mendez MA, Garcia-Esteban R, Guxens M, Santa ML, Tardon A, Sunyer J, Olea N, Fernandez MF. Male specific association between xenoestrogen levels in placenta and birthweight. *Environ Int* 2013; 51: 174-181.

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 844-850.

Vizcaino E, Grimalt JO, Carrizo D, Lopez-Espinosa MJ, Llop S, Rebagliato M, Ballester F, Torrent M, Sunyer J. Assessment of prenatal exposure to persistent organohalogen compounds from cord blood serum analysis in two Mediterranean populations (Valencia and Menorca). *J Environ Monit* 2011; 13: 422-432.

Vrijheid M, Martinez D, Aguilera I, Ballester F, Basterrechea M, Esplugues A, Guxens M, Larranaga M, Lertxundi A, Mendez M, Murcia M, Marina LS, Villanueva CM, Sunyer J. Socioeconomic status and exposure to multiple environmental pollutants during pregnancy: evidence for environmental inequity? *J Epidemiol Community Health* 2012; 66: 106-113.

Waliszewski SM, Carvajal O, Infanzon RM, Trujillo P, Hart MM. Copartition ratios of persistent organochlorine pesticides between human adipose tissue and blood serum lipids. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004; 73: 732-738.

Waliszewski SM, Pardio S, V, Infanzon RM, Rivera J. Determination of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue: 1992 study in Mexico
1. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995; 55: 43-49.

Wang F, Roberts SM, Butfiloski EJ, Morel L, Sobel ES. Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides: a comparison of splenic B-cell effects of chlordecone and estradiol in (NZBxNZW)F1 mice. *Toxicol Sci* 2007; 99: 141-152.

Whitlock JP, Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 103-125.

WHO. Health Risks of Persistent Organic Pollutants from Long-range Transboundary Air Pollution. The Regional Office for Europe of the World Health Organization, Copenhagen, Denmark (2003). 2003.

Ref Type: Generic

WHO. BMI Classification. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (accessed May 2010). 2010. World Health Organisation.

Ref Type: Generic

Wingfors H, Selden AI, Nilsson C, Haglund P. Identification of markers for PCB exposure in plasma from Swedish construction workers removing old elastic sealants. *Ann Occup Hyg* 2006; 50: 65-73.

Wolff MS, Anderson HA, Britton JA, Rothman N. Pharmacokinetic variability and modern epidemiology--the example of dichlorodiphenyltrichloroethane, body mass index, and birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1925-1930.

Wolff MS, Zeleniuch-Jacquotte A, Dubin N, Toniolo P. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 271-277.

Wu H, Bertrand KA, Choi AL, Hu FB, Laden F, Grandjean P, Sun Q. Persistent Organic Pollutants and Type 2 Diabetes: A Prospective Analysis in the Nurses' Health Study and Meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2012.

Yu GW, Laseter J, Mylander C. Persistent organic pollutants in serum and several different fat compartments in humans. *J Environ Public Health* 2011; 2011: 417980.

Yuantari MG, Van Gestel CA, Van Straalen NM, Widianarko B, Sunoko HR, Shobib MN. Knowledge, attitude, and practice of Indonesian farmers regarding the use of personal protective equipment against pesticide exposure. *Environ Monit Assess* 2015; 187: 142.

Zeliger HI. Lipophilic chemical exposure as a cause of type 2 diabetes (T2D). *Rev Environ Health* 2013; 28: 9-20.

Zhang D, Trudeau VL. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 144: 306-315.

Zumbado M, Goethals M, Alvarez-Leon EE, Luzardo OP, Cabrera F, Serra-Majem L, Dominguez-Boada L. Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ* 2005; 339: 49-62.