



PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

***OBESIDAD EN ESCOLARES ESTIMADA A PARTIR  
DE HÁBITOS DE VIDA Y NUTRICIONALES Y  
EXPOSICIÓN A BISFENOL A Y DERIVADOS***

**Memoria que presenta para aspirar  
al grado de Doctora por la Universidad de Granada**

**Dña. LETICIA HERAS GONZÁLEZ**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Leticia Heras González  
ISBN: 978-84-1306-807-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/67800>



DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Dra. MARINA VILLALÓN MIR, Directora del Departamento de  
Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:** Que el presente trabajo ha sido realizado por Doña  
**LETICIA HERAS GONZÁLEZ**, Diplomada en Nutrición  
Humana y Dietética y Máster en Nutrición Humana por la  
Universidad de Granada, en el Departamento de Nutrición  
y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Granada.

Granada, 14 de Diciembre de 2020

Fdo. Dra. Marina Villalón Mir

Firma (U): MARINA VILLALÓN MIR  
Función/de: Directora de Departamento



Este documento firmado digitalmente puede verificarse en <https://sede.ugr.es/verfirma/>  
Código seguro de verificación (CSV): 750C1183A7B2F28A9E10D40D421CC66E

14/12/2020  
Pág. 1 de 1

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias al Proyecto *Análisis de fuentes de exposición a Bisfenol A y derivados (Disruptores Endocrinos) e incidencia en la obesidad de escolares*, FEDER-ISCIII, PI14/01040, y por el Grupo de investigación de la Junta de Andalucía Nutrición, Dieta y Evaluación de Riesgos (AGR-255).



*“Nunca pierdas la oportunidad de comenzar algo sin importar lo pequeño que sea. Pues es maravilloso ver que con frecuencia la semilla de mostaza germina y echa raíces.”*

(Florence Nightingale)



## **AGRADECIMIENTOS**

*Me gustaría expresar mi gratitud a la Dra. Fátima Olea y al Dr. Miguel Mariscal por haberme apoyado y por haber confiado en mí desde el primer momento y a lo largo de estos años. Fátima, has sido un apoyo esencial y la que me has dado luz en los momentos más complicados.*

*A los compañeros del Grupo de investigación AGR-255, porque me han dado la oportunidad de aprender y de crecer, así como de vivir experiencias que únicamente a través de ellos podría haberlo hecho. Además de compañeros son verdaderos amigos.*

*A mi familia, por su apoyo incondicional, como siempre lo han hecho, para que siguiera creciendo y formándome.*

*A Abel, porque me ha dado la mano y ha conseguido acompañarme hasta donde estoy hoy.*

*A todos aquellos que de alguna manera han colaborado para que esto se haya podido hacer realidad.*

*Muchas gracias*



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
1.1. Situación fisiológica característica del escolar .....	27
1.2. Nutrición y alimentación en la edad escolar.....	27
1.3. Requerimientos de energía y nutrientes en la etapa escolar .....	31
Energía .....	31
Proteínas .....	33
Carbohidratos .....	35
Lípidos.....	36
Vitaminas y minerales.....	38
Ingestas Dietéticas de Referencia.....	40
Objetivos Nutricionales .....	42
1.4. Patrones dietéticos de nuestro entorno .....	43
Patrón Occidental.....	43
Patrón Mediterráneo.....	43
1.5. Parámetros antropométricos para la valoración del sobrepeso/obesidad .....	45
1.6. Incidencia y prevalencia de sobrepeso/obesidad en la edad escolar .....	47
Prevalencia en España .....	48
1.7. Prevención del sobrepeso/obesidad: práctica de actividad física .....	49
1.8. Disruptores endocrinos .....	50
Mecanismo de acción de los disruptores endocrinos (DE) .....	51
Categorías de productos químicos con actividad disruptora endocrina .....	52
Fuentes de exposición a BPA y derivados y obesidad infantil .....	56
Fitoestrógenos en la dieta escolar.....	58
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
2.1. Hipótesis.....	63

2.2. Objetivos .....	64
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
3.1. Población de estudio .....	67
3.2. Cuestionario .....	67
3.2.1. Datos personales, sociofamiliares y socioeconómicos .....	68
3.2.2. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ).....	69
3.2.3. Cuestionario de recuerdo de 24 horas (R24h) .....	70
3.2.4. Hábitos de vida y relacionados con la alimentación .....	70
3.2.5. Cuestionario de 24h de actividad física .....	71
3.2.6. Hábitos bucodentales y valoración del estado de la dentición .....	71
3.2.7. Antropometría.....	74
3.2.7.1. Metodología de los Parámetros Antropométricos.....	74
3.2.7.2. Índices Antropométricos.....	75
3.3. Métodos cromatográficos .....	77
3.3.1. Material.....	77
3.3.2. Reactivos.....	77
3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	78
3.3.4. Análisis cualitativo de Bisfenol A.....	78
3.4. Validación de métodos analíticos .....	79
3.4.1. Selectividad.....	79
3.4.2. Límites de detección y cuantificación .....	80
3.5. Confirmación del análisis de BPA en muestras: Análisis UHPLC-MS/MS....	82
3.5.1. Metodología .....	82
3.5.1.1. Condiciones de transición para BPA .....	83
3.5.1.2. Linealidad y curvas de calibrado.....	84
3.6. Método biológico: análisis de la actividad estrogénica de fitoestrógenos y BPA mediante E-Screen .....	86
3.6.1. Experimentos de proliferación celular: Test E-Screen.....	86
3.6.2. Material y método.....	86
3.6.3. Bioensayo de estrogénicidad .....	88

3.6.4. Análisis de los resultados: Parámetros de actividad biológica .....	88
3.7. Cuestionario adherencia a la Dieta Mediterránea (KIDMED).....	90
3.8. Análisis estadístico .....	91
3.8.1. Análisis previo: exploración de bases de datos y test de normalidad.....	91
3.8.2. Estadística descriptiva .....	92
3.8.3. Medidas de concordancia .....	92
3.8.4. Análisis multivariante.....	93
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>97</b>
4.1. Análisis descriptivo.....	97
4.1.1. Características de la población de estudio .....	97
4.1.2. Antropometría .....	98
4.1.3. Hábitos de vida y relación con el gasto energético .....	100
4.1.4. Cuestionario sobre hábitos bucodentales.....	102
4.1.5. Hábitos de alimentación de los escolares.....	103
4.1.6. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ) .....	105
4.1.7. Cuestionario de recuerdo de 24 horas (R24h) .....	111
4.1.7.1. Validación de cuestionarios alimentarios .....	112
4.1.8. Alimentos portadores de productos potencialmente disruptores endocrinos.....	117
4.1.9. Estimación de fitoestrógenos en la dieta escolar .....	118
4.1.10. Resultados del análisis odontológico y concentración de Bisfenol A (BPA) en saliva ..	120
4.1.10.1 Resultados del BPA en saliva .....	121
4.2. Índices y análisis inferencial .....	125
4.2.1. Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea - KIDMED .....	125
4.2.2. Índice cintura-talla (ICT).....	127
4.2.3. Práctica de actividad física y relación con el peso corporal .....	129
4.2.4. Estimación de la calidad de la ingesta proteica de la dieta.....	132
4.2.5. Consumo de azúcares en la dieta escolar e influencia en la prevalencia de obesidad....	134
4.3. Valoración del efecto estrogénico de los fitoestrógenos en la dieta escolar	137
4.4. Análisis de la exposición a BPA y relación con sobrepeso y obesidad en escolares .....	139

<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>162</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>195</b>

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%G	Porcentaje de Grasa
AA	Acido Araquidónico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AF	Actividad Física
AGMI	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Grasos Poliinsaturados
AGS	Ácidos Grasos Saturados
AMDR	Intervalos Aceptables de Distribución de Macronutrientes
ANOVA	Análisis de la Varianza
bisDMA	Dimetacrilato de Bisfenol A
bisGMA	Metacrilato de Glicidilo de Bisfenol A
BPA	Bisfenol A
CDFBS	Suero Humano Desprovisto de Estrógenos
CNO	Clasificación Nacional de Ocupaciones
CVT	Volumen Calórico Total
DE	Desviación Estándar
DEs	Disruptores Endocrinos
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DM	Dieta Mediterránea
DRIs	Ingestas Dietéticas de Referencia
EF	Educación Física
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EP	Efecto Proliferativo
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura
FBS	Suero Bovino Fetal
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU

FFQ	Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos
GET	Gasto Energético Total
HC	Hidratos de Carbono
ICT	Índice Cintura-Talla
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Ingesta Recomendada
K-S	Test de Kolmogorov-Smirnov
MET	Unidad de medida del índice metabólico
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de Naciones Unidas
PA	Poliamida
QIDP	Índice de Calidad de las Proteínas de la Dieta
R24h	Recuerdo de 24 horas
REE	Requerimiento Energético Estimado
RF	Rojo Fenol
TMR	Tasa Metabólica en Reposo
UL	Nivel Máximo de Consumo Tolerable

# **INTRODUCCIÓN**



# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Situación fisiológica característica del escolar**

Durante la edad escolar se produce un descenso en la velocidad de crecimiento en relación con el desarrollo durante el primer año de vida y la adolescencia. A partir de los cuatro años de edad, el ritmo de crecimiento hasta el inicio de la adolescencia es de unos 2,5-3,5 kg/año. En cuanto a la talla, ésta aumenta a razón de unos 5-8 cm/año hasta el inicio de la pubertad. Sin embargo no todos los niños y niñas crecen a este ritmo, se deben tener en cuenta los condicionantes genéticos, el estado de salud y, por supuesto, los hábitos alimentarios. El peso y la talla son los dos parámetros más fáciles de obtener para estimar una buena o mala alimentación. Si la dieta es desequilibrada (ya sea por exceso o por defecto), pueden producirse alteraciones en el ritmo de crecimiento. La primera forma en que se manifiesta una nutrición insuficiente es a través del peso. Si la situación no se soluciona, la talla también se ve afectada, así como la composición corporal. Los excesos en la alimentación pueden ser causa de obesidad y asociarse a enfermedades y problemas físicos, psíquicos y sociales (Peña-Quintana et al, 2010).

## **1.2. Nutrición y alimentación en la edad escolar**

Según la OMS, la nutrición es la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo. Una buena nutrición es un elemento fundamental de la buena salud. Una mala nutrición puede reducir la inmunidad, aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades, alterar el desarrollo físico y mental, y reducir el rendimiento.

La alimentación, aparte de servir al ser humano en su proceso de socialización con el medio que le rodea, es el acto de tomar del exterior e ingerir los nutrientes y sustancias necesarias para poder cubrir nuestras necesidades, sustancias las cuales las tomamos a través de los alimentos que componen nuestra dieta (Martínez Zazo et al, 2016.).

Una alimentación saludable es aquella que permite alcanzar y mantener un funcionamiento óptimo del organismo, conservar o restablecer la salud, disminuir el riesgo de padecer enfermedades, asegurar la reproducción, la gestación y la lactancia, y que promueve un crecimiento y desarrollo óptimos. Debe ser nutritiva, satisfactoria, suficiente, completa, equilibrada, armónica, segura, adaptada, acorde al entorno cultural, sostenible

y asequible. Debe satisfacer las necesidades de energía y de todos los nutrientes esenciales (OMS, 2001; Basulto et al, 2013; SENC, 2014-2016).

En la edad preescolar se empiezan a crear y adquirir algunos hábitos en relación a factores sociales, familiares y ambientales propios de la cultura en la que el niño está inmerso. En esta etapa se debe establecer un ambiente positivo ante el hecho de comer y tratar de que el niño empiece a desarrollar actitudes positivas respecto a hábitos alimentarios saludables y a la actitud que muestre frente a su propia alimentación.

Durante la infancia los hábitos dietéticos y el ejercicio pueden marcar la diferencia entre una vida sana y el riesgo de sufrir enfermedades en años posteriores. En esta etapa de la vida, la alimentación, además de suministrar la energía y los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos que aseguren un crecimiento y desarrollo óptimos, debe permitir llevar una vida activa en plenitud y establecer las condiciones más favorables para las tareas de aprendizaje y para la vida social (Monteagudo et al, 2012).

El niño va a empezar a desarrollar sus preferencias en materia de alimentación, desarrollando su gusto comprobando diversos sabores y olores y verificando la textura de los alimentos, lo que va a jugar un importante papel en esa orientación hacia determinadas preferencias. La apariencia del alimento contribuye de la misma forma a la aceptación de algunos de ellos e incluso influencia algunas percepciones entre los sabores. Existe una fuerte correlación entre la frecuencia de exposición del alimento y las preferencias, según Birch (Ballabriga et al, 2006).

De igual manera, la adquisición de hábitos alimentarios en los niños de edad escolar se ve afectada por el entorno familiar, de manera que, diversos estudios ponen en evidencia que el nivel socioeconómico y educativo de los padres influye directamente sobre la ingesta dietética del niño (Aranceta et al, 2003; Velasco et al, 2009). Estudios relacionados con este tema muestran cómo el nivel educacional de las madres es uno de los mejores predictores de la calidad y tipo de dieta seguida por sus hijos. Así, se establece una relación directamente proporcional entre el nivel de educación de la familia y el consumo de leche, productos lácteos y zumo de fruta, mientras que dicha relación es inversamente proporcional entre el nivel de educación de la familia y el consumo de azúcar y comida rápida. En cuanto al nivel económico de las familias se establece que los niños de núcleos familiares con un alto rango económico tienden a consumir elevadas cantidades de proteínas, carne, pescado, leche y verduras, mientras que niños de familias más pobres tienden a consumir una alta ingesta calórica a través de comida rápida, grasas y alimentos

azucarados. Respecto a características demográficas, los niños de zonas urbanas consumen más carne, productos cárnicos y legumbres, mientras en áreas rurales la ingesta dietética se caracteriza por un mayor consumo de leche, verdura y fruta (Fernández et al, 2006). Todo ello va a influir sobre el desarrollo de los hábitos en materia de alimentación. Los estilos de vida aprendidos durante la infancia y la edad escolar perduran, o al menos influyen, sobre las prácticas habituales en la adolescencia y en la edad adulta (Macías et al, 2012). Por lo tanto, la instauración de hábitos alimentarios saludables durante esta etapa de la vida establece las bases para la prevención primaria de enfermedades crónicas de alta prevalencia y mortalidad en la edad adulta, tales como factores de riesgo cardiovascular, obesidad, diabetes tipo II, algunos tumores y otras enfermedades degenerativas (Aranceta et al, 2004; Jaffiol et al, 2012; Carlford et al, 2012; Guo et al, 2012).

No obstante, parte de las preferencias y aversiones de los niños hacia determinados alimentos no dependen exclusivamente del entorno familiar, sino que se ven afectados en gran medida por la publicidad y el marketing, convirtiéndolos en un colectivo altamente susceptible (McGinnis et al, 2006; Grier et al, 2008; Dorey et al, 2009). Una gran parte de esta publicidad está relacionada con alimentos procesados, caracterizados por tener un limitado valor nutritivo y un elevado contenido calórico, aportando elevadas cantidades de grasas saturadas y trans, colesterol, azúcares simples y sal y generalmente con un escaso o inexistente aporte de micronutrientes (Fernández et al, 2006). Estudios realizados por Kotz y Store mostraron que, de 564 anuncios de televisión correspondientes a alimentos, un 43% se referían a grasas, aceites y dulces, siendo los más frecuentes los de cereales con alto contenido de azúcar; ello se hacía en espacios publicitarios de programas dedicados especialmente a la infancia (Ballabriga et al, 2006). Sin embargo, otro dato interesante procedente de un estudio realizado en escolares granadinos, indica que un 80% de la población encuestada no cree que lo anunciado en televisión sea lo más saludable (Velasco et al, 2009).

La promoción de hábitos alimentarios y estilos de vida saludables en la edad infantil y juvenil debe implicar a diferentes sectores. Como hemos visto, la familia desempeña un papel clave en esta tarea, pero la comunidad y las autoridades sanitarias y educativas no pueden eludir su responsabilidad en este sentido. Los programas de salud, las actividades educativas en los centros docentes y los comedores escolares, junto con acciones de refuerzo comunitario, son estrategias fundamentales para este fin. También la industria alimentaria y los referentes sociales desempeñan un papel fundamental en la configuración del modelo alimentario y en la promoción de contenidos y hábitos alimentarios que favorezcan la promoción de la salud y la calidad de vida (Aranceta et al, 2007) como son (Peña Quintana et al, 2010):

- Promoción de un buen desayuno ya que contribuye a conseguir unos aportes nutricionales más adecuados, evita o disminuye el consumo de alimentos menos apropiados (bollería, azúcares, etc.), puede contribuir a la prevención de la obesidad, además de mejorar el rendimiento intelectual, físico y la actitud en el trabajo escolar. El desayuno se considera una comida principal y rompe el ayuno de 10-12 horas. La omisión del desayuno interfiere en los procesos cognitivos y de aprendizaje más pronunciado en los niños nutricionalmente en riesgo. El desayuno debe contener preferentemente hidratos de carbono complejos por su mejor control de la saciedad, con menor proporción de alimentos ricos en lípidos. Se aconseja preferentemente la tríada compuesta por lácteos, cereales integrales y frutas o zumo de fruta fresca, que se podría complementar con otros alimentos proteicos como huevos, jamón, etc., hasta llegar al 20-25% de las necesidades energéticas diarias. Es necesario dedicar al desayuno entre 10 a 15 minutos de tiempo, sentados en la mesa, a ser posible en familia, en un ambiente relajado.
- Vigilar el consumo y la calidad de las comidas intermedias, promoviendo el consumo de frutas, cereales, lácteos, bocadillos caseros u otros alimentos con buena calidad nutricional. Los snacks pueden suponer hasta casi 1/3 de las calorías totales de la dieta. Restringir la ingesta de productos con peor calidad nutricional como dulces, bollería industrial, pastelería, refrescos, caramelos, chocolates, postres comerciales, zumos industriales, y los llamados “alimentos chatarra o basura”, en general productos manufacturados con elevadas cantidades de grasa total y saturada, azúcar, colesterol, energía, sal y con ninguno o pocos micronutrientes. No utilizarlos como premio, soborno, recompensa o entretenimiento, ni eliminarlos totalmente por su fácil acceso, por la publicidad y por su buen sabor, siendo mejor estrategia su disminución escalonada.

Insistir preferentemente en las clases sociales más desfavorecidas, donde este consumo es mayor. Se les debe enseñar a escoger los alimentos correctamente y a no dejarse influenciar por la publicidad de alimentos.

- Restringir el uso de pantallas (televisión, videojuegos y ordenador) a 1-2 horas diarias de por su implicación en la obesidad, en la tendencia a la vida sedentaria y en la incitación al consumo de determinados alimentos. No se aconseja ver la televisión a niños menores de dos años de edad.

### **1.3. Requerimientos de energía y nutrientes en la etapa escolar**

#### **Energía**

Los requerimientos de energía se estiman a partir de la suma del gasto energético más la energía necesaria para el crecimiento. Las recomendaciones para la ingesta de energía deben cumplir estos requisitos para el logro y mantenimiento de una salud óptima, función fisiológica y bienestar. Las necesidades y recomendaciones de energía alimentaria no pueden considerarse de forma aislada de otros nutrientes en la dieta, ya que la falta de uno influirá en los demás. Los requisitos de energía y los niveles recomendados de ingesta representan un promedio de necesidades de energía durante un cierto número de días y la ingesta de energía recomendada es la cantidad de energía que se debe ingerir como una dosis diaria promedio durante un cierto período de tiempo. No hay implicación de que exactamente esta cantidad de energía deba ser consumida todos los días, ni de que el requerimiento y la ingesta recomendada sean constantes día tras día. Tampoco existe ninguna base biológica para definir el número de días durante los cuales el requisito o la ingesta deben promediarse. Teniendo en cuenta que la actividad física y los hábitos alimenticios pueden variar algunos días de la semana, a menudo se usan períodos de siete días cuando se estiman el gasto energético diario promedio y la ingesta diaria recomendada (FAO/WHO/UNU, 2001).

Las estimaciones de los requerimientos de energía se derivan de las mediciones de un grupo de personas del mismo sexo y edad similar, tamaño corporal y actividad física que son agrupadas para proporcionar el requerimiento de energía promedio (o el nivel recomendado de ingesta dietética) para un grupo de población (Figura 1.3.1). Estos requerimientos se usan para predecir requisitos y niveles recomendados de consumo de energía para otras personas con características similares, aunque quedan factores desconocidos que producen variaciones entre individuos. Como resultado hay una distribución de requisitos dentro grupo de población. De forma general, los requerimientos energéticos vienen determinados según la cantidad y proporción de tejidos metabólicamente activos, los cuales, a su vez, varían a con la edad.

La masa corporal magra de los niños pequeños contiene mayor proporción de órganos metabólicamente activos que la de los adultos. Esta masa disminuye a partir de la primera parte de la vida adulta en una proporción de un 2-3% por década, lo que justifica que el gasto energético disminuya paralelamente con la edad (FAO/WHO/UNU, 2001).

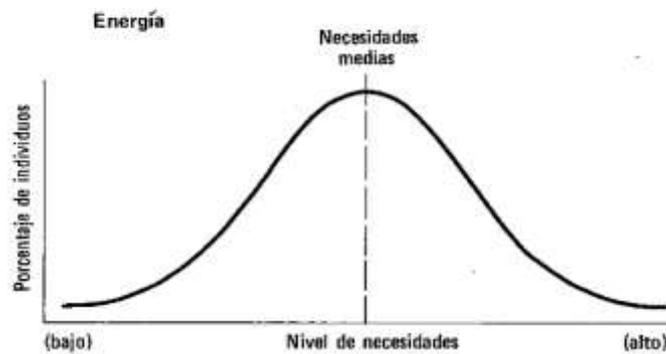


Figura 1.3.1. Distribución de los requisitos de energía de un grupo de población o clase de individuos\* [\* Se asume que los requisitos individuales se distribuyen aleatoriamente sobre el requisito medio para la clase de individuos y que la distribución es gaussiana (OMS, 1985)]

Cuando se calculan las recomendaciones para estos nutrientes, la variación entre individuos en un grupo de población se tiene en cuenta y el nivel recomendado de ingesta es una cantidad que cubre o excede los requisitos de prácticamente todas las personas en el grupo. Este enfoque no se puede aplicar a las recomendaciones de energía porque las ingestas que exceden los requisitos producirán un balance positivo, que puede llevar a sobrepeso y obesidad a largo plazo. Un nivel elevado de consumo de energía que asegura una baja probabilidad de déficit energético para la mayoría de las personas (por ejemplo, el requisito promedio +2DE), implica una alta probabilidad de obesidad para la mayoría de las personas debido a un exceso de energía en la dieta (Figura 1.3.2) (FAO/WHO/UNU, 2001). Por lo tanto, el requerimiento de ingesta de energía que podría recomendarse con seguridad para un grupo de población es el promedio estimado de energía de ese grupo.

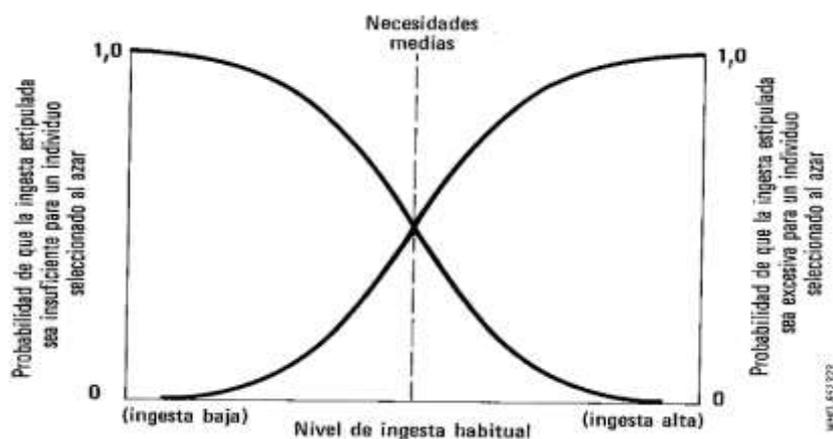


Figura 1.3.2. Probabilidad de que un consumo de energía particular sea inadecuado o excesivo para un individuo\* [\* Las personas se seleccionan al azar entre un grupo de población. Las dos curvas de probabilidad se superponen, por lo que nivel de consumo de energía que asegura una baja probabilidad de deficiencia de energía alimentaria es el mismo nivel que implica una alta probabilidad de la obesidad debido al exceso de energía en la dieta. (OMS, 1985)]

Las necesidades energéticas del niño están condicionadas, en parte, por el proceso de crecimiento y sus pautas de actividad física (FAO/WHO/UNU, 2001):

- El coste energético del crecimiento comprende: 1) la energía gastada para sintetizar tejidos en crecimiento y 2) la energía depositada en estos tejidos, básicamente como grasa y proteína, ya que los depósitos de hidratos de carbono son insignificantes. Según la OMS, el valor medio de energía utilizada para el crecimiento es de 2 Kcal/g de peso ganado, cantidad que hay que sumar al gasto energético total diario (GET). Excepto durante el primer año de vida, el crecimiento supone una parte muy pequeña (aproximadamente 1%) de los requerimientos calóricos totales. El peso ganado por año de edad se encuentra tabulado por la OMS.

- Respecto al coste energético de la actividad se constata que la población infantil es cada vez más sedentaria, lo que resulta perjudicial en su desarrollo muscular, psíquico, etc. Desde el punto de vista nutricional, en base a la actividad física realizada por el niño, se establecerá la ingesta energética recomendada, de forma que los niños más activos necesitarán un aporte energético notablemente superior que los más sedentarios. Durante la etapa preescolar y escolar la tasa de crecimiento es más estable y el coste calórico asociado al crecimiento es inferior. Es necesario tener esto en cuenta, pues la disminución del gasto energético puede influir sobre el apetito (Requejo et al, 2000).

## **Proteínas**

Las proteínas son esenciales para el crecimiento, reparación, buen funcionamiento y estructura de todas las células vivas, y actúan como hormonas, enzimas, anticuerpos y proteínas estructurales, entre otras. Hay alrededor de 20 aminoácidos diferentes en plantas y animales. Cada proteína tiene un número y una secuencia de aminoácidos específicos. Los aminoácidos se clasifican en esenciales (no son producidos por el organismo y deben obtenerse a través de la dieta) o no esenciales (producidos endógenamente por el organismo utilizando otras proteínas). Ocho aminoácidos se consideran esenciales para los adultos (leucina, isoleucina, valina, treonina, metionina, fenilalanina, triptófano y lisina) y nueve para los niños, con la adición de histidina (EFSA, 2012). Una proteína se considera de bajo valor biológico cuando uno o más aminoácidos esenciales están presentes pero en cantidades insuficientes. Los aminoácidos presentes en cantidades inferiores a las requeridas se denominan "aminoácidos limitantes".

La ingesta total de proteínas promedio en adultos varía de aproximadamente el 12 al 20% de la ingesta energética (% E), mientras que la ingesta de proteínas reportada en niños y

adolescentes europeos varía entre 11 y 18,5 E%. Las ingestas dentro de la población varían entre el 6-13% E (percentil 2,5-10) y el 14-22% E (percentil 90-97,5).

Para los niños, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estimaron el requerimiento promedio como la suma del mantenimiento y Necesidades de crecimiento. El nivel de consumo "seguro" se basó en el nivel promedio +1,96 DE. Las necesidades diarias promedio de proteína en la dieta para el crecimiento se estimaron a partir de las tasas promedio de deposición diaria de proteínas, suponiendo una eficiencia del 58% en la utilización de proteínas en la dieta para el crecimiento. El requerimiento de proteínas de los lactantes y los niños se definió como la ingesta mínima que permite el equilibrio de nitrógeno en una composición corporal adecuada en equilibrio energético con actividad física moderada más la ingesta requerida para la deposición de tejidos compatibles con el crecimiento y la buena salud (WHO/FAO/UNU, 2007).

El nivel de ingesta "segura" se identificó como el percentil 97,5 de la distribución de la población de requerimiento de proteínas (WHO/FAO/UNU, 2007; IoM, 2005) cita algunos informes de ingestas muy altas de proteínas de hasta el 35% E sin efectos adversos, mientras que se informan efectos adversos agudos para ingestas  $\geq 45\%$  E, y se han registrado resultados letales cuando los adultos los mantuvieron durante varias semanas. Se dispone de datos inadecuados sobre la tolerancia de la proteína de la dieta para obtener un nivel máximo de consumo tolerable (UL), aunque algunos autores propusieron recientemente valores UL para leucina y triptófano (Cynober et al, 2012; Kimura et al, 2012; Rasmussen et al, 2016). Los requisitos de aminoácidos de los lactantes y los niños se obtuvieron utilizando un método factorial, basado en los requisitos estimados de proteínas para el mantenimiento y el crecimiento (WHO/FAO/UNU, 2007; Dewey et al, 1996). Se supone que el patrón de aminoácidos requerido para el mantenimiento es el mismo en niños que en adultos y que la composición de aminoácidos de la proteína del tejido de todo el cuerpo indica el patrón de aminoácidos requerido para el crecimiento (Dewey et al, 1996; Widdowson et al, 1979; Davis et al, 1993).

Los requisitos de proteínas dependen de la calidad de las proteínas de la dieta, que está determinada principalmente por el patrón de aminoácidos esenciales que contienen. El patrón de referencia de aminoácidos (mg/g proteína) para la evaluación de la calidad de la proteína en adultos se deriva dividiendo el requerimiento de aminoácidos (mg aminoácido/kg peso corporal/día) por el requerimiento promedio de proteína (g/kg peso corporal/día) (WHO/FAO/UNU, 2007).

En resumen, la ingesta de requerimiento de proteína se estima como el requerimiento promedio + 1,96 DE usando una DE combinado para crecimiento y mantenimiento. En adultos, una ingesta del doble de la ingesta requerida se considera segura. La ingesta promedio de proteínas en bebés y niños pequeños oscila entre 29 y 63 g/día (WHO/FAO/UNU, 2007; Elango et al, 2011). Solo unos pocos países han informado datos sobre la ingesta por kg de peso corporal, que van desde  $\geq 3$  g/kg pc/día en los grupos de edad más jóvenes hasta aproximadamente 1,2 a 2,0 g/kg pc/día en niños y adolescentes de 10 a 18 años. Los estudios sobre la ingesta de proteínas y el crecimiento infantil descubrieron que un suministro elevado de proteínas durante los primeros dos años de vida estaba relacionado con un aumento del IMC en la edad escolar (Gunther et al, 2007; Koletzko et al, 2016; Pimpin et al, 2016).

Los hábitos alimenticios de las poblaciones más jóvenes (niños y adolescentes) están más cerca de los patrones dietéticos occidentales, con un consumo de grasas y proteínas por encima de las recomendaciones, en detrimento de la ingesta de carbohidratos y un consumo inadecuado de vitaminas y minerales (Naska et al, 2014).

## **Carbohidratos**

La recomendación diaria basada en el papel de los carbohidratos como fuente primaria de energía para el cerebro se sitúa en 130g/día, además de considerar un mínimo entre 45-65% como fuente de energía para mantener el peso corporal (IoM, 2005).

Los seres humanos están programados genéticamente para que les guste la dulzura (Fidler et al, 2018), que tiene fuertes efectos inconscientes y es el sabor más fuertemente relacionado con el placer. Los fabricantes y/o consumidores añaden azúcares libres (refinados o no refinados) a los alimentos, incluidos los monosacáridos/disacáridos introducidos en alimentos y bebidas y también azúcares presentes naturalmente en la miel y en los jarabes o jugos de frutas, aunque la OMS excluye los azúcares intrínsecos, presentes en frutas y hortalizas frescas enteras, de la clasificación de azúcares libres (OMS, 2015). El azúcar debe consumirse preferiblemente como parte de una comida principal y en forma natural (azúcar o fruta fresca) en lugar de en bebidas endulzadas con azúcar, jugos de frutas, batidos o productos lácteos endulzados con azúcar. Los líquidos que contienen azúcares libres deben sustituirse por agua (Fidler et al, 2018).

Sin embargo, existe un consumo cada vez más elevado de azúcares, especialmente de bebidas azucaradas (sacarosa, zumos con alto contenido de fruta y zumos concentrados), aunque los datos son más consistentes sobre el consumo de estas bebidas que sobre el

consumo de otros azúcares (OMS, 2015). Las directrices de la OMS sobre la ingesta de azúcar para adultos y niños recomiendan una reducción en el consumo de azúcares libres a menos del 10% de la ingesta energética total, señalando que una reducción a menos del 5% genera beneficios adicionales para la salud (OMS, 2015). Se ha informado de que los niños que consumen más bebidas que contienen energía tienen más probabilidades de tener sobrepeso u obesidad, aunque esto podría atribuirse no solo a los carbohidratos de estas bebidas, sino también a los lípidos y proteínas que contienen.

En relación con el impacto dental del azúcar, la OMS recomienda limitar la ingesta de azúcares libres a <10% de la ingesta total de energía basándose en evidencia de calidad moderada de estudios observacionales de caries dental, y sugiere que una reducción a <5% reduciría aún más el riesgo de caries dental (recomendación condicional) (OMS, 2015). En este sentido, se descubrió que los azúcares añadidos aportan alrededor del 14% de la ingesta energética diaria en niños de 2 a 9 años en Europa (Svensson et al, 2014).

Además de aumentar el riesgo de sobrepeso/obesidad y caries, las bebidas azucaradas ofrecen un suministro deficiente de nutrientes y una diversidad dietética reducida (Kranz et al, 2005). Sin embargo, ha habido informes contradictorios sobre su papel en el desarrollo de la obesidad infantil. Nueve de las trece revisiones/metaanálisis estudiados por Keller et al. (2015) describió una asociación directa entre las bebidas azucaradas y la obesidad entre niños y adolescentes (Trumbo et al, 2014), mientras que los cuatro restantes no lo hicieron. La calidad de los estudios osciló entre mala y moderada, y las dos revisiones con los puntajes de calidad más altos mostraron resultados divergentes.

## **Lípidos**

Las funciones de los lípidos en esta etapa de la vida son de aporte energético, ya que cuentan con una alta densidad energética (9 Kcal/g), permitiendo que se alcancen los requerimientos energéticos necesarios para el rápido crecimiento y desarrollo del organismo, son clave en varias funciones biológicas participando como precursores en la síntesis de hormonas y contribuyendo al mantenimiento de la integridad de las membranas celulares y a la prevención de las enfermedades crónicas más prevalentes. Funcionan además como vehículo de nutrientes esenciales, como son las vitaminas liposolubles (A, D, E) y ácidos grasos esenciales (linoleico y  $\alpha$ -linolénico), cuya deficiencia puede provocar alteraciones en el crecimiento y retrasos en el aprendizaje. La imposibilidad de ser sintetizados por el organismo, exceptuando la vitamina D, obliga a su ingesta a través de los alimentos.

Los ácidos grasos oleico, linoleico y  $\alpha$ -linolénico están involucrados en el mantenimiento de unas adecuadas concentraciones de colesterol, triglicéridos y glucosa en sangre, y de la tensión arterial, así como en la prevención de enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunes. Si bien muchos de estos efectos están demostrados en adultos, no existen datos concluyentes en la población pediátrica, por lo que las recomendaciones se hacen por extrapolación. Los ácidos AA, EPA y especialmente el DHA son importantes para la función visual y el desarrollo neurocognitivo en prematuros y recién nacidos, por lo que se consideran semiesenciales durante este periodo. Además, actualmente se está evaluando su papel en la génesis de distintas enfermedades asociadas a la prematuridad. El DHA se utiliza también en el tratamiento de determinadas condiciones, como la fibrosis quística y las enfermedades metabólicas (aminoacidopatías, trastornos del ciclo de la urea, enfermedades peroxisomales), y se investiga su papel en la patogenia de los trastornos de déficit de atención/hiperactividad (TDAH), autismo, caquexia cancerosa, etc. (Asociación Española de Pediatría -AEPED, 2014).

Por todo ello el consumo de lípidos es fundamental a lo largo de toda la edad pediátrica y las recomendaciones sobre su ingesta se deben hacer no sólo como aporte total (cuantitativo) sino también en relación a su composición (cualitativo) (AEPED, 2014).

Las DRIs (2002/2005) consideran que, al no existir un nivel de ingesta determinado en el que se identifiquen los efectos adversos potenciales de la grasa total, tienen en cuenta que el nivel superior de la AMDR es el referente a la disminución del riesgo de enfermedad crónica y a la ingesta adecuada de otros nutrientes. Por el contrario, el nivel inferior de la AMDR se relaciona con el aumento de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y la disminución de las concentraciones de colesterol HDL observadas con dietas muy bajas en grasas (y por lo tanto altas en carbohidratos). Ese rango está comprendido entre el 25-35% de las calorías totales diarias para las edades escolares.

La EFSA (2010) y el IoM (2005) señalan que el objetivo nutricional para los AGS y el colesterol sea la menor contribución a la ingesta energética total posible.

Según los Objetivos Nutricionales de la SENC (Serra-Majem et al, 2011) las recomendaciones para la ingesta de lípidos no deben sobrepasar el 30% de la energía total diaria y, únicamente en el caso de que predominen las grasas monoinsaturadas, como las del aceite de oliva, y se disminuyan las saturadas, se permite que lleguen al 35%. El perfil lipídico debe cumplir con las siguientes recomendaciones para evitar problemas relacionados con la salud cardiovascular:  $\leq 10\%$  de la energía total para los ácidos grasos saturados (AGS),  $20\%$  de la energía total para los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y un  $5\%$  de la energía total para los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), de los cuales se

recomienda alcanzar los 2g para el ácido linolénico y más de 200mg para el ácido deicosahexaenoico. Los aportes de colesterol no deben superar los 300-350 mg/día. Es importante destacar que más del 90% de las grasas de la dieta son triglicéridos.

Según datos recientes de consumo en nuestro medio (AEPED, 2014), la ingesta de grasa total en la población pediátrica española es de aproximadamente el 40% del VCT en escolares, es decir, superior a lo recomendado. Sin embargo, existen grupos de población que consumen claramente por encima de estas recomendaciones, proporcionando un alto aporte calórico y aumentando el riesgo de obesidad. A partir del año de edad, se observa un consumo alto de AGS y bajo de AGPI, por lo que la calidad de la ingesta de los lípidos no es la óptima. Según el estudio ENALIA 2012-2014 se observa un incremento en el consumo de grasa de un 5% sobre la ingesta energética total, pasando del 40%, para la población general.

## **Vitaminas y minerales**

En base a trabajos realizados sobre los hábitos alimentarios de niños y adolescentes (como el estudio EnKid) existe una cobertura del 100% de los requerimientos de vitaminas y minerales, excepto para el caso del calcio, hierro, vitaminas E y D y ácido fólico. El consumo de alimentos vegetales (fruta y verdura) está relacionado con el aporte de determinados micronutrientes, de forma que, la tendencia actual decreciente en el consumo de este tipo de alimentos justifica las deficiencias anteriormente mencionadas.

En el caso de la Vitamina D, a pesar de que puede sintetizarse a nivel cutáneo a partir de la exposición a la luz solar, no es suficiente para cubrir las necesidades. De hecho, estudios han constatado que al menos la mitad de la población española presenta déficit de vitamina D. En una revisión realizada a nivel mundial, se observó que el 88% de la población estudiada tenía niveles séricos de 25(OH)D por debajo de 30 ng/mL; el 37%, por debajo de 20 ng/mL, y hasta un 7%, inferiores a 10 ng/mL (Hilger et al, 2013).

Existen otros factores, como la elevada prevalencia de sobrepeso/obesidad, que también puede estar relacionados con la aparición de deficiencia de la vitamina. En un estudio realizado en 137 escolares de entre 9 y 12 años de edad se observó que el porcentaje de escolares con deficiencia de vitamina era mayor entre aquellos que padecían sobrepeso/obesidad (53,5%) que en los que presentaban un peso normal (33%) (Rodríguez-Rodríguez et al, 2014).

Aunque la principal fuente de vitamina D es la exposición solar, ciertos alimentos contribuyen a cubrir las IR en la vitamina. En España, de acuerdo con el estudio ENALIA (López-Sobaler et al, 2017), realizado en una muestra representativa de 1862 niños y adolescentes (de entre 6 meses y 17 años), el estudio FANPE (González-Rodríguez et al, 2013), realizado en una muestra representativa de 418 adultos (18-60 años), y el estudio ANIBES (Olza et al, 2017), realizado en otra muestra representativa de 2009 participantes (9-75 años), más del 90% de la población no llega a ingerir los 10 µg/día de vitamina D recomendados. Las principales fuentes de la vitamina entre la población son los pescados, los huevos, la leche, los productos lácteos, los cereales y los granos; todos contribuyen a más del 85% de la ingesta total de la vitamina. Por ello, el aporte dietético es fundamental. (Rodríguez-Rodríguez et al, 2019).

## **Ingestas Dietéticas de Referencia**

Inicialmente los valores de referencia en cuanto a ingesta de nutrientes fueron establecidos con el objetivo de prevenir las enfermedades de origen nutricional de la población (Carbajal et al, 2003) y existían dos conceptos básicos: 1) Requerimiento medio de nutrientes de la población sana, es decir el nivel de ingesta diaria de un nutriente que se estimaba que cubría los requerimientos de la mitad de los individuos sano, y 2) La ingesta considerada suficiente para alcanzar los requerimientos de la mayoría de los individuos sanos (aproximadamente del 97,5%) de la población o del grupo de estudio (Pavlovic et al, 2007). Actualmente, los valores de ingesta de nutrientes de referencia se centran también en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas, teniendo como objetivo final la promoción de la salud (Aranceta et al, 2004).

De esta forma, las DRIs (Dietary References Intake) han ido incorporando nuevos conceptos para definir los valores de referencia (IoM, 2005):

**EAR** (*Estimated Average Requirement* – Requerimiento medio estimado), es el nivel de ingesta diaria de un nutriente que se estima adecuado para cubrir los requerimientos de la mitad (50%) de los individuos sanos de un grupo de población en una etapa de la vida y género particular.

**EER** (*Estimated Energy Requirement* – Requerimiento de energía estimado), hace referencia a la ingesta energética media estimada para mantener el balance energético de individuos sanos de una edad, género, peso, altura y nivel de actividad física saludable definida.

**AI** (*Adequate Intake* - Ingesta adecuada), es el nivel de ingesta media diaria recomendada, basada en datos de ingesta media de nutrientes de grupos de individuos sanos, determinados mediante estudios observacionales, estudios experimentales o bien por extrapolación. Dicha estimación se utiliza cuando no hay suficiente evidencia científica para establecer el valor de EAR y calcular la RDA.

**UL** (*Tolerable upper intake level* - Nivel de ingesta máxima tolerable), es el nivel de ingesta diaria más alto de un nutriente que probablemente no implica riesgo de producir efectos adversos sobre la salud de los individuos de la población general.

Han surgido nuevas modificaciones del concepto de valores de referencia más allá del nivel de ingesta considerada suficiente para alcanzar los requerimientos de la mayoría de grupos o individuos sanos de la población, tal y como muestra el SCF (*Scientific Committee on Food* - Comité Científico en Alimentación) de la Unión Europea (SCF, 1992):

**AR** (*Average Requirement* – Requerimiento medio), requerimiento medio de un grupo de población que coincide con la mediana del grupo por tratarse de una distribución simétrica.

**PRI** (*Population Reference Intake* – Ingesta de referencia para la población), es la ingesta que cubre las necesidades de nutrientes de prácticamente todos los individuos sanos (97,5%) de la población.

**ARI** (*Acceptable Range of Intake* - Intervalo aceptable de ingesta): cuando no se dispone de datos suficientes para establecer ingestas de referencia, se indican unos intervalos aceptables de ingesta, concepto que se asemeja al de AI de EEUU.

**LTI** (*Lowest Threshold Intake* – Umbral de ingesta inferior), es la ingesta por debajo de la cual la casi totalidad de los individuos (97,5%) no podrá mantener su integridad metabólica.

Además, se ha introducido el concepto de **AMDR** (*Acceptable Macronutrient Distribution Ranges* - Intervalos Aceptables de Distribución de Macronutrientes), definido como el intervalo de ingesta de macronutrientes, que se asocia a un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas cuando se suministra una ingesta adecuada de nutrientes (IOM, 2005).

En las Tablas A, B, C y D se desarrollan los requerimientos de energía, macronutrientes y micronutrientes para la edad escolar:

**TABLA A. DRIs: REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS ESTIMADOS (Kcal/día)<sup>a</sup>**

Edad (años)	NAF <sup>b</sup> sedentario		NAF <sup>b</sup> activo bajo		NAF <sup>b</sup> activo		NAF <sup>b</sup> muy activo	
	Niño	Niña	Niño	Niña	Niño	Niña	Niño	Niña
<b>6</b>	1300	1250	1500	1450	1750	1650	2000	1950
<b>7</b>	1400	1300	1600	1500	1850	1700	2150	2050
<b>8</b>	1450	1350	1700	1600	1950	1800	2225	2170
<b>9</b>	1500	1400	1800	1650	2000	1900	2350	2250
<b>10</b>	1600	1500	1875	1700	2150	2000	2500	2400

<sup>a</sup>Derivados de las siguientes ecuaciones:

Niños 6-8 años: REE = 88,5 - 61,9 x edad (años) + NA x (26,7 x peso [kg] + 903 x talla [m]) + 20 (kcal para depósito energía)

Niñas 6-8 años: REE = 135,3 - 30,8 x edad (años) + NA x (10,0 x peso [kg] + 934 x talla [m]) + 20 (kcal para depósito energía)

Niños 9-18 años: REE = 88,5 - 61,9 x edad (años) + NA x (26,7 x peso [kg] + 903 x talla [m]) + 25 (kcal para depósito energía)

Niñas 9-18 años: REE = 135,3 - 30,8 x edad (años) + NA x (10,0 x peso [kg] + 934 x talla [m]) + 25 (kcal para depósito energía)

<sup>b</sup>NAF se refiere al grado de actividad física:

NA= 1,0 si NAF => 1 < 1,4 (sedentario); NA= 1,12 si NAF => 1,4 < 1,6 (activo bajo)

NA= 1,27 si NAF => 1,6 < 1,9 (activo); NA= 1,45 si NAF => 1,9 < 2,5 (muy activo)

(Adaptado de Peña Quintana et al. Alimentación del preescolar y escolar. SEGHP. 2010)

**TABLA B. DRIs: REQUERIMIENTOS DE MACRONUTRIENTES**

EDAD (años)	CARBOHIDRATOS (g/día)	PROTEÍNAS (g/día)	PROTEÍNAS (g/Kg pc/día)	LÍPIDOS (g/día)
<b>4-8</b>	<b>130</b>	<b>19</b>	<b>0,95</b>	<b>25-35</b>
<b>9-13</b>	<b>130</b>	<b>34</b>	<b>0,95</b>	<b>25-35</b>

(Adaptado de *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. 2002/2005*).

**TABLA C. DRIs: REQUERIMIENTOS DE MINERALES**

Edad (años)	Calcio (mg/día)	Hierro (mg/día)	Yodo (µg/día)	Magnesio (mg/día)	Zinc (mg/día)	Selenio (µg/día)	Sodio (mg/día)	Potasio (mg/día)	Fósforo (mg/día)
<b>4-8</b>	800	10	90	130	5	30	1200	3800	500
<b>9-13</b>	1300	8	120	240	8	40	1500	4500	1250

(Adaptado de *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. 2002/2005*).

**TABLA D. DRIs: REQUERIMIENTOS DE VITAMINAS**

Edad (años)	Vit. B <sub>1</sub> (mg/día)	Vit. B <sub>2</sub> (mg/día)	Niacina (mg/día)	Vit. B <sub>6</sub> (mg/día)	Ác. Fólico (µg/día)	Vit. C (mg/día)	Vit. A (µg/día)	Vit. D (µg/día)	Vit. E (mg/día)
<b>4-8</b>	0,6	0,6	8	0,6	200	25	400	5	7
<b>9-13</b>	0,9	0,9	12	1,0	300	45	600	5	11

(Adaptado de *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. 2002/2005*).

## **Objetivos Nutricionales**

Los objetivos nutricionales se definen como el conjunto de recomendaciones que pretenden guiar la alimentación de una población hacia patrones de consumo más saludables, de manera que cubran las ingestas dietéticas de referencia (DRIs), promoviendo la salud de la población a la que se dirigen y previniendo o controlando las enfermedades nutricionales tanto por exceso como por defecto de la ingesta, reduciendo el riesgo de enfermedades relacionadas con la dieta (Muñoz et al, 2002; Martínez et al, 2002; Aranceta et al, 2004). En España, existen varios organismos y sociedades que han editado sus propios de valores de referencia. Por ello, se han creado los objetivos nutricionales de la población española (SENC, 2011), que incluyen valores intermedios y finales para porcentajes de energía de macronutrientes y ácidos grasos, consumo de frutas y verduras, frecuencia de consumo de alimentos azucarados, ingestas estimadas de folatos, calcio, sodio, fluoruros, yodo, fibra dietética y colesterol, consumo de alcohol actividad física, IMC y duración de la lactancia. En conclusión, dichos objetivos nutricionales para la población española pueden servir de base para el desarrollo de guías dietéticas y políticas nutricionales en España dentro de un contexto mediterráneo.

## **1.4. Patrones dietéticos de nuestro entorno**

### **Patrón Occidental**

Se caracteriza por un consumo más elevado de alimentos ricos en grasas y azúcares como carnes rojas y procesadas, patatas fritas, platos preparados, productos elaborados con harinas refinadas, lácteos enteros, bebidas azucaradas, un consumo más elevado de bebidas alcohólicas (vino, cerveza y otras bebidas alcohólicas) y por un bajo consumo de frutas frescas y zumos de frutas, productos lácteos bajos en grasa y productos de grano entero (Ciprian et al, 2013).

### **Patrón Mediterráneo**

El término *patrón dietético mediterráneo* fue definido en la Conferencia Internacional sobre las Dietas del Mediterráneo en 1993, como el patrón dietético encontrado en las zonas olivareras de la región mediterránea a principios de la década de 1960, caracterizado por un alto consumo de aceite de oliva; alto consumo de legumbres; alto consumo de cereales sin refinar; alto consumo de frutas; alto consumo de verduras; consumo moderado de productos lácteos, principalmente queso y yogures; consumo de pescado de moderado a alto; bajo consumo de carne y productos cárnicos; y consumo moderado de vino (Willett et al, 1995; Martínez-González et al, 2009; Bach-Faig et al, 2011)

Los hábitos nutricionales que tradicionalmente se observan en algunos países del área mediterránea han creado el concepto de “dieta mediterránea”, cuyo interés nutricional radica en la variedad de alimentos que en ella se incluyen (de hecho, cada grupo de alimentos está siempre provisto en una proporción adecuada) y el aporte equilibrado de calorías y nutrientes que garantizan, a través de una combinación de frutas y verduras con pan, pasta y arroz, así como legumbres con productos lácteos, pescado y carnes rojas y aceite de oliva como grasa para cocinar (Willett et al, 1995; Trichopoulou et al, 1997).

Sin embargo, la industrialización y comercialización de la cadena alimentaria en los países occidentales y el gran aumento de la producción de alimentos procesados, están provocando una serie de cambios en los hábitos y preferencias alimentarias en la población. La sociedad ha aceptado un patrón dietético occidental, lo que conduce a un aumento del consumo de grasas saturadas y colesterol en la dieta (Sánchez-Villegas et al, 2006; Trichopoulou et al, 2003). Este deterioro del patrón alimentario mediterráneo ha hecho que comience una paulatina desaparición de la dieta mediterránea (Tur et al, 2005; Bach-Fai et al, 2011) por lo que se ve perjudicada la calidad de los hábitos alimentarios de

la población general y, especialmente, de aquellos sectores de población más susceptibles de ser influenciados, como es la población infantil (Durá-Travé et al, 2014).

Sin embargo, se observó una menor adherencia a este patrón dietético en niños de países mediterráneos y estuvo implicado en la prevalencia más alta registrada de obesidad infantil en Grecia (Bacopoulou et al, 2017). Esta tendencia sugiere la probabilidad de tasas de obesidad aún más altas en la adolescencia y la edad adulta en el futuro cercano, con consecuencias adversas para la salud (Farajian et al, 2011).

Se sabe que un patrón dietético similar al mediterráneo es inversamente asociado con la mortalidad, así como con una serie de enfermedades crónicas incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad, síndrome metabólico y también diabetes tipo 2. Se han observado tales beneficios tanto en Mediterráneo, así como en países no mediterráneos (Trichopoulou et al, 2003; Estruch et al, 2013; Couto et al, 2011; Esposito et al, 2013; Kesse-Guyot et al, 2013. Tognon et al, 2014)

Una mayor adherencia a un patrón dietético similar al mediterráneo se asocia con una mejora significativa en el estado de salud. Puede reducir el riesgo de síndrome metabólico, la morbilidad y mortalidad por enfermedades crónicas importantes, así como la mortalidad total. Una asociación inversa entre este patrón y el sobrepeso, particularmente en la infancia, podría tener implicaciones para la salud a corto y largo plazo, pero solo unos pocos artículos describen su relación con el estado de peso, el IMC, la circunferencia de la cintura o la relación cintura-estatura de los niños (Barrios-Vicedo et al, 2015).

Existen varios índices para evaluar la adherencia a un patrón dietético mediterráneo para adultos, mientras que para niños se emplea el índice KIDMED en asociación con indicadores de obesidad. Serra-Majem et al. (2004) desarrollaron el *Índice de la calidad de la dieta mediterránea para niños y adolescentes* (generalmente conocido como KIDMED), basado en 16 preguntas diferentes de frecuencia de consumo de alimentos.

Las preferencias actuales en materia de alimentación en los niños españoles se inclinan hacia alimentos como la pasta, el arroz y la carne, mientras que los vegetales, legumbres y pescado son los menos apetecibles; además de que muestran un alto consumo de refrescos, que reemplaza el consumo de leche y fruta (Pérez-Rodrigo et al, 2003).

Haciendo una valoración general, se podría afirmar que la dieta seguida por los jóvenes españoles tiene carácter hipercalórico debido a una ingesta excesiva de grasa, que en numerosos estudios supera el 39-40% de la ingesta energética diaria; al mismo tiempo, esta elevada ingesta de grasa está caracterizada por aportes elevados de AGS (>10%) y bajos en AGMI (<20%). El aporte proteico puede llegar a duplicar o triplicar lo

recomendado en las ingestas diarias recomendadas, por lo que puede ser considerada como dieta hiperproteica. Por el contrario, la ingesta de hidratos de carbono no alcanza el porcentaje recomendado (>50%) quedándose por debajo del 45% en la mayoría de los estudios. Todo esto justifica que el grado de adherencia al patrón dietético mediterráneo sea cada vez más bajo en edades escolares, lo que a su vez puede explicar el incremento del sobrepeso y obesidad entre este colectivo (medido como IMC), poniendo en compromiso la salud en la etapa adulta (Serra-Majem et al, 2000 y 2007; Fernández, 2006; Velasco et al, 2009).

### **1.5. Parámetros antropométricos para la valoración del sobrepeso/obesidad**

El índice de masa corporal (IMC) se ha convertido en el indicador antropométrico más práctico para la clasificación de sobrepeso y obesidad; es barato, de aplicación universal y no invasivo (Sánchez Echenique, 2012).

Existe cierta reticencia a describir a los niños como obesos solo sobre la base de IMC, es decir, sin tener en cuenta alguna medida más directa de la grasa corporal, pero el reconocimiento de las dificultades para la obtención de medidas más inmediatas de la grasa corporal y la falta de referencias para su interpretación se ha traducido en el uso del IMC para la edad y sexo por sí solo para definir el sobrepeso y la obesidad desde el punto de vista epidemiológico (Sánchez-Echenique, 2012; de Onís et al, 2010).

Para los adultos, el IMC es la fórmula más utilizada para clasificar a la población según su grado de obesidad (de Onís et al, 2015), pero este parámetro varía sustancialmente con la edad en los niños (Cole et al, 2012). Los criterios más ampliamente reconocidos son los propuestos por la OMS (de Onís et al, 2007) y el Grupo Internacional de Obesidad (IOTF) (Cole et al, 2012); sin embargo, no hay consenso sobre los puntos de corte apropiados para diferenciar entre el peso normal y el sobrepeso en los niños, lo que dificulta las decisiones sobre intervenciones nutricionales (Nilsen et al, 2016). Además, se ha informado que el IMC puede tener baja sensibilidad como indicador de sobrepeso/obesidad y distribución de grasa corporal (Reilly et al, 2000).

Durante la última década, se han propuesto nuevos parámetros corporales como indicadores de riesgo metabólico, incluida la relación entre la circunferencia de la cintura y la altura (Bibiloni et al, 2013; Marrodán et al, 2014). La circunferencia de la cintura se ha correlacionado significativamente con el IMC y el porcentaje de grasa corporal (%G) en

niños y adultos. El índice cintura-talla (ICT) se mide fácilmente y permanece estable durante todo el crecimiento y está relacionado con los marcadores cardiometabólicos en la infancia y la adolescencia (Dobashi et al, 2017).

El IMC fue definido por la OMS y se ha utilizado durante años como un índice estándar para el cálculo de la obesidad en la población. En niños, el cálculo de la composición corporal debe considerar el componente graso de la composición corporal y la mayoría los métodos fiables para esta medición incluyen la absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA), la tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (RM) (Binkovitz et al, 2008) y la pletismografía de desplazamiento de aire (PDA). Sin embargo, todas estas técnicas son costosas en comparación con la medición de la altura y la circunferencia de la cintura, que no requiere equipo costoso y, por lo tanto, se ha propuesto como la mejor opción (Martín-Calvo et al, 2016).

El índice de masa corporal en la niñez cambia sustancialmente con la edad. Es evidente que se necesita un punto de corte relacionado con la edad para definir la obesidad infantil, basado en el mismo principio a diferentes edades, por ejemplo, utilizando percentiles de referencia. Independientemente del percentil o la población de referencia, el punto de corte aún puede ser criticado como arbitrario. Se ha propuesto una nueva definición de sobrepeso y obesidad en la infancia, basada en datos internacionales agrupados para el índice de masa corporal y vinculada al punto de corte de obesidad en adultos ampliamente utilizado de 30 kg/m<sup>2</sup>. La definición es menos arbitraria y más internacional que otras, y debería fomentar la comparación directa de las tendencias de la obesidad infantil en todo el mundo (Cole et al, 2000).

En cuanto a la definición de obesidad infantil, no existe un criterio consensuado para establecer sobrepeso u obesidad a partir del índice de masa corporal (IMC). Los dos criterios que gozan de mayor aceptación internacional son el propuesto por la OMS (de Onís et al, 2007) y el postulado por la International Obesity Task Force (IOTF) (Cole et al, 2000). En España, además, está extendido el uso de las tablas publicadas por la Fundación Orbegozo (Sobradillo et al, 2004), que son las utilizadas en el estudio EnKid, que evalúa los hábitos alimentarios y el estado nutricional de la población infantil y juvenil en España (1998-2000) y considera como puntos de corte los valores correspondientes al percentil 85, sobrepeso, y el percentil 95, obesidad, específicos por edad y sexo (Sánchez-Cruz et al, 2013).

La clasificación de sobrepeso/obesidad se basa en tres selecciones previas: 1) un indicador antropométrico adecuado; 2) una población de referencia con la cual comparar el índice

de niños; 3) unos puntos de corte que identifiquen a los individuos en riesgo de morbilidad sobrepeso/obesidad (Sánchez-Echenique, 2012).

## **1.6. Incidencia y prevalencia de sobrepeso/obesidad en la edad escolar**

La obesidad infantil es uno de los desafíos de salud pública más difíciles de este siglo. Se asocia con un mayor riesgo de aparición temprana de diabetes, enfermedades cardiovasculares y problemas respiratorios y una mayor probabilidad de fracturas e hipertensión, resistencia a la insulina y trastornos psicológicos, entre otras complicaciones graves de salud. La obesidad infantil se asocia con una mayor probabilidad de obesidad, muerte prematura y discapacidad en la edad adulta. Pero además de estos mayores riesgos futuros, los niños obesos sufren dificultad respiratoria, mayor riesgo de fracturas e hipertensión, y presentan marcadores tempranos de enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina y efectos psicológicos (OMS, 2014).

La principal causa del sobrepeso y la obesidad infantil es un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. Sin embargo, una dieta hiperenergética (por ejemplo, un consumo excesivo de energía) y la falta de actividad física no son los únicos factores influyentes. La obesidad infantil también está asociada con el desarrollo social y económico, y las políticas de agricultura, transporte, urbanismo, medio ambiente, educación y procesamiento, distribución y comercialización de alimentos, que requieren una atención especial en la lucha contra la epidemia de obesidad. En particular, se debe tener en cuenta que la prevalencia de sobrepeso y obesidad es mayor en niños con niveles socioeconómicos y culturales más bajos (Gil et al, 2017). Por lo general, los niños no pueden elegir dónde viven o los alimentos que consumen y, por lo tanto, requieren atención especial en las campañas contra la epidemia de obesidad. (OCDE, 2017).

La comercialización de alimentos y bebidas dirigida a los niños tiende a centrarse en productos ricos en grasas, azúcar y/o sal y se sabe que tiene un gran impacto. Estos productos son promovidos por una amplia gama de técnicas para llegar a los niños en guarderías, escuelas, supermercados y en el hogar, incluida la utilización de Internet. En particular, existe evidencia considerable de que la publicidad televisiva influye en las preferencias dietéticas y los patrones de consumo de los niños.

La obesidad es responsable del 5-10% del gasto total en atención médica en los países de la OCDE (OCDE, 2017). La prevención es clave para el problema de la obesidad en los

niños, cambiando sus hábitos alimenticios y de actividad física y minimizando la exposición a los obesógenos ambientales. El grupo de edad entre 3 y 12 años es especialmente crítico, porque los niños son más receptivos a los consejos y a la adopción de nuevos hábitos (OCDE, 2017).

La prevalencia de la obesidad infantil es muy alta en Europa. Según el estudio COSI de la OMS, el 19,3-49,0% de los niños y el 18,4-42,5% de las niñas tenía sobrepeso y obesidad (OMS, 2007). La prevalencia de obesidad osciló entre el 6,0 y el 26,6% entre los niños y del 4,6 al 17,3% entre las niñas. Las comparaciones entre varios países sugieren la presencia de un gradiente norte-sur con el nivel más alto de sobrepeso encontrado en los países del sur de Europa.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) proyecta un aumento constante en las tasas de obesidad, que se espera que sean particularmente altas en los Estados Unidos, México e Inglaterra, donde el 47%, el 39% y el 35% de la población, respectivamente, se prevé que sean obesos en 2030. Se espera que este aumento sea menor en algunos países como Italia y Corea (13% y 9% en 2030, respectivamente), mientras que el porcentaje previsto en Francia y España es de alrededor de 21%.

### **Prevalencia en España**

En España la prevalencia de sobrepeso/obesidad ha aumentado según los últimos estudios reportados desde 1984, en poblaciones de 2 a 18 años de edad, hasta los sucesivos realizados en el año 2000 (EnKid) (Serra-Majem et al, 2003), 2011 (ALADINO) (Pérez-Farinós et al, 2013) y 2013 (ANIBES) (Aranceta et al, 2016). Según datos del estudio EnKid, y teniendo en cuenta los puntos de corte de la Fundación Orbegozo (Sobradillo et al, 2004), la prevalencia de sobrepeso y obesidad era, según el percentil 97, de 14,5% y 15,9% respectivamente en la etapa prepuberal (6-9 años). Según el Estudio ALADINO la prevalencia de sobrepeso fue de 14,0% y de obesidad 16,8%. El estudio ANIBES concluyó que la prevalencia de sobrepeso fue de 35,8% y de obesidad 19,9%.

El Informe SESPAS (Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria) 2010 refería valores de exceso de peso infantil del 35% (el 20% de sobrepeso y el 15% de obesidad) (Sánchez-Cruz et al, 2013). Según la base de datos de la IOTF (2012), la prevalencia de sobrepeso y obesidad en España en el año 2012 fue de 8,6% y 24,6% respectivamente. Según los últimos datos de la Encuesta Nacional de salud española, la prevalencia de sobrepeso es del 9,70% y la de obesidad del 13,09% entre los jóvenes de 2 a

17 años de nuestra región (Andalucía) (INE, 2018). La obesidad ya es responsable del 5-10% del gasto sanitario total en los países de la OCDE (OCDE, 2017).

## **1.7. Prevención del sobrepeso/obesidad: práctica de actividad física**

El sobrepeso, la obesidad y las enfermedades relacionadas se pueden prevenir en gran medida (OMS, 2014).

La Asamblea Mundial de la Salud en 2010 aprobó un conjunto de recomendaciones para la ingesta de alimentos y bebidas de los niños. Las principales medidas que se aplican en nuestro medio para conseguir una alimentación equilibrada durante la edad escolar son la promoción de la Dieta Mediterránea y una promoción de hábitos de vida saludables que pasan también por la práctica diaria de actividad física.

La prevención es clave e implica cambios en sus hábitos alimenticios y de actividad física (AF) para minimizar su exposición a obesógenos ambientales. El grupo de edad entre 3 y 12 años es especialmente crítico porque los niños son más receptivos a los consejos y la adopción de nuevos hábitos (OCDE, 2017).

Los niños con niveles de actividad física más altos tienen una mejor condición física, un peso y composición corporal más adecuados, mejor salud metabólica y cardiovascular, mejor salud ósea y salud mental (valores más favorables en escalas de ansiedad y depresión) (Janssen et al, 2010).

Se recomienda realizar 60 minutos o más de actividad física diaria, principalmente actividad aeróbica de intensidad moderada a intensa al menos 3 días a la semana. Realizar actividades que sean variadas, apropiadas para cada edad y divertidas. Aprovechar todos los ámbitos de la actividad física para aumentar los niveles: desplazamientos hacia la escuela, la actividad en los tiempos de recreo de la escuela, la educación física, el deporte y el tiempo libre. Limitar el tiempo de pantalla (televisor, ordenador, consola o dispositivos móviles) a menos de dos horas diarias. Pasar más de 2 horas al día sentado se asocia con una condición física menor, una composición corporal inadecuada, menor grado de satisfacción personal y menor rendimiento académico (Okely et al, 2012; Tremblay et al, 2011).

Las investigaciones indican que el gasto de energía en reposo es mayor en niños que en adultos y ligeramente mayor en niños que en niñas (Goran et al, 1995; Müller et al, 2018).

El gasto de energía en reposo relativamente mayor en niños versus adultos probablemente se deba a una variedad de factores que incluyen el crecimiento y la pubertad y las diferencias de masa corporal. Las tasas de equivalente metabólico (MET) se pueden aplicar a adultos, pero no a niños.

El gasto de energía para completar una tarea también puede ser mayor para los niños que para los adultos, aunque las investigaciones sobre el verdadero gasto de energía de los niños se han limitado a muy pocas actividades como caminar, correr y andar en bicicleta. Algunos estudios han evaluado el gasto energético del ejercicio relacionado con la edad durante la infancia y la adolescencia para determinar cuándo desaparece la disparidad en el gasto metabólico entre niños y adultos. Sus hallazgos sugieren que: 1) de 7 a 12 años no hay diferencia en el gasto de energía entre niños y niñas; 2) de 12 a 14 años las niñas pueden mostrar respuestas de adultos, mientras que los niños no muestran respuestas de adultos hasta casi el final de la adolescencia (Harrell et al, 2005; Ainsworth et al, 2018).

Se han adoptado diversas estrategias para estimar las tasas de gasto energético en niños en función de los valores de los adultos: 1) Muchos manuales expresan tasas de gasto energético en valores MET que son múltiplos de la tasa metabólica en reposo (TMR) (Harrell et al, 2005); 2) las recomendaciones de la FAO/OMS/UNU (FAO/WHO/UNU, 2007) implican multiplicar la TMR medida/estimada de los niños por factores para diferentes tipos de actividad; y 3) Torun recomienda los valores MET prescritos (para niños de 1 a 15 años) o la multiplicación de los valores MET adultos por un factor de corrección de edad de acuerdo con la actividad realizada (Torun et al, 2005; Ridley et al, 2008).

## **1.8. Disruptores endocrinos**

Los disruptores endocrinos (DEs) pueden ser derivados de síntesis o naturales, procedentes de animales, humanos o de plantas (fitoestrógenos). La preocupación internacional se centra actualmente en los productos químicos sintéticos. Esta preocupación se ve amplificada por dos factores: la expansión de la producción química, que ha llegado a 400 millones de toneladas a nivel mundial, y el aumento de la contaminación de estos productos químicos. El impacto en la salud humana a través de efectos conocidos o desconocidos de estas sustancias químicas en los sistemas hormonales es importante.

Además de los efectos sobre el desarrollo y la reproducción, emergen otros trastornos metabólicos relacionados con los DEs. Las tasas mundiales de la obesidad han aumentado

dramáticamente en las últimas tres décadas en los adultos, los niños y adolescentes, especialmente en los países desarrollados.

Aunque los factores genéticos pueden explicar una parte de la predisposición a la obesidad, por sí solas no pueden dar respuesta a la repentina aparición y progresión de la epidemia de obesidad en el mundo actual. La exposición a sustancias químicas que alteran el sistema endocrino se reconoce cada vez más como un contribuyente, independiente de la dieta y la actividad física (Legler et al, 2015). El aumento de la incidencia de enfermedades metabólicas se correlaciona con cambios sustanciales en el entorno químico resultante de los nuevos procedimientos industriales y agrícolas, iniciados en los últimos 50 años. Este cambio en el medio ambiente ha llevado a la hipótesis de que algunos de los contaminantes del medio ambiente muchos de ellos disruptores hormonales (DEs), que interfieren con diversos aspectos del metabolismo, pueden ser también factores de riesgo para la obesidad (McAllister et al, 2009; Baillie-Hamilton, 2002). Esta hipótesis está apoyada por investigaciones sobre animales, así como los estudios epidemiológicos que han demostrado que una variedad de DEs ambientales pueden influir en la adipogénesis y la obesidad (Elobeid et al, 2008; Chen et al, 2009).

### **Mecanismo de acción de los disruptores endocrinos (DE)**

La función hormonal se manifiesta a través de la interacción con sus receptores, clasificados en dos grandes grupos:

- a) Receptores de membrana, que responden principalmente a las hormonas peptídicas como la insulina.
- b) Receptores nucleares (NR), que se activan por la interacción con pequeñas moléculas lipofílicas como las hormonas esteroideas sexuales.

Los DEs puede presentar múltiples mecanismos de acción y una vía privilegiada de acción es a través de su interacción directa con un receptor nuclear (NR), que presumiblemente perturba o modula la expresión de genes. Así, la mayoría de los DEs asociados a la reproducción y el desarrollo actúan al interferir con la función del receptor de estrógeno (ER) y/o receptor de andrógenos (AR), interrumpiendo la actividad normal de estrógenos y andrógenos. En los seres humanos, la superfamilia NR incluye 48 miembros que comparten una estructura común y se unen como dímeros a elementos de respuesta específicos situados cerca de los promotores de genes diana. Además de los receptores de

esteroides sexuales, la superfamilia NR incluye factores de transcripción que juegan un papel fundamental en la integración de la homeostasis metabólica y el desarrollo.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar el mecanismo de acción de los DEs, de acuerdo con la revisión realizada por Casals-Casas et al. (2011):

1) Productos químicos disruptores endocrinos que interactúan con el receptor de aril hidrocarburos (AHR) y con diversos miembros de la superfamilia de los receptores nucleares (NR), que transmiten la interrupción del metabolismo mediado por la disrupción endocrina. Sensores de receptores, como receptores activados de peroxisomas (PPAR), juegan un papel destacado en el mecanismo de acción. DEs como el Bisfenol-A se han implicado en las alteraciones metabólicas a través de una compleja interacción con los receptores hormonales, tales como los receptores de los estrógenos (ER), receptores de la hormona tiroidea (TR) y receptores de los glucocorticoides (GR). Estos receptores son importantes para el control de la adipogénesis, aumento de peso y los niveles de insulina, aunque los mecanismos subyacentes no están todavía bien estudiados.

2) Productos químicos disruptores endocrinos que interfieren con los receptores nucleares (NR) de señalización a través de múltiples mecanismos. Los DEs pueden actuar como agonistas o antagonistas directos de NR1, tomando el lugar del ligando endógeno. Pueden actuar como coactivadores y activar la transcripción de genes diana, si bien algunos DEs actúan como moduladores y no como agonistas totales mediante la inducción de algún coactivador. Los DEs actúan como antagonistas a favor de cambios conformacionales que permiten la selección de un correpresor o bien inhibiendo la unión al ADN y la expresión del gen diana.

### **Categorías de productos químicos con actividad disruptora endocrina**

El concepto de incluye los plaguicidas, los compuestos utilizados en la industria del plástico y productos de consumo, y otros subproductos industriales y contaminantes. A menudo están dispersos en el medio ambiente y los persistentes pueden ser transportados a largas distancias; encontrándose prácticamente en todas las regiones del mundo (Costa et al, 2008; Jensen et al, 2008; Kovarova et al, 2008; McKinlay et al, 2008). Algunos DEs pueden ser almacenados durante años en animales y en la masa grasa humana (López-Espinosa et al, 2007 y 2008; Jiménez Torres et al, 2006; Carreño et al, 2007; Cerrillo et al, 2006; Fernández et al, 2004). Los DEs que se degradan rápidamente en el medio ambiente o en el cuerpo humano, o que pueden estar presentes únicamente en períodos

cortos de tiempo, también pueden tener graves efectos perjudiciales si la exposición ocurre durante períodos críticos del desarrollo.

Las principales categorías de productos químicos con actividad de disrupción endocrina han sido publicadas recientemente (Casals-Casas et al, 2011). A continuación, se desarrollan los de mayor interés en esta investigación:

- **Plaguicidas.** Son cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga (U.S. Environmental Protection Agency, 2000 y 2007). Con respecto a los trastornos metabólicos, numerosos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a pesticidas con la obesidad, la diabetes, resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Hatch et al, 2010; Porta et al, 2009; Lee et al, 2007; Park et al, 2010).
- **Compuestos orgánicos de estaño.** Cloruro de tributilestaño (TBT), cloruro de trifenilestaño y óxido de tributilestaño (TPTO), son contaminantes orgánicos persistentes utilizados como fungicidas agrícolas, rodenticidas, molusquicidas, como conservadores de la madera en pinturas para los buques y las redes de pesca, y para estabilizar los plásticos. La exposición humana puede provenir de fuentes alimenticias, como pescado y mariscos, o por agua potable contaminada. Se ha planteado el riesgo de exposición a través de ropa tratada con estos productos como parte de tintas de impresión y como fungicidas. Recientes estudios experimentales han revelado actividad proadipogénica de TBT y TPTO (Grün et al, 2006; Kanayama et al, 2005).
- **Bromados retardantes de llama (BFR).** Son aditivos de productos de consumo como equipos electrónicos, ropa y muebles. La exposición humana proviene de los ambientes interiores, la dieta y la exposición ocupacional (Costa et al, 2008; Sjodin et al, 1999; Jakobsson et al, 2002). Ocasionan alteraciones endocrinas y neurotoxicidad del desarrollo (Hamers et al, 2006). Los derivados halogenados de BPA son ampliamente utilizados como retardantes de llama. En la Unión Europea, está prevista la prohibición de su uso.
- **Material plástico.** Son fundamentales en la vida moderna, la salud pública y la medicina, por su variedad, robustez y bajos costos. La producción mundial de plástico superó los 335 millones de toneladas en 2016 (en Europa 60 millones de toneladas) (Halden et al, 2010) y el consumo europeo de plásticos se situó en 2016 en torno a los 49,9 millones de toneladas (Figura 1.8.1).

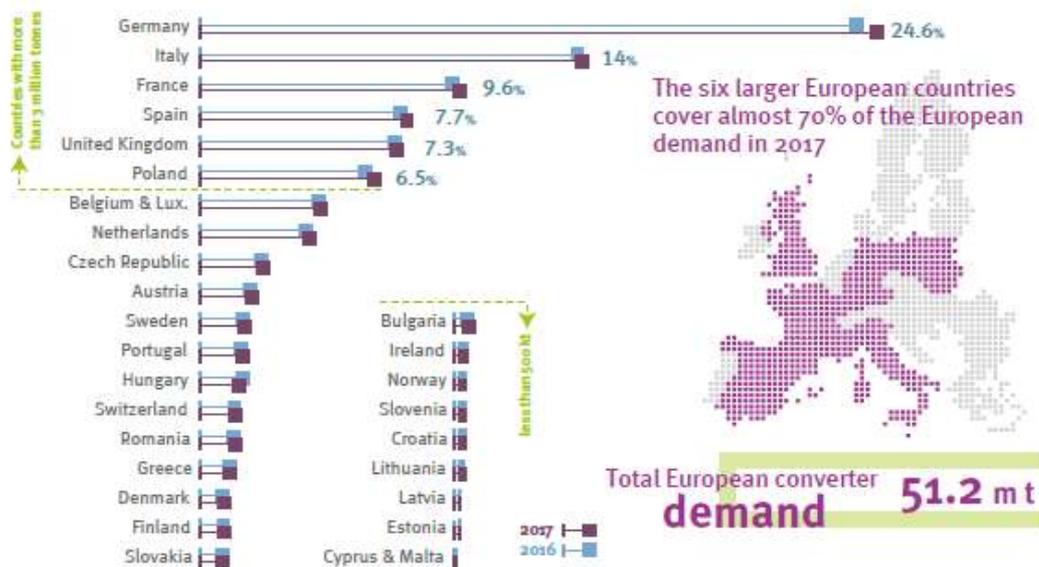


Figura 1.8.1 Demanda de plásticos por país en Europa. (Fuente: Plásticos - Situación en 2018. Análisis de los datos más recientes sobre la producción, la demanda y los residuos de plástico en Europa. www.plasticseurope.org.)

La controversia se basa en los riesgos que los plásticos pueden causar en los seres humanos, en particular con respecto a las propiedades de alteración endocrina. Los efectos adversos causados pueden derivar de los diversos componentes de los plásticos, los aditivos utilizados, o una combinación de ambos:

- **Alquilfenoles (4-nonilfenol y 4-n-octilfenol).** Son un grupo funcional de sustancias químicas utilizadas como herbicidas y otras aplicaciones como aditivos para plásticos en la fabricación de PVC y de poliestireno modificado con un alto potencial de contaminación ambiental. Son tensioactivos utilizados en detergentes, emulsionantes, agentes antiestáticos, demulsificantes y solubilizantes, encontrándose comúnmente en las aguas residuales (Soares et al, 2008). Producen proliferación de células tumorales de mama y presentan actividad estrogénica y antiandrogénica (Soto et al, 1991; Bonefeld-Jorgensen et al, 2007). La exposición humana se evaluó recientemente en una población de mujeres en el sur de España y el nonilfenol se detectó en el 100% de las muestras de tejido adiposo analizado, asociándose positivamente con el IMC (López-Espinosa et al, 2009).
- **Ésteres de ftalato.** Se han utilizado en todo el mundo como suavizantes para impartir flexibilidad y elasticidad a otros polímeros rígidos, como el PVC. Producido en grandes cantidades desde los años 1930, casi todos los grupos de

productos de consumo industrial contienen ftalatos o rastros de ftalatos. Pueden suponer el 80% del peso del producto (Halden et al, 2010). Contaminan los alimentos, especialmente las carnes y productos lácteos y se encuentran en casi todas partes en ambientes interiores. En los seres humanos, las concentraciones de ftalatos y varios metabolitos están positivamente correlacionadas con la obesidad abdominal y resistencia a la insulina en los adultos (Stahlhut et al, 2007).

- **Bisfenol A (BPA).** El Bisfenol A es monómero disfuncional usado en la fabricación de polímeros plásticos (PVC, policarbonatos, resinas de poliestireno, composites y selladores dentales), con una alta producción ( $> 2,5 \times 10^6$  kg/año). El BPA puede migrar de los envases de bebidas y alimentos, por ejemplo, de los biberones de plástico o revestimientos de lata (Brotons et al, 1995; Olea et al, 1996; López-Espinosa et al, 2007; Mariscal-Arcas et al, 2009; González-Castro et al, 2011) a su contenido. La exposición humana a BPA es generalizada y las moléculas no conjugadas de BPA se detectan en la sangre humana, tejidos, orina y leche (Calafat et al, 2005; Bhandari et al, 2013; Carwile et al, 2011; Li et al, 2013). La hipótesis del obesógeno ambiental sugiere que la exposición temprana a un elemento químico que interrumpe el sistema endocrino, como el BPA, puede aumentar el riesgo de aumento de peso más adelante en la infancia, pero pocos estudios epidemiológicos prospectivos han investigado esta relación (Vafeiadi et al, 2016). Dichas propiedades estrogénicas del BPA se describieron por primera vez en 1936 (Dodds, 1936). Estos estudios señalan una serie de efectos adversos en los mamíferos que incluyen pene anormal/desarrollo de la uretra, la disminución del recuento de espermatozoides, maduración sexual temprana en las mujeres y del cerebro y trastornos conductuales, asociaciones entre los niveles de BPA en sangre de mujeres y varias enfermedades, incluida la obesidad, abortos involuntarios recurrentes y esterilidad (Lang et al, 2008; Sugiura-Ogasawara et al, 2005; Takeuchi et al, 2004). Además, el aumento de las concentraciones urinarias de BPA está asociado con una mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular, diabetes y anormalidades en las enzimas hepáticas (Lang et al, 2008).

El informe de EFSA de 2013 sobre el BPA hace un recorrido muy amplio sobre estos materiales. Cabe citar algunos puntos como los siguientes: Resinas que contienen BPA se utilizan en los selladores dentales. El BPA no se utiliza directamente en los materiales dentales, pero se utilizan el BPA metacrilato de glicidilo (bisGMA) y otros derivados a base de dimetacrilato de BPA (bisDMA). Cualquier derivado del BPA utilizado que puede estar

presente como una impureza o se libera del sellador dental por la degradación del polímero, tiene el potencial de contribuir a la exposición oral al BPA. El BPA debe presentar un límite de migración específico de 0,6 mg/kg de alimento (Reglamento (UE) n° 10/2011). En 2010 el BPA se continuaba encontrando en biberones de poliamida (PA) recogidos en el mercado de la UE, a pesar de no esperar esta presencia en materiales de otros monómeros distintos de los policarbonatos o bien de silicona. Los altos niveles de migración encontrados aún en la actualidad en algunos materiales de uso infantil, sugieren más bien el uso ilegal como aditivo en PA o una contaminación con material no destinado al contacto con alimentos. La temperatura tiene un impacto importante en el nivel de migración de BPA en el agua: un incremento de 40° C a 60° C puede conducir a un aumento de 6 a 10 veces en el nivel de migración. Aunque la temperatura tiene un efecto importante en la migración, algunos autores han observado diferencias significativas entre baño de agua y el calentamiento por microondas.

### **Fuentes de exposición a BPA y derivados y obesidad infantil**

Toda esta revisión apoya el concepto de obesógenos en medio ambiente, pero se aconseja confirmación por parte de los estudios longitudinales ya que muchos estudios son transversales, una relación causal definitiva entre los trastornos metabólicos y exposición a DE sigue siendo hipotético. Pero no se debe olvidar que entre otras fuentes exposición a DEs se encuentran los selladores dentales (Olea et al, 1999; Pulgar et al, 2000). Un sellador es un material plástico que normalmente se aplica en las superficies masticatorias de los dientes posteriores (premolares y molares). Esta resina plástica se introduce y adhiere a las depresiones e irregularidades de estas superficies de los dientes posteriores. El sellador actúa como una barrera, protegiendo al esmalte de la placa dental de los ácidos (Servicio Canario de la Salud - Dirección General de Salud Pública). Según consideraciones del Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial, los selladores dentales deben aplicarse tan pronto como al niño le salgan las muelas permanentes, antes de que la caries pueda dañarlas. Las primeras muelas permanentes salen entre los 5 y 7 años de edad. Los otros dientes que tienen grietas y ranuras, conocidos como "premolares", también pueden necesitar selladores. Los selladores han existido desde los años sesenta. Las investigaciones del Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial y otras instituciones llevaron al desarrollo de los selladores y demostraron que son eficaces.

La presencia de monómeros de materiales plásticos, fundamentalmente el BPA, se ha probado por numerosos investigadores al analizar envases poliméricos de alimentos, composites y selladores dentales, papeles de envoltura de alimentos, etc.

Los estudios de epidemiología nutricional han identificado grupos de población en riesgo de exposición a contaminantes asociados con enfermedades crónicas no transmisibles (OMS, 2014; OMS, 2017). Los estudios de exposición a sustancias disruptoras hormonales (BPA, BADGE, BisGMA y BisDMA) están relacionados desde hace unos años con alteraciones endocrinas como diabetes tipo 2, síndrome metabólico y obesidad entre otras alteraciones del metabolismo (McAllister et al, 2009; Baillie-Hamilton, 2002).

El aumento de la incidencia de enfermedades metabólicas también se correlaciona con cambios sustanciales en el medioambiente resultante de los nuevos procedimientos industriales y agrícolas, iniciados a mediados del S.XX. Esto pone de manifiesto que muchos de ellos disruptores hormonales (DEs) que interfieren con diversos aspectos del metabolismo, pueden ser otros factores de riesgo para la obesidad. Esta hipótesis está apoyada por investigaciones sobre animales, así como por los estudios epidemiológicos que han demostrado que DEs ambientales pueden influir en la adipogénesis y la obesidad (Elobeid et al, 2008; Chen et al, 2009; Grün et al, 2009; Hatch et al, 2010). Hay periodos de la vida humana que hacen al sujeto más vulnerable y es necesario identificar fuentes de exposición a estos monómeros plásticos por parte de la población escolar española.

Existen varias categorías de productos químicos que ejercen una actividad de alteración endocrina, como son los plaguicidas, los compuestos de la industria del plástico y subproductos y contaminantes industriales. Algunos disruptores endocrinos pueden almacenarse durante años en tejidos animales y humanos (López-Espinosa et al, 2006; Jiménez-Torres et al, 2006; Cerrillo et al, 2006; Carreño et al, 2007), es el caso de sustancias con alto grado de persistencia en el medio ambiente como plaguicidas organoclorados. Otros productos se degradan rápidamente en el medio ambiente y en los seres vivos estando en contacto con ellos sólo por períodos cortos de tiempo y, sin embargo, pueden tener efectos graves si la exposición ocurre durante períodos críticos de desarrollo (Kundakovic et al, 2011; Itoh et al, 2012; Drobná et al, 2018).

Entre los DEs se encuentra un material polimérico que es fundamental en la vida moderna, salud pública y medicina, por su variedad, robustez y bajos costos: el Bisfenol A (BPA). El BPA es un monómero de alta producción (>2,5 millones de kg/año) que forma parte de plástico de policarbonato, resinas de poliestireno y composites dentales y selladores, entre muchos otros, y también se usa como aditivo en otros plásticos como el PVC (Konieczna et al, 2015; Hermabessiere et al, 2017). Puede formar parte de los selladores y compuestos dentales de tres maneras: como ingrediente directo, como subproducto de la degradación de otros ingredientes [por ejemplo, metacrilato de glicidilo de bisfenol A (bis-GMA) y

dimetacrilato de bisfenol A (bis-DMA)], o como material traza de su fabricación (ADA, 2011; US FDA, 2011; EFSA de 2015).

El BPA puede migrar de envases de bebidas y alimentos, biberones de plástico y el revestimiento de latas (Brotons et al, 1995; López-Espinosa et al, 2007; Mariscal-Arcas et al, 2009; González Castro et al, 2011; García-Córcoles et al, 2018). La exposición humana al BPA es universal y las moléculas de BPA no conjugadas se han detectado frecuentemente en muestras biológicas humanas (sangre, tejidos, orina y leche) (Gerona et al, 2013; Li et al, 2013; Zimmers et al, 2014; Hines et al, 2015; Niu et al, 2017).

La EFSA (2015) estableció una ingesta diaria tolerable (IDT) de BPA temporal de 4 µg/kg de peso corporal/día, en espera de los resultados de un estudio a largo plazo en ratas sobre la exposición al BPA prenatal y posnatal realizado por la FDA. La directiva 2009/48/CE estableció un límite de 40 µg/L para la migración de BPA de materiales en contacto con alimentos y productos alimenticios, instruyendo a los Estados Miembros a adoptar las medidas necesarias antes del 26 de noviembre de 2018. Sin embargo, aún no se han emitido estas conclusiones.

## **Fitoestrógenos en la dieta escolar**

Los fitoestrógenos son componentes naturales de las plantas y de numerosos alimentos que forman parte de la dieta habitual de humanos y animales (Mäkelä et al, 1995; Olea et al, 1999; Hernández-Elizondo et al, 2013; Krížová et al, 2019).

De acuerdo con la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido (2003), los fitoestrógenos se definen como cualquier planta, sustancia o metabolito que induce respuestas biológicas en vertebrados y que pueden imitar o modular la acción de los estrógenos endógenos, generalmente mediante unión a receptores de estrógenos. Hay varios grupos de fitoestrógenos: lignanos, isoflavonas, coumestanos, ácido resorcílico y enterolactonas, aunque este último grupo es menos importante en la nutrición humana. Las isoflavonas como la genisteína y la daidzeína parecen ser el grupo más potente y se encuentran en una amplia gama de alimentos, especialmente cereales, legumbres, verduras y frutas, siendo la soja la fuente más abundante para humanos (Knight et al, 1996; Agradi et al, 2006; Rodríguez-García et al, 2019).

La actividad hormonal de estas sustancias se conoce desde hace mucho tiempo (Kaldas et al, 1989; Wagner et al, 2008; Rietjens et al, 2017), y se ha descubierto que ejercen efectos estrogénicos y/o antiestrogénicos en animales de granja y salvajes, en ensayos in vivo e in

vitro, y en humanos (Mäkelä et al, 1995; Dixon, 2004; Saarinen et al, 2006; Jiang et al, 2010). Aunque los humanos y los animales se han adaptado a los fitoestrógenos a través de la evolución, la exposición a altas concentraciones de algunos de estos compuestos puede estar asociada con alteraciones en la producción de hormonas, de su metabolismo o de su acción a nivel celular (Albertazzi et al, 2008; Kwack et al, 2009; Costa et al, 2014) y en relación a la síntesis proteica, puede producir proliferación celular maligna o angiogénesis, entre otros (Adlercreutz et al, 1997; Desmawati et al, 2019; Hall et al, 2019).

Se ha postulado que la alta incidencia de cánceres hormono-dependientes en las sociedades occidentales puede estar relacionada con la disminución del consumo de frutas y verduras en los últimos 30-50 años (Adlercreutz et al, 1995; Bhakta et al, 2005).

Los ensayos in vitro han demostrado que ciertos fitoestrógenos tienen actividad estrogénica agonista a bajas concentraciones, estimulando la proliferación de células mamarias y la expresión de genes dependientes de estrógenos, y puede antagonizar el efecto de las hormonas naturales en altas concentraciones (Soto et al, 1992). El efecto estrogénico de los fitoestrógenos puede ser agonista o antagonista dependiendo no sólo de sus concentraciones en los tejidos, sino también de los niveles de estrógenos endógenos presentes en diferentes etapas de la vida humana (Bhakta et al, 2005).

Se ha informado que la ingesta dietética de fitoestrógenos es <1 mg día en España, Alemania, Inglaterra y Estados Unidos (Bhakta et al, 2005; Mulligan et al, 2007; Hernández-Elizondo et al, 2009), un poco más alto (<1,34 mg día) en Canadá y Escocia (Cotterchio et al, 2006; Heald et al, 2006), y considerablemente más alto (> 20 mg día) en Japón y Corea, atribuible al elevado consumo de derivados de soja como natto, miso y tofu (Surh et al, 2006).

Nuestro grupo de investigación ha publicado numerosos estudios sobre el efecto estrogénico de moléculas sintéticas y naturales que forman parte de los alimentos, ya sea como componente natural, especialmente en vegetales, o debido a su contaminación. Muchas de estas moléculas han sido clasificadas como disruptores endocrinos después de análisis de su comportamiento en medios biológicos en in vitro e in vivo (Olea et al, 1996; Pérez et al, 1998; López-Espinosa et al, 2009; Wolff et al, 2008). Sus efectos estrogénicos son similares a los de los disruptores endocrinos sintéticos como los monómeros de materiales plásticos, policarbonatos y resinas epoxídicas. Numerosos estudios tienen su exposición asociada a obesidad, clasificándolos como obesógenos (Fisberg et al, 2016; Townshend et al, 2017; Rubin et al, 2019).



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

Estudios de epidemiología nutricional han identificado grupos poblacionales con riesgos de exposición a sustancias contaminantes, que desembocan en enfermedades clasificadas por la OMS como enfermedades crónicas no transmisibles. Por este motivo la hipótesis de trabajo que se plantea es el estudio de exposición a sustancias disruptoras hormonales procedentes de la industria o bien de origen natural que se están relacionando a nivel epidemiológico, desde hace unos pocos años, con alteraciones endocrinas en las que se ponen de manifiesto cuadros de diabetes tipo 2, síndrome metabólico y obesidad entre otras alteraciones del metabolismo.

Ante esta diversidad de alteraciones y teniendo en cuenta que hay periodos de la vida humana que hacen al sujeto más vulnerable, se plantea la necesidad de identificar fuentes de exposición a estos monómeros plásticos por parte de la población escolar española. La presencia de monómeros de materiales plásticos, fundamentalmente el BPA, ya ha sido probada por el grupo solicitante al analizar envases poliméricos de alimentos, composites y selladores dentales, papeles de envoltura de alimentos, etc. en investigaciones precedentes, al igual que sustancias persistentes como plaguicidas y sustancias naturales como fitoestrógenos.

La hipótesis planteada es la posible relación entre exposición a disruptores hormonales y obesidad infantil. Para ello hacemos las siguientes consideraciones:

- a)** A qué materiales de este tipo están expuestos los escolares españoles,
- b)** Qué hábitos de vida y nutricionales siguen,
- c)** Hasta qué punto factores como exposición a materiales poliméricos inciden en cuadros clínicos como la obesidad infantil.

## **2.2. Objetivos**

El *objetivo principal* de este proyecto es poner de manifiesto el riesgo de exposición a Bisfenol A y fitoestrógenos y su relación con el incremento de la obesidad infantil en las últimas décadas.

Los *objetivos específicos* son:

- a)** Estimar los hábitos alimentarios y de energía y nutrientes de la población escolar.
- b)** Estimar los hábitos de vida y de actividad física.
- c)** Identificar las fuentes de exposición a fitoestrógenos y BPA de la población escolar.
- d)** Analizar los niveles de BPA en saliva de la población en estudio.
- e)** Establecer relación estadísticamente significativa entre el grado de sobrepeso/obesidad de los escolares y: a) ingesta de energía y nutrientes concretos; b) hábitos de vida tales como actividad física, c) niveles de fitoestrógenos en los alimentos, d) niveles de BPA en las muestras de saliva analizadas.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

En este capítulo se van a ir desarrollando conjuntamente los métodos utilizados en los distintos apartados realizados en la investigación con el material preciso para resolver cada una de las técnicas metodológicas descritas.

### **3.1. Población de estudio**

La población de estudio procede de una muestra de 700 sujetos de 15 centros educativos públicos y concertados, tanto de la capital como del área metropolitana de dos provincias del sur de España (Granada y Málaga), que formaron parte de dos proyectos de investigación, uno financiado por el Instituto de Salud Carlos III “Análisis de fuentes de exposición a Bisfenol A y derivados (disruptores endocrinos) e incidencia en la obesidad escolar”; FIS-PI14/01040, y el otro por el Área de Salud del Excmo. Ayuntamiento de Granada, a través del programa europeo THAO “Ciudades Saludables”.

Como criterios de inclusión se estableció la edad de los sujetos entre 7 y 10 años (inclusive) (Cuervo et al, 2009) y la firma del Consentimiento Informado de los padres/tutores de todos participantes en el estudio. En el Consentimiento informado se recogió, además, información sobre el estudio a realizar, formulado de acuerdo con la Declaración de Helsinki (52<sup>a</sup> Asamblea General. Edimburgo, Escocia, Octubre 2000) y aprobado por el Comité de Ética de investigación del Servicio Andaluz de Salud. En base a esto se excluyeron 42 sujetos (6%), quedando una muestra de estudio de 657 participantes.

### **3.2. Cuestionario**

Para este trabajo se realizó un cuestionario con distintos apartados para evaluar los aspectos planteados en los objetivos de esta Tesis Doctoral. Cada sujeto quedó codificado con 8 dígitos: el primero es la inicial de la provincia a la que pertenece el colegio, los dos siguientes corresponde al código de la ciudad (para Granada es el 18 y para Málaga es el 29), los dos siguientes el colegio y los tres últimos el número de alumno. Durante todo el trabajo se protegió la identificación del individuo del que se trataba ya que se separaron, previo al procesamiento del cuestionario, las primeras páginas correspondientes al

Consentimiento Informado y Datos Personales, páginas que quedaron reservadas en el protocolo de trabajo y sin difusión.

El cuestionario fue administrado por entrevistadores experimentados y específicamente entrenados y consta de los apartados que se describen a continuación:

- Datos personales del sujeto.
- Datos sociofamiliares y socioeconómicos.
- Cuestionario de Frecuencia de consumo de alimentos (FFQ).
- Cuestionario de Recuerdo de 24 horas (R24h).
- Hábitos de vida y relacionados con la alimentación.
- Cuestionario de actividad física (AF).
- Hábitos bucodentales y valoración del estado de la dentición.
- Antropometría.
- Exposición a Disruptores endocrinos (DEs).

### **3.2.1. Datos personales, sociofamiliares y socioeconómicos**

Se recogen datos sobre sexo y edad, centro educativo, curso escolar, ocupación de los padres, entre otros. Las ocupaciones de los padres se clasificaron según los diez grupos establecidos por la Clasificación Internacional de Ocupaciones 2011 (CNO-11), agrupadas en niveles: bajo (grupos 5-9), medio (grupos 3 y 4 y 0) y alto (grupos 1 y 2) de conformidad con la legislación nacional (RD 1591/2010 de 26 de noviembre; BOE-A-2010-19389).

- **Nivel Bajo:** Trabajadores de los servicios de restauración, personales, protección y vendedores, Trabajadores cualificados en el sector agrícola, ganadero, forestal y pesquero, Artesanos y trabajadores cualificados de las industrias manufactureras y la construcción -excepto operadores de instalaciones y maquinaria-, Operadores de instalaciones y maquinaria, montadores, Ocupaciones elementales.
- **Nivel Medio:** Técnicos; profesionales de apoyo, Empleados contables, administrativos y otros empleados de oficina, Ocupaciones militares.
- **Nivel Alto:** Directores y gerentes, Técnicos y profesionales científicos e intelectuales.

### **3.2.2. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ)**

El FFQ es un cuestionario retrospectivo y semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos, validado y ampliamente utilizado, con referencia a los 12 meses anteriores. Este cuestionario registra el consumo o no de cada alimento (variables dicotómicas), la cantidad de veces consumido por día, semana o mes (variables cuantitativas discretas), y la cantidad consumida en cada ocasión en gramos, mililitros o medidas caseras (por ejemplo, platos, vasos, cucharadas/cucharaditas, etc.).

El diseño del FFQ se hizo teniendo en cuenta los alimentos comúnmente consumidos por el grupo de población estudiado (Fornes et al, 2003; Kusama et al, 2005) y está basado en estudios previos realizados en niños en edad escolar (Mariscal-Arcas et al, 2007, 2009, 2010, 2011 y 2014; Velasco et al, 2009). Se incluyeron un total de 33 alimentos clasificados en 16 grupos: cereales y derivados, legumbres, tubérculos, verdura (fresca y cocinada), frutas, lácteos, aceite de oliva, carnes (blancas y rojas), derivados cárnicos, pescados (blanco y azul), huevo, dulces, golosinas/snacks, precocinados, zumos de fruta (natural y envasado), bebidas tipo refresco.

Para transformar la frecuencia de consumo de alimentos en energía y nutrientes, se ha empleado la metodología descrita por Willett (2012): la ingesta diaria de alimentos y nutrientes se calculó (en g o ml) a partir de los resultados multiplicando el tamaño de la porción estándar de cada alimento por el valor correspondiente a la frecuencia de consumo: nunca = 0; 1-3 veces/mes = 0,07; 1-2 veces/semana = 0,21; 3-4 veces/semana = 0,50; 5-6 veces/semana = 0,80; 1 hora/día = 1; y 2-3 veces/día = 2,5.

La estimación se realizó mediante el programa de valoración nutricional y gestión de datos en alimentación DIAL (Copyright © 2015 Alce Ingeniería) en combinación con la Base de datos de nutrientes alimentarios AUSNUT 2011-13, obteniendo así un listado de los nutrientes y energía consumidos por los escolares encuestados. (Ortega et al, 2016).

Las tablas de composición de alimentos rara vez informan sobre la presencia de componentes específicos, como es el caso de los fitoestrógenos de los vegetales. Por ello, la ingesta de fitoestrógenos (daidzeína, genisteína, formononetina, biocanina A, coumestrol, matairesinol, secoisoresinol, enterolactona y enterodiol) en la dieta diaria se estimó a partir de los datos publicados en la literatura (Pillow et al, 1999; Horn-Ross et al, 2000; Boker et al, 2002). La ingesta diaria de fitoestrógenos (mg/día) se calculó multiplicando la cantidad de alimentos (g/día) estimados en el FFQ por el valor del fitoestrógeno

correspondiente. La exposición a BPA se realizó a través del análisis de la exposición a los envases de alimentos.

### **3.2.3. Cuestionario de recuerdo de 24 horas (R24h)**

El R24h es un cuestionario de formato abierto en el que fundamentalmente se recoge información sobre la ingesta de alimentos y bebidas durante tres días completos: dos anteriores al de la realización de la encuesta y otro correspondiente a un festivo. También se registra el momento del día en el que se realiza la ingesta (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda, cena y recena), la hora y el lugar (casa, colegio, otros), así como la cantidad de alimento consumido expresada en medidas caseras (platos, vasos, cucharas, etc.), y su preparación o referencia comercial. Para ello se emplearon las Tablas de pesos de medidas caseras y raciones habituales de consumo (García-Arias et al, 2003. Moreiras et al, 2013).

En la realización del R24h se han tenido en cuenta tres aspectos fundamentales (Willett, 2012):

- Exactitud en la identificación de alimentos ingeridos y tamaño de porciones.
- Nivel de calidad de la base de datos de composición alimentaria, codificación y que el sistema de cálculo de nutrientes refleje una composición completa de los alimentos ingeridos actualmente.
- Que la selección de días de ingesta represente la ingesta habitual del sujeto.

### **3.2.4. Hábitos de vida y relacionados con la alimentación**

Información sobre variables cualitativas y cuantitativas como qué desayuna, dónde almuerza, qué merienda, etc. todas ellas relacionadas con los hábitos de alimentación.

### **3.2.5. Cuestionario de 24h de actividad física**

Es un cuestionario de formato abierto de recuerdo de 24 horas sobre la actividad física realizada durante el año anterior, que incluye: las horas de actividad física en un día completo, las características de los deportes practicados (tipo de ejercicio, frecuencia de la práctica, duración media de cada ejercicio), horas de sueño, método de ir a la escuela (andando, en coche, bicicleta, etc.), y las horas/semana de Educación Física en la escuela.

El análisis se ha llevado a cabo de acuerdo con el Método FAO/OMS/ONU. Las recomendaciones de FAO/OMS/ONU implican multiplicar la tasa metabólica en reposo (TMR) infantil medida o estimada por factores para diferentes tipos de actividades. Ir a la escuela y otras actividades ligeras se clasifican en 1,5 MET, actividad moderada = 2,2 MET y alta actividad = 6,0 MET (OMS, 2007).

También se ha empleado el Método de Torun (Torun et al, 2005; Ridley et al, 2008) que implica el uso de valores MET prescritos (para niños de 1 a 15 años) al multiplicar los valores MET adultos por un factor de corrección de edad, dependiendo de la actividad que se realice. Las actividades sedentarias se clasifican de la siguiente manera: acostado = 1,1 MET, sentado = 1,2 MET y de pie = 1,4 MET. A las actividades ligeras que no caminan se les asignan 2,0 METs para 1,5-6,9 años o 2,2 METs para 6,0-14,9 años. Caminar a un ritmo normal en terreno llano o las actividades moderadas tienen asignados 2,2 MET para niños de 1,5 a 6,9 años o 2,9 MET para niños de 6,0 a 14,9 años. Asignar valores MET para actividades más pesadas implica multiplicar los valores MET adultos por factores de corrección de edad de 0,50 para niños de 1,5 a 6,9 años, 0,65 para niños de 6,0 a 12,9 años y 0,80 para niños de 13,0 a 14,9 años.

### **3.2.6. Hábitos bucodentales y valoración del estado de la dentición**

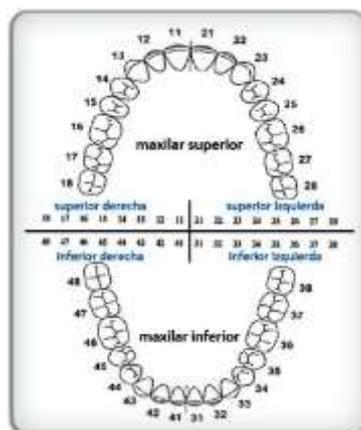
El reconocimiento se realizó con la colaboración de la Dra. Rosa Pulgar Encinas y su grupo de trabajo que han participado en el proyecto de investigación al que se adscribe esta tesis doctoral.

El examen se realizó con un espejo dental plano. Los examinadores utilizaron una metodología para las exploraciones que consistía en revisar de manera sistemática y ordenada, de un diente o espacio dentario, al diente o espacio dentario siguiente. Se consideró que un diente está presente en boca cuando alguna parte de él es visible.

Se recogieron variables correspondientes a la salud bucodental de la población:

- a) Presencia/ausencia de caries, identificando la pieza dental afectada;
- b) Presencia ausencia de sellador dental e identificación de las piezas selladas;
- c) Presencia/ausencia de piezas tratadas con composites dentales;
- d) Otras incidencias observadas por el odontólogo.

Para el registro del estado de la dentición se utilizaron tanto letras como números y se empleó el Odontograma empleado por la Federación Dental Internacional (FDI) (Figura 3.2.6.1).



**Figura 3.2.6.1. Odontograma utilizado en nuestro estudio (Fuente: FDI)**

Los niños menores de 11 años pueden estar en dentición mixta, es decir, tener dientes de leche y definitivos en la boca. Se utilizaron las mismas casillas para los dientes temporales y los permanentes (Tabla 3.2.6.2).

**TABLA 3.2.6.2. CÓDIGOS EMPLEADOS EN EL ESTADO DE LA DENTICIÓN**

Código		Estado
Dientes temporales	Dientes permanentes	
Corona		
A	0	Sano
B	1	Cariado
C	2	Obturado, con caries
D	3	Obturado, sin caries
E	4	Ausente como resultado de caries
-	5	Ausente por otra razón
F	6	Sellado de fisuras
G	7	Pilar de puente, corona, carilla o implante
-	8	Diente no erupcionado
T	T	Fracturado por trauma
-	9	No registrado

## **Interpretación del análisis oral realizado: Códigos**

**0 (A) Diente Sano:** cuando no existe evidencia de caries clínica tratada o sin tratar. Los estadios de caries que preceden a la cavitación así como otras condiciones similares de caries inicial se excluyen ya que no pueden diagnosticarse con fiabilidad. Por tanto, una corona con los defectos que exponemos a continuación debe considerarse como sana:

- Manchas blanquecinas pequeñas.
- Zonas rugosas o discoloreadas que al tacto con la sonda CPI no estén reblandecidas.
- Surcos o fisuras de esmalte teñidos, pero siempre que no existan signos de desmineralización subyacente al esmalte o reblandecimiento de las paredes o del fondo de la fisura detectables con la sonda CPI.
- Esmalte duro de aspecto punteado de color oscuro en dientes que muestren moderados signos de fluorosis.
- Lesiones que, en base a su distribución, examen visual o táctil parezcan secundarias a abrasión.

**1 (B) Diente cariado:** cuando aparece una lesión de surcos, fisuras o superficies libres que de forma inconfundible está cavitada, desmineralización subyacente al esmalte o reblandecimiento de paredes o suelo de la lesión detectable al tacto. También los dientes con obturaciones provisionales o selladores de fisuras pero que presentan caries se incluyen en este apartado. Cuando la caries es tan extensa que ha destruido la corona y sólo queda la raíz dentaria se entiende que la caries se ha iniciado en la corona del diente y, por tanto, se registra como caries de corona solamente. Se puede utilizar la sonda CPI para confirmar el diagnóstico, no obstante, cuando siga siendo dudosa la existencia de caries se registrará como sano.

**2 (C) Diente obturado con caries:** es aquél que presentando una o más obturaciones permanentes presenta, además una o más zonas cariadas, no se hace distinción entre caries primaria y secundaria (es decir que se aplica el mismo código con independencia de si la lesión de caries se asocia físicamente o no con la(s) restauración(es)).

**3 (D) Diente obturado sin caries:** es aquél que presenta una o más obturaciones permanentes y no muestra ninguna lesión de caries en otras zonas de la corona. Un diente que presenta una corona debido a una lesión de caries previa se registrará en esta categoría, por el contrario, si la corona obedece a otras razones distintas a la caries (por ejemplo, el diente es un pilar de puente) se registra con el código 7.

**4 (E) Diente ausente como consecuencia de caries.**

### **3.2.7. Antropometría**

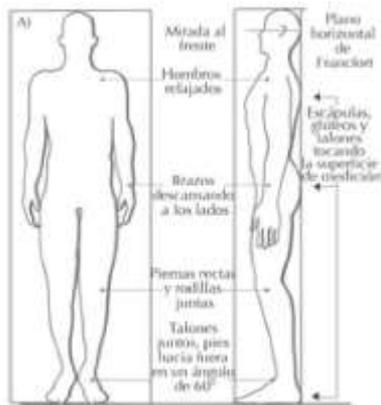
Los parámetros antropométricos que se determinaron fueron el peso, la talla o estatura y la circunferencia de cintura. Además de otros índices antropométricos estimados como el índice de masa corporal, el índice de cintura/talla y el porcentaje de grasa corporal. Para ello se usaron los siguientes instrumentos:

- **Peso:** Báscula de suelo modelo Seca 872 (Hamburgo, Alemania) con precisión de 100g.
- **Talla:** Estadiómetro modelo Seca 214; 20-207cm (Hamburgo, Alemania), con precisión de 1mm.
- **Circunferencia de cintura:** Cinta métrica modelo Seca 201 (Hamburgo, Alemania), con precisión de 1mm.

#### **3.2.7.1. Metodología de los Parámetros Antropométricos**

A continuación, se describe el método utilizado siguiendo los procedimientos descritos en el Manual de Procedimientos de Antropometría que es parte del protocolo de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES 2017-2018), realizada por el Centro Nacional de Estadísticas de Salud.

- **Peso corporal:** El sujeto, vestido con ropa ligera, se sitúa de pie en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo esté apoyado en ningún sitio y con los brazos colgando libremente a ambos lados del cuerpo. Se anota la unidad completa con dos decimales. La medida del peso se expresa en kilogramos (Kg).
- **Estatura o talla en bipedestación o de pie:** Se define como el tamaño vertical máximo y se expresa en centímetros (cm). El individuo se coloca de pie, descalzo, de la misma manera que muestra la Figura 3.2.7.1.1. La pieza horizontal y móvil del estadiómetro se baja hasta contactar con la cabeza del individuo en el punto más elevado del cráneo. Se anota la unidad completa con dos decimales.



**Figura 3.2.7.1.1. Medida de la talla**

- **Circunferencia de la cintura:** Se determina en espiración midiendo el punto medio entre el reborde costal y la cresta ilíaca, tal y como se muestra en la Figura 3.2.7.7.2, y se expresa en centímetros (cm). Se sitúa la cinta sobre la zona al nivel requerido, sin comprimir los tejidos blandos, y perpendicular al eje longitudinal del segmento que se esté midiendo.



**Figura 3.2.7.1.2. Medida de la circunferencia de cintura**

### **3.2.7.2. Índices Antropométricos**

- **Índice de Masa Corporal (IMC):** Es un indicador simple de la relación entre el peso en kilogramos y la talla al cuadrado (en metros), que se utiliza para identificar el sobrepeso y la obesidad. El IMC explica las diferencias en la composición corporal al definir el nivel de adiposidad de acuerdo con la relación de peso y talla (Stensland et al, 1990). La fórmula usada para la deducción del IMC es la siguiente:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Talla}^2 \text{ (m)}}$$

- **Índice Cintura/Talla (ICT):** Es la relación entre el perímetro de la cintura y la talla de individuo expresados en cm:

$$\text{ICT} = \frac{\text{Perímetro cintura (cm)}}{\text{Talla (cm)}}$$

Basándose en las ecuaciones de la circunferencia de cintura, del IMC o de los pliegues tricipital y subescapular, los investigadores han establecido los puntos de corte de ICT que determinan cada categoría nutricional en edad pediátrica (Marrodán et al, 2013):

*Varones:*

∴ Sobrepeso: ICT > 0,48

∴ Obesidad: ICT > 0,51

*Mujeres:*

∴ Sobrepeso: ICT > 0,47

∴ Obesidad: ICT > 0,50

- **Composición grasa o porcentaje de grasa corporal (%G):** Una de las ventajas del ICT es que se correlaciona positivamente con el nivel de adiposidad estimado a partir de antropometría (pliegues adiposos subcutáneos) (Marrodán et al, 2011 y 2013) por lo que se han podido extraer ecuaciones mucho más sencillas que permiten igualmente estimar el porcentaje de grasa corporal (%G) de los niños. Para estimar el porcentaje graso se emplearon las fórmulas propuestas por Marrodán et al. (2011, 2013), a partir del ICT:

- *Varones:* %G= 106,50 x ICT- 28,36

- *Mujeres:* %G = 89,73 x ICT -15,40

### 3.3. Métodos cromatográficos

#### 3.3.1. Material

- **Equipo de filtración para HPLC:** Los solventes utilizados en HPLC, fueron previamente puestos a punto mediante tratamiento con un equipo de filtración aplicado sobre un matraz kitasato con capacidad de 1000 ml, y un equipo de filtración con Millipore marca SEV conectado a una bomba de vacío tipo gast, modelo DOA-P704-AA con una potencia de 115 Volt, 4,2 Amp y 60 Hz.
- **Microjeringas:** Las microjeringas utilizadas para HPLC corresponden al modelo SGE Syringe 100R-GT-LC SS, con un volumen de 25  $\mu$ l de capacidad. El modelo utilizado para CG/MS es Scharlab con un volumen de 2  $\mu$ l de capacidad.
- **Centrífuga:** Centrífugas marca Hermle modelo Z 200-A y marca Hamilton Bell modelo Vanguard V 6-500.
- **Balanza de precisión:** Se ha empleado una balanza de precisión AND GR-120 con capacidad máxima de 120 mg, mínima de 10mg, e=1mg y d= 0,1mg.
- **Cámara frigorífica y congeladores:** Para el almacenamiento de reactivos, así como para la realización de experimentos a baja temperatura, se ha utilizado una cámara frigorífica (Pedro y López, S.A.) con temperatura regulada a 4°C, además de frigoríficos y congeladores convencionales. Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un congelador marca TOR-REY, tipo arcón, con temperatura fijada a -20°C.
- **Pipetas automáticas:** Para la medición de los reactivos se han utilizado pipetas graduadas marca Kimax de 10, 5 y 1 ml, con pipeteador de succión y expulsión automática del fluido. También, se emplearon pipetas volumétricas de vidrio de 1 ml (Kimax), para la preparación de las muestras patrón.

#### 3.3.2. Reactivos

- **Compuestos químicos patrones:** Todos los compuestos químicos patrones que se han utilizado fueron distribuidos por Sigma-Aldrich: Bisfenol A (BFA) (CAS n°: 3253-39-2).
- **Reactivos para cromatografía:** Se han utilizado acetonitrilo y metanol específicos para HPLC (Sigma-Aldrich). También se utilizó agua desionizada, bidestilada y filtrada en los ensayos que así lo requirieron.

### 3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó en los laboratorios del Dpto. de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada (UGR) y se empleó un equipo Varian ProStar® 230 con Detector de Fluorescencia Varian ProStar®, modelo 363 ( $\lambda_{exc}=275$ ,  $\lambda_{em}=300$ ) y Columna Spherisorb® (5 $\mu$ m ODS-2, 4,6x200 mm - Ireland).

Se ha trabajado con U/V y fluorescencia bajo las condiciones de trabajo que se especifican:

- Columna: C-18
- Flujo: 1 ml/min.
- Detector UV:  $\lambda$  280 nm y 270 nm.
- Detector de fluorescencia:  $\lambda$  excitación 275 nm;  $\lambda$  emisión 300 nm
- Solventes:
  - Fase A: Acetonitrilo/Agua 1/1 (v/v)
  - Fase B: Acetonitrilo
- Gas desgasificador: Helio
- Temperatura: Ambiente (25°C)
- Volumen de inyección: 20  $\mu$ l

### 3.3.4. Análisis cualitativo de Bisfenol A

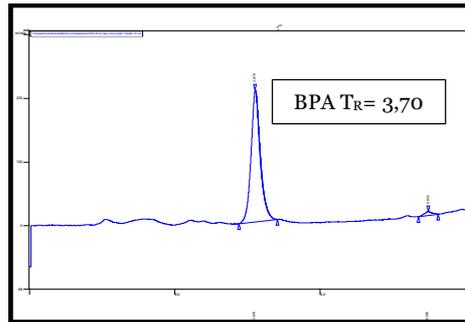
Bajo las condiciones de trabajo anteriormente descritas se han analizado disoluciones en metanol a partir de concentraciones desde 100 $\mu$ g/mL a 10 ng/mL de Bisfenol A. Se emplearon disoluciones patrón de BPA desde 10<sup>-4</sup>M a 10<sup>-8</sup>M en metanol. Los tiempos de retención medios relativos de dichos productos quedan recogidos en la Tabla 3.3.4.1 y en la Figura 3.3.4.2.

**TABLA 3.3.4.1. TIEMPO DE RETENCIÓN RELATIVOS EN HPLC, U/V Y FLUORESCENCIA**

Producto	T <sub>R</sub> * $\pm$ DE
BPA**	3,70 $\pm$ 0,01

\*Valor medio de 10 cromatogramas obtenidos en disolución patrón en metanol

\*\*BPA analizado con detector de fluorescencia



**Figura 3.3.4.2. Cromatograma y tiempo de retención ( $T_R$ ) del BPA**

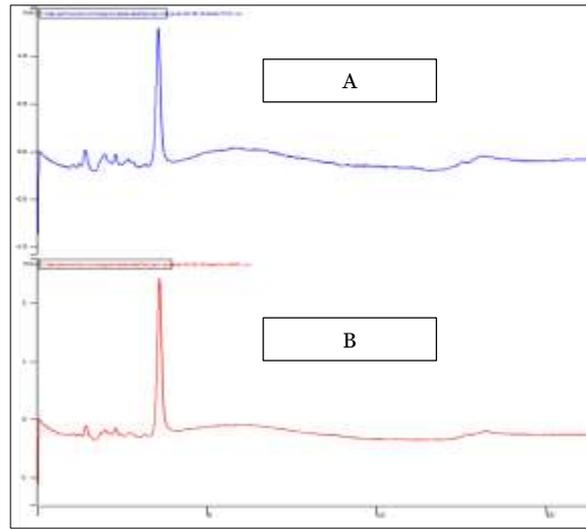
### **3.4. Validación de métodos analíticos**

Se han desarrollado los ensayos de validación característicos que demuestran que el método es válido para el objetivo propuesto. Estos ensayos son: selectividad/especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión, recuperación, límite de detección y cuantificación y robustez.

#### **3.4.1. Selectividad**

La capacidad del método analítico para medir inequívocamente Bisfenol A en las muestras se ha demostrado comprobando que el pico obtenido en el análisis de las soluciones con presencia del analito y las soluciones patrón a las que se les ha añadido una concentración conocida del analito, coincide en el tiempo de retención y no presenta en ningún caso aparición de hombros, colas o interferencias.

La Figura 3.4.1.1 muestra un cromatograma en HPLC de una solución analizada (A) y de una solución patrón (B).



**Figura 3.4.1.1. Cromatogramas de una solución analizada (A) y de una solución patrón (B)**

### 3.4.2. Límites de detección y cuantificación

MacDougall et al (1980), propusieron una serie de normas para la adquisición y evaluación de datos analíticos y definieron dos conceptos analíticos diferenciados: límite de detección y límite de cuantificación (MacDougall et al, 1980; Long et al, 1983).

- **Límite de detección:** se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad), que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de un elemento que un analista puede determinar, estableciendo diferencias estadísticas respecto al ensayo en blanco, realizado en las mismas condiciones (Long et al, 1983). Para establecer el límite de detección, normalmente hay que realizar unas medidas en blanco. La media del valor de la respuesta del blanco,  $X_B$ , se puede calcular y la desviación estándar. Consideran que un valor de  $n_B$  igual a 0 es adecuado para establecer la desviación estándar.

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

Por otra parte, para definir el límite de detección en concentraciones ( $C_L$ ), la IUPAC establece:  $X_L = X_B + K S_B$ . Si  $K=3$ , el nivel de confianza establecido estadísticamente es del orden de 99,86%, que será el empleado para el cálculo de los límites de detección en este trabajo.

- **Límite de cuantificación:** el criterio que se debe seguir para establecer el límite de cuantificación nos lleva a situar la región de cuantificación claramente por encima del

límite de detección. Siguiendo las definiciones, el límite de cuantificación, está localizado por encima de la media del blanco de acuerdo con la expresión:  $St - Sb Kq$ . Se recomienda que  $Kq$  sea igual a 10. Donde  $St$  será:  $St (Sb + 10)$ .

La aplicación de estos criterios al análisis de la solución de BPA en el HPLC-Detector de fluorescencia, han permitido establecer el límite de detección y cuantificación en las condiciones de trabajo ya definidas y de acuerdo con la realización de diez medidas concordantes. Las áreas que se han tomado para definir los límites de detección de los monómeros corresponden al valor 3DE (Tabla 3.4.2.1).

**TABLA 3.4.2.1. REGIONES DE LAS MEDIDAS DEL ANALITO**

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

Siguiendo el criterio antes enunciado, para establecer el límite de cuantificación se considera que el área mínima debe corresponder a 10 veces la desviación estándar (DE) del blanco después de realizar 10 medidas concordantes.

La Tabla 3.4.2.2 corresponde a los límites de detección y cuantificación deduciéndose a partir del área la concentración correspondiente:

$$X_B + 3DE = X_L$$

$$X_B + 10DE = X_L$$

**TABLA 3.4.2.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

<b>Producto</b>	<b>Límite detección</b>	<b>Límite cuantificación</b>
BPA (ng/mL)	1,00	2,30

### **3.5. Confirmación del análisis de BPA en muestras: Análisis UHPLC-MS/MS**

Los Servicios centrales de Investigación de la UGR llevaron a cabo el análisis UHPLC-MS/MS utilizando un sistema ACQUITY UPLCTMH Class® (Waters, Manchester, Reino Unido). La separación de los compuestos se realizó en la columna ACQUITY UPLC® BEH C18 (1,7 µm; 2,1 × 50 mm) (Waters, Manchester, Reino Unido).

Se usó un espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem XevoTQ-xS® (Waters) equipado con una guía de iones StepWave y una fuente ortogonal Z-spray UniSpray para los análisis de masas. Se utilizaron para el tratamiento estadístico de los datos los softwares Statgraphics, Minitab y Excel. El software MassLynx 4.1 se utilizó para el control de instrumentos UHPLC-MS/MS, detección de picos e integración.

#### **3.5.1. Metodología**

La separación cromatográfica se realizó utilizando una fase móvil de gradiente binario que consiste en amoníaco al 0,1% (disolvente A) y MeOH (disolvente B). La velocidad de flujo fue de 350 µL min<sup>-1</sup> y la columna se mantuvo a 40°C. El volumen de inyección fue de 10 µl. El programa de gradiente fue el siguiente: inicial, 30% de B, 0-5,0 min; 10-90% de B, 5,1-7,0 min; 100% de B, 7,05 min. El espectrómetro de masas (MS) se hizo funcionar con ionización por electropulverización (ESI) en modo de iones negativos. Los parámetros de funcionamiento del instrumento fueron los siguientes: temperatura de la fuente 150°C; temperatura de solvatación 650°C; flujo de gas cónico 150 L h<sup>-1</sup>; flujo de gas de solvatación 500 L h<sup>-1</sup>; flujo de gas de colisión 0,15 ml min<sup>-1</sup>, y flujo de gas nebulizador 7,0 bar. Transición BPA para cuantificación Cono (V): 227,20 > 211,96. Transición BPA para confirmación Cono (V): 227,21 > 92,40.

### 3.5.1.1. Condiciones de transición para BPA

Scans in function: 476

Cycle time (secs): Automatic

Inter Scan Delay (secs): Automatic

Inter Channel Delay (secs): Automatic

Span (Da): 0,500

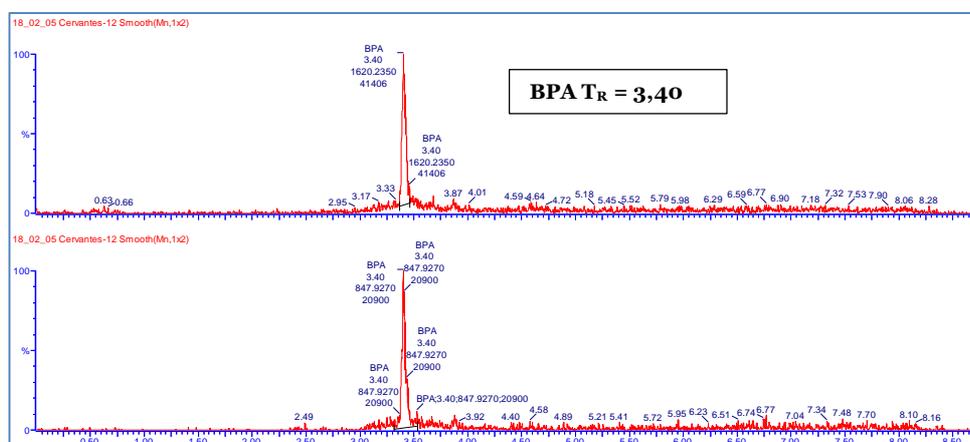
Start and End Time (mins): 1,500 to 3,500

Ionization mode: TS-

Data type: Enhanced SIR or MRM

Function type: MRM of 4 channels

Channel reaction	Dwell(secs)	Col.Energy	Delay(secs)	Compound	Formula Mass
1: 227,20 > 132,89	0,025	26,0	Auto	Bisphenol A	A 228,1
2: 227,20 > 211,96	0,025	22,0	Auto	Bisphenol A	A 228,1
3: 227,21 > 92,40	0,025	28,0	Auto	Bisphenol A	A C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
4: 227,21 > 211,85	0,025	18,0	Auto	Bisphenol A	A C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>



**Figura 3.5.1.1.1. Cromatogramas de BPA por UHPLC-MS/MS**

### **3.5.1.2. Linealidad y curvas de calibrado**

La mayor parte de las medidas tomadas a partir de métodos analíticos, no corresponden propiamente al parámetro que interesa, sino que este es obtenido por la transformación matemática del dato medido. De hecho en cromatografía se obtiene como medida el área del pico, que debe de ser convertida en la concentración del analito u otra medida derivada de esta (p.e. el porcentaje).

La linealidad es el procedimiento que describe la relación existente entre ambas variables, esto es describe la capacidad del método para obtener resultados analíticos proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

La medida cromatográfica área de pico es, generalmente directamente proporcional a la variable de concentración del analito, por lo que la relación entre ambas variables puede expresarse matemáticamente como una recta de regresión del tipo:

$$y = ax + b$$

Donde: **y** es la variable dependiente y representa a la respuesta (área del pico)

**x** es la variable independiente o concentración de analito

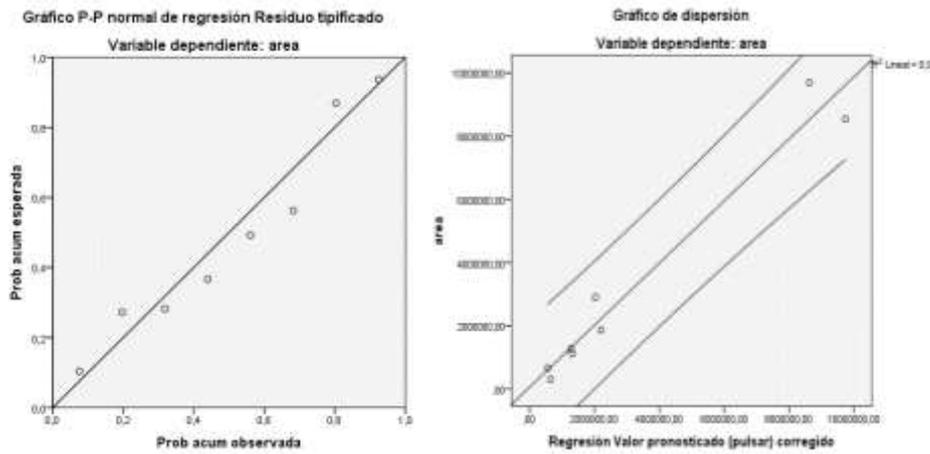
**b** la pendiente

**a** la ordenada en el origen

Esta ecuación se obtiene por un método de ajuste (habitualmente por mínimos cuadrados). El estudio de linealidad consiste en la construcción de esta recta de regresión, denominada más habitualmente recta de calibrado, a partir del análisis de un mínimo de cinco concentraciones crecientes de analito (Thompson et al, 2002), dentro del rango de interés y analizadas preferentemente por triplicado. El rango no debe exceder los diez órdenes de magnitud entre el nivel inferior y el superior.

El análisis de la varianza en un estudio de regresión, permite comprobar la hipótesis de que las diferencias observadas entre los distintos niveles de las variables en estudio, no ocurren al azar, sino que son debidas a la dependencia lineal existente entre ellas. Sin embargo, el modelo de análisis de la varianza (ANOVA) supone el cumplimiento de los siguientes supuestos: homogeneidad de varianzas y normalidades de residuales.

La normalidad de los residuales puede ser comprobada mediante representaciones graficas de normalidad (Gráfico 3.5.1.2.1.).



**Gráfico 3.5.1.2.1. Gráficos P-P de residuo normal tipificado y de dispersión**

Los resultados obtenidos para los patrones de los productos estudiados se recogen a continuación:

***CURVA DE CALIBRADO DEL BPA***

Modelo	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> corregida	Error típ. de la estimación
1	0,993 <sup>a</sup>	0,985	0,983	63,03

Variable dependiente: concentración µg/mL de BPA  
Variable predictora: constante, área

***ANOVA***

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p*
Regresión	1574152,838	1	1574152,838	396,257	0,001
Residual	23835,322	6	3972,554		

\*ANOVA; nivel de significación p<0,05

***COEFICIENTES***

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	p*
	B	Error típ.	Beta		
Constante	409893,4	225000,916		1,822	0,118
Concentración µg/mL	7666,9	385,152	0,993	19,906	0,001

\*Nivel de significación p<0,05

## **3.6. Método biológico: análisis de la actividad estrogénica de fitoestrógenos y BPA mediante E-Screen**

### **3.6.1. Experimentos de proliferación celular: Test E-Screen**

El test de proliferación E-Screen se basa en el empleo de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Las células MCF-7 expresan de forma endógena el receptor de los estrógenos alfa (ER), responden al tratamiento con estradiol incrementando su ritmo proliferativo, sintetizando nuevas proteínas y procediendo a la transcripción de ciertos genes específicos.

Estas células son consideradas estrógeno-dependientes, con lo cual no proliferan cuando se exponen a un medio de cultivo suplementado con suero al que se le han eliminado los estrógenos. Solamente los estrógenos naturales o sintéticos cancelan esta inhibición e inducen proliferación máxima. Aprovechando estas características Soto et al. (1992) desarrollaron un ensayo biológico bajo el nombre de E-Screen (Patente USA 4,859,855). El Test compara el número de células o la proliferación celular obtenida después de seis días de cultivo. Las células crecen en un medio de cultivo suplementado con suero humano desprovisto de estrógenos, en presencia y/o ausencia de estradiol, así como de los compuestos químicos de sospechada actividad estrogénica.

### **3.6.2. Material y método**

- **Compuestos para el ensayo:** Los productos químicos utilizados como estándares para el análisis de la actividad estrogénica de los fitoestrógenos fueron genisteína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), daidzeína, formononetina, biocanina A, coumestrol, matairesinol, secoisoresinol, enterolactona, enterodiol (Fluka, St. Louis, MO, EEUU). El BPA  $\geq 99\%$ ; CAS:80-05-7 fue suministrado por Sigma-Aldrich (Munich, Alemania) hasta un total de 10 compuestos químicos disueltos en etanol ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ). Estos compuestos fueron diluidos con un medio de cultivo y sirvieron para preparar sucesivas concentraciones en un rango de  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  hasta  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ . En todos los ensayos, cada compuesto fue testado por triplicado en dos experimentos independientes.
- **Compuestos químicos de referencia:** Se prepararon soluciones stock de estradiol-17 (10mM) en etanol. Las soluciones fueron mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las sucesivas diluciones tanto del compuesto problema como de estradiol, fueron realizadas en el mismo medio de cultivo. Los medios de cultivo celular y el suero bovino

fetal (FBS) fueron obtenidos de Life Technologies Inc. Estradiol-17, L-glutamina, Hepes, bicarbonato sódico y los antibióticos piromicina y gentamicina fueron comprados a Sigma-Aldrich. Todo el material plástico para el cultivo fue obtenido de Falcon (Merck Eurolab) excepto las placas de 96 pocillos, las cuales fueron obtenidas de Greiner Labortechnik.

- **Línea celular MCF-7: condiciones de cultivo:** Se utilizó la línea celular de cáncer humano MCF-7. Esta línea fue establecida por Soule et al. (1973) a partir de un carcinoma de mama humano. Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuida a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo, que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos (Soto et al, 1995). La línea celular MCF-7 presenta, además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre los cuales se encuentran los andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D<sub>3</sub>, hormonas tiroideas, prolactina, insulina, calcitonina y factores estimuladores del crecimiento celular.

En el presente estudio se utilizó el stock de las células MCF-7 BUS cedidas por el Dr. C. Sonnenschein (Tufts University, Boston, EEUU) y clonadas como C7MCF-7 a partir del pase 173 de la MCF-7 original cedida por el Dr. McGrath de la Michigan Cancer Foundation.

Como medio nutriente de la línea celular estudiada en este trabajo hemos utilizado los siguientes medios sintéticos:

- *Medio de mantenimiento:* El mantenimiento en cultivo de las células MCF-7 se efectuó en medio mínimo esencial DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con el 10% de suero bovino fetal (FBS) más rojo fenol (+RF), L-glutamina y bicarbonato sódico.
- *Medio experimental:* Debido a la actividad estrogénica del rojo fenol, así como del FBS, los experimentos son realizados en medio denominado experimental. Esto es, medio de cultivo sin fenol, quedando en este caso indicado en el texto como DMEM (-RF). En este caso la regulación del pH del medio se efectuó utilizando como tampón bicarbonato sódico y Hepes a concentraciones finales de 4,4μL y 20mM, respectivamente. El medio experimental se suplementa con 10% de suero humano desprovisto de estrógenos (10% CDFBS).

### **3.6.3. Bioensayo de estrogenicidad**

El test E-Screen se realiza siguiendo la metodología previamente descrita por Soto et al. (1992) modificada por Villalobos et al. (1995). Las células MCF-7 en confluencia son tripsinizadas y alícuotas de esta suspensión se siembran en placas de 96 pocillos a concentraciones iniciales de 4000-5000 células/pocillo en medio de mantenimiento DMEM (+RF) suplementado con el 10% de FBS. Una vez que las células están adheridas al soporte plástico de la placa (generalmente 24-48 horas) se retira el medio de mantenimiento y se añade medio experimental DMEM (-RF) suplementado con el 10% CDFBS. El estradiol-17 y los compuestos a testar se añaden al medio de cultivo en las concentraciones/diluciones requeridas. El ensayo finaliza a las 144 horas de subcultivo (fase exponencial) tras la aspiración del medio y la fijación de las células para la aplicación de la técnica de la sulforrodamina-B.

El crecimiento celular para cada grupo experimental se refiere al crecimiento obtenido para el control negativo (ausencia de hormona) y con respecto al estradiol (control positivo).

### **3.6.4. Análisis de los resultados: Parámetros de actividad biológica**

Una vez realizado el ensayo E-Screen se procede a establecer la tasa máxima de proliferación celular inducida por el compuesto, también llamada *efecto proliferativo* (EP), calculada como la relación existente entre la máxima tasa de proliferación obtenida para el compuesto y la tasa de proliferación alcanzada por el control negativo. Los datos de proliferación correspondientes a las sucesivas diluciones del compuesto se transforman tras la aplicación del factor de corrección para la dilución de cada punto experimental, procediendo al cálculo de la media aritmética de los datos obtenidos.

Otro parámetro proliferativo es la *eficacia proliferativa relativa* (EPR) que se obtiene al dividir la tasa máxima de proliferación celular obtenida para el compuesto problema entre la tasa máxima de proliferación celular alcanzada por el estradiol-17 (se sitúa en torno a  $6,2 \pm 0,3$  sobre el control). El valor resultante se expresa en tanto por ciento, estimando el 100% para el estradiol-17.

Por último, se estima la *potencia proliferativa relativa* (PPR), calculada como la relación existente entre la concentración a la cual el producto testado presenta su máxima capacidad proliferativa y aquella a la que el estradiol-17 presenta su máximo efecto proliferativo. El valor resultante se expresa en tanto por ciento, estimando el 100% para el

estradiol-17. Cuando el efecto proliferativo relativo de un compuesto, o mezcla de ellos, es en torno a 100 se le considera como antagonista completo. Si el valor está alrededor de 1 se considera que el compuesto carece de actividad estrogénica. Para valores intermedios se habla de agonistas parciales.

Los resultados obtenidos tras la realización del bioensayo E-Screen expresados como efecto proliferativo indican claramente que el 66,66% de los compuestos ensayados inducen una proliferación celular significativa con respecto al control negativo (medio de cultivo libre de hormona), principalmente en el rango de concentraciones  $1 \times 10^{-6}$  M hasta  $1 \times 10^{-5}$  M. Por lo general, se considera que un compuesto tiene actividad estrogénica cuando su efecto proliferativo es igual a 2 o superior al del control negativo.

La Tabla 3.6.4.1 muestra el crecimiento celular relativo obtenido en el bioensayo E-Screen para los compuestos indicados. Las células MCF-7 fueron tratadas con dichos compuestos a las indicadas concentraciones. Los resultados son expresados como la tasa máxima de proliferación celular inducida por la muestra (efecto proliferativo) calculada como la relación existente entre la máxima tasa de proliferación obtenida para la muestra y la tasa de proliferación alcanzada por el control negativo.

**TABLA 3.6.4.1. ESTROGENICIDAD POTENCIAL DE FITOESTRÓGENOS Y BPA INGERIDOS POR LA POBLACIÓN**

Producto	Concentración máxima con efecto proliferativo	Efecto proliferativo (EP)
Control positivo E2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)	$1 \times 10^{-10}$ M	$6,61^* \pm 0,30$
Control negativo (medio de cultivo)	—	$1,00 \pm 0,14$
Daidzeína	$1 \times 10^{-5}$ M	$5,60^* \pm 1,14$
Genisteína	$1 \times 10^{-5}$ M	$6,37^* \pm 0,12$
Formononetina	$1 \times 10^{-5}$ M	$6,53^* \pm 1,25$
Biocanina A	$1 \times 10^{-5}$ M	$7,11^* \pm 1,32$
Cumestrol	$1 \times 10^{-5}$ M	$3,09^* \pm 0,18$
Matairesinol	$1 \times 10^{-5}$ M	$1,59^* \pm 0,14$
Enterolactona	$1 \times 10^{-5}$ M	$1,16 \pm 0,05$
Enterodiol	$1 \times 10^{-5}$ M	$1,62 \pm 0,04$
BPA	$1 \times 10^{-5}$ M	$6,20^* \pm 0,33$

\*Diferencia significativa versus control negativo, estimando un crecimiento = 1;  $p < 0,05$

### 3.7. Cuestionario adherencia a la Dieta Mediterránea (KIDMED)

El cuestionario KIDMED está inspirado en índices de calidad de la dieta anteriores, desarrollados para poblaciones adultas (Alberti et al, 2004) o ancianas (Trichopoulou et al, 1995). Se trata del primer índice que evaluó la adherencia al patrón alimentario mediterráneo en la población de 2 a 24 años y se desarrolló sobre los principios en los que se basa el modelo alimentario mediterráneo (Serra-Majem et al, 2003 y 2004).

Su puntuación oscila entre 0 y 12, y se basa en un test de 16 preguntas de forma que aquellas preguntas que incluyen una connotación negativa en relación con la dieta mediterránea valen -1 punto y las que conllevan un aspecto positivo +1 punto (Figura 3.7.1). De esta forma la puntuación obtenida establece tres rangos de adherencia de la Dieta Mediterránea:  $\leq 3$  baja calidad dieta; 4-7 necesita mejorar el patrón alimentario para ajustarlo a la DM;  $\geq 8$  DM óptima.

ÍTEM	KIDMED	Puntuación
1	Desayuna	1
2	Desayuna bollería industrial o galletas	-1
3	Desayuna un lácteo (yogurt, leche...)	1
4	Desayuna un cereal o derivado (pan...)	1
5	Toma 2 yogures y/o 40 g queso a diario	1
6	Toma una fruta o un zumo natural a diario	1
7	Toma una 2ª pieza de fruta a diario	1
8	Toma verduras frescas o cocinadas 1 vez/día	1
9	Toma verduras frescas o cocinadas >1 vez/día	1
10	Toma pescado por lo menos 2-3 veces/semana	1
11	Le gustan las legumbres y las toma >1 vez/semana	1
12	Toma pasta o arroz casi a diario ( $\geq 5$ días/semana)	1
13	Toma frutos secos al menos 2-3 veces/semana	1
14	Utiliza aceite de oliva	1
15	Toma golosinas y/o dulces varias veces al día	-1
16	Acude una vez o más a la semana a un restaurante de comida rápida	-1

**Figura 3.7.1. Cuestionario KIDMED de adherencia a la Dieta Mediterránea (Modificado de: Serra-Majem et al. 2004)**

### **3.8. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se codificaron en bases de datos y se ha utilizado para su análisis y obtención de los resultados de esta Tesis Doctoral el programa SPSS Statistics v24.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Mediante este programa se ha realizado el análisis estadístico de las distintas variables codificadas en la base de datos para la obtención de las conclusiones del estudio realizado.

#### **3.8.1. Análisis previo: exploración de bases de datos y test de normalidad**

Antes de profundizar en el análisis estadístico de los datos, se han aplicado dos métodos que permiten depurar las variables de valores extraños e identificar si siguen o no una distribución normal.

Los gráficos de caja ofrecen información útil de cada variable para detectar *outliers* o puntos periféricos (Martínez-González et al, 2020), que se deben a errores en la recogida o anotación de los datos y deben ser corregidos/eliminados para evitar que puedan distorsionar los resultados. Los *outliers* son valores que quedan fuera del rango definido como:

- *Valor inferior*: prolongación de la caja que termina en el valor absoluto que sea igual o superior al primer cuartil + 1,5 veces el rango intercuartílico.
- *Valor superior*: prolongación de la caja que termina en el valor absoluto que sea igual o inferior al tercer cuartil + 1,5 veces el rango intercuartílico.

Para comprobar la normalidad de las variables se ha empleado el Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para variables cuantitativas, y el Test de Chi<sup>2</sup> para variables cualitativas. Cuando estos test de normalidad resultan significativos ( $p < 0,05$ ) se rechaza la hipótesis de normalidad.

### 3.8.2. Estadística descriptiva

Las decisiones sobre el tipo de análisis estadístico más adecuado dependen, en primer lugar, de la naturaleza de los datos recogidos. En el presente estudio contamos con dos tipos de variables:

- *Cualitativas*: nominales y ordinales.
- *Cuantitativas*: discretas y continuas.

Para la descripción de variables cualitativas se han empleado las frecuencias, proporciones o porcentajes. Para la descripción de variables cuantitativas se han utilizado medias, desviaciones estándar (DE), mínimos y máximos, medianas (Martínez-González et al, 2020).

- **Test-T de Student** (variables cuantitativas): test de comparación de medias entre dos variables cuantitativas (para muestras relacionadas) o variables cuantitativas agrupadas en dos categorías (para muestras independientes). Se ha utilizado para comparar valores medios de variables cuantitativas agrupados por variables dicotómicas como el sexo. Para el caso de variables cuantitativas que no tuvieron distribución normal, se empleó la opción no paramétrica (test de Mann-Whitney o Wilcoxon).
- **Test Chi<sup>2</sup> ( $\chi^2$ )** (variables cualitativas): test de comparación de la proporción de sucesos o de cualquier dato categórico. Se ha utilizado para la comparación de la distribución porcentual de variables categóricas.
- **Análisis de la varianza (ANOVA)**: test de comparación de medias de tres o más grupos independientes, es decir, para la comparación de valores medios de variables cuantitativas agrupadas en más de dos categorías.

### 3.8.3. Medidas de concordancia

Estudian la tendencia de una variable en otra, es decir, estudian cómo varía una variable cuando varía la otra.

- **Test de concordancia de Bland y Altman**: propone establecer el grado de concordancia entre FFQ vs R24h medidos en escala cuantitativa, construyendo los límites de tolerancia. Estos límites estadísticos se calculan a través de la media y la desviación estándar de la diferencia de ambas mediciones. La mayoría de las diferencias, de seguir una distribución normal, deberían situarse aproximadamente

entre la media y dos desviaciones estándar ( $\pm 2DE$ ) de la variable diferencia. La representación gráfica de las variables permite investigar cualquier posible relación entre el error de medida y el valor real, evaluar la magnitud del desacuerdo entre mediciones o identificar valores periféricos (Bland et al, 1986 y 1996).

- **Coefficiente de correlación intraclase:** permite establecer el acuerdo entre dos o más evaluaciones llevadas a cabo sobre el mismo número de personas y valorar su consistencia. El valor de este coeficiente va de 0 a 1 y cuanto más cercano a 1 sea, mayor acuerdo existe entre las pruebas comparadas (Martínez-González et al, 2009).
- **Coefficiente Kappa (K):** ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia inter-observador observada para elementos cualitativos (variables categóricas). El coeficiente kappa puede tomar valores entre -1 y +1. Mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador, por el contrario, mientras más cercano a -1, mayor es el grado de discordancia inter-observador. Un valor  $K = 0$  refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar (López de Ullibarri et al, 1999).

#### **3.8.4. Análisis multivariante**

Es el método utilizado para determinar la contribución de varios factores en un simple evento o resultado. Los factores de estudio son los llamados factores de riesgo (bioestadística), variables independientes o variables explicativas. El resultado estudiado es el evento, la variable dependiente o la variable respuesta.

- **Regresión logística:** es un análisis de regresión multivariable (de tres o más variables) que trata de explicar un fenómeno teniendo en consideración varias variables independientes simultáneamente (dos o más), respecto a una variable dependiente dicotómica (Martínez-González et al, 2020).
- **Regresión por pasos:** es un método de selección de variables por pasos, que nos permite elegir aquellas variables que mejor cumplen un criterio prefijado basado en la significación estadística de inclusión (para añadirla al modelo) o el criterio de exclusión (para eliminarla). Este método se ha utilizado como primer paso de cribado para seleccionar aquellos alimentos que mejor representan la ingesta de un determinado nutriente (Martínez-González et al, 2020).

En todos los casos se aceptan valores de  $p < 0,05$  como nivel de significación estadística.



# **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análisis descriptivo

Usando la metodología descrita en el Apartado 3.8. *Análisis estadístico*, se han obtenido los siguientes resultados:

#### 4.1.1. Características de la población de estudio

El número total de sujetos participantes ha sido de 657. Las Tablas 4.1.1.1A y B recogen las características generales.

**TABLA 4.1.1.1A. CARACTERÍSTICAS SOCIOFAMILIARES Y SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN. Test Chi<sup>2</sup>.**

		%	Chi <sup>2</sup> *	p
<b>Sexo</b>	Femenino	53,5	3,13	0,77
	Masculino	46,5		
<b>Vive con</b>	Ambos padres	91,9	103,36	<0,001
	Otros (madre/padre/abuelo/a)	8,1		
<b>Nº hermanos</b>	0	15,6	1268,58	<0,001
	1	54,9		
	2	20,5		
	≥3	9,1		
<b>Nivel ocupacional de los padres <sup>a</sup></b>	Bajo/Medio	44,40	36,258	<0,001
	Alto	55,61		

<sup>a</sup>Nivel ocupacional según la Clasificación Internacional de Ocupaciones 2011 (CNO-11)

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

**TABLA 4.1.2.1B. CARACTERÍSTICAS SOCIOFAMILIARES Y SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN. Test-T.**

	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	p*	t
<b>Edad</b>	7	10	9	9,03	0,97	<0,001	
			<i>Femenino</i>	9,11	0,95	0,521	-0,643
		<i>Masculino</i>	9,06	0,93			
<b>Nº hermanos</b>	0	7	1	1,29	1,00	<0,001	

\*Test-T; nivel de significación p<0,05

Existen diferencias significativas en todas las variables estudiadas, salvo en el sexo. Se constata que la mayoría (91,9%) viven con sus padres, tienen un único hermano (54,9%) y el nivel ocupacional de los padres que predomina es el alto (55,61%).

## 4.1.2. Antropometría

Como ya se mencionó en Material y Métodos, los parámetros antropométricos que se analizaron fueron los descritos en la Tablas 4.1.2.1 y 4.1.2.2, y que, para estimar el porcentaje graso, se emplearon las fórmulas propuestas por Marrodán y col. (2011, 2013), a partir del ICT:

- *Varones:* %G= 106,50 x ICT -28,36
- *Mujeres:* %G = 89,73 x ICT -15,40

Con el ICT se han establecido puntos de corte, con mayor precisión que el IMC, que determinan cada categoría nutricional en la edad pediátrica. Para los varones el corte del sobrepeso está en > 0,48 y para las mujeres en > 0,47.

**TABLA 4.1.2.1. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS**

	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE
<b>Peso (kg)</b>	17,85	72,30	33,43	35,12	8,91
<b>Talla (m)</b>	1,12	1,69	1,36	1,36	0,08
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	11,24	31,88	18,34	18,74	3,18
<b>Circunferencia de cintura (cm)</b>	32,10	104,00	62,00	63,59	8,53
<b>ICT (índice cintura/talla)</b>	0,22	0,73	0,46	0,47	0,05
<b>Composición grasa (%G)**</b>	4,56	49,86	23,99	24,21	5,53

\*\*Ecuación para el cálculo de la grasa corporal (Marrodán, 2013)

**TABLA 4.1.2.3. PRUEBAS DE NORMALIDAD DE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<b>Peso (kg)</b>	0,085	648	0,000	0,939	648	0,000
<b>Talla (m)</b>	0,048	648	0,001	0,995	648	0,023
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0,077	648	0,000	0,951	648	0,000
<b>Circunferencia de cintura (cm)</b>	0,100	648	0,000	0,957	648	0,000
<b>ICT (índice cintura/talla)</b>	0,057	648	0,000	0,959	648	0,000
<b>Composición grasa (%G)**</b>	0,349	648	0,000	0,636	648	0,000

<sup>a</sup>Corrección de la significación de Lilliefors

\*\*Ecuación para el cálculo de la grasa corporal (Marrodán, 2013)

No existen diferencias significativas en los parámetros estudiados en los escolares (Tabla 4.1.2.3), salvo en el %G, que es significativamente mayor en las niñas que en los niños.

**TABLA 4.1.2.4. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS CLASIFICADOS POR SEXO**

	Sexo	Mediana	Media	DE	p*
<b>Peso (Kg)</b>	Masculino	32,85	34,59	8,74	0,226
	Femenino	34,00	35,45	9,07	
<b>Talla (m)</b>	Masculino	1,36	1,36	0,08	0,401
	Femenino	1,36	1,36	0,08	
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	Masculino	18,22	18,65	3,10	0,478
	Femenino	18,35	18,83	3,24	
<b>Circunferencia de cintura (cm)</b>	Masculino	62,15	63,97	8,11	0,422
	Femenino	62,00	63,49	8,29	
<b>ICT (índice cintura/talla)</b>	Masculino	0,47	0,47	0,05	0,161
	Femenino	0,46	0,46	0,06	
<b>Composición grasa (%G)**</b>	Masculino	21,41	21,60	5,18	<0,001
	Femenino	25,66	26,34	4,82	

\*Test-T; nivel de significación p&lt;0,05

\*\*Ecuación para el cálculo de la grasa corporal (Marrodán, 2013)

En cuanto al IMC se han usado como referencia las clasificaciones basadas en Normopeso/Sobrepeso/Obesidad propuestas por Cole et al. (2000, 2012) para estas edades. Por sexo o edad, ni el IMC ni el ICT presentan diferencias significativas (Tablas 4.1.2.4 y 4.1.2.5).

**TABLA 4.1.2.5. CLASIFICACIÓN DEL IMC POR EDAD Y SEXO SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DEL IMC DE COLE et al.**

		Normopeso (%)	Sobrepeso (%)	Obesidad (%)	Chi <sup>2</sup> *	p
<b>Sexo</b>	Femenino	53,3	50,6	61,4	2,371	0,306
	Masculino	46,7	49,4	38,6		
<b>Edad</b>	7	9,3	8,6	8,5	3,787	0,956
	8	18,7	16,0	19,7		
	9	34,4	37,1	28,2		
	10	37,1	38,3	43,7		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05**TABLA 4.1.2.6. CLASIFICACIÓN DEL ICT POR EDAD Y SEXO SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DEL IMC DE COLE et al.**

		Normopeso (%)	Sobrepeso (%)	Obesidad (%)	Chi <sup>2</sup> *	p
<b>Sexo</b>	Femenino	72,0	9,5	18,5	0,621	0,733
	Masculino	71,4	11,3	17,3		
<b>Edad</b>	7	78,0	13,6	8,5	9,254	0,508
	8	75,4	7,6	16,9		
	9	73,3	9,3	17,3		
	10	66,7	12,0	21,3		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

### 4.1.3. Hábitos de vida y relación con el gasto energético

Para estimar las tasas de gasto energético en niños con base en valores de adultos, Torun recomienda valores MET prescritos (para niños de 1 a 15 años) o la multiplicación de los valores MET de adultos por un factor de corrección de edad de acuerdo con la actividad realizada.

En este estudio se consideraron los factores relacionados con la actividad/sedentarismo y el aporte energético diario, investigando la relación entre el gasto energético total/día y la ingesta energética total. Nuestro objetivo fue estimar el gasto energético durante un día estándar (24 horas), incluyendo períodos de actividad más intensa y períodos muy sedentarios (Tabla 4.1.3.1).

**TABLA 4.1.3.1. ESTIMACIÓN DE KCAL A PARTIR DE MET Y HORAS DEDICADAS A CADA ACTIVIDAD INTERPRETADA COMO GASTO DE ENERGÍA POR UNIDAD DE PESO CORPORAL**

	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Horas durmiendo	8,65	8,00	1,07	7,30	14,00
MET durmiendo (Kcal/peso)	355,1	339,8	93,1	200,16	811,15
Horas andando al colegio	0,25	0,00	0,25	0,00	0,50
MET desplazamiento al colegio (Kcal/peso)	25,67	0,00	27,43	0,00	96,28
Horas de Educación Física/semana	1,94	2,00	0,52	0,00	7,00
MET horas EF Kcal/peso	133,25	130,45	53,2	00,0	485,5
Horas AF extraescolar	0,46	0,43	0,33	0,00	2,14
Cuántas veces a la semana practica AF	3,30	3,00	2,41	0,00	16,00
MET Deportes Total al día (Kcal/peso)	89,79	71,54	66,01	0,00	451,39
Actividad moderada sobre 24 horas	12,69	13,21	1,41	6,21	15,71
MET actividad moderada/día/peso	624,47	601,60	183,92	262,40	1290,10
MET 24h kcal/peso	1978,5	1887,35	495,5	588,16	2673,65

En cuanto a las actividades deportivas más realizadas (Tabla 4.1.3.2), el fútbol fue la actividad más practicada (36,9%) por los escolares. Destaca la ausencia de práctica de alguna actividad deportiva, con un 27,4%.

Existen diferencias significativas en cuanto al sexo en la práctica de actividades como baile, correr, gimnasia rítmica/deportiva, patinaje, fútbol y en la ausencia de práctica de alguna actividad deportiva: las mujeres tienden a no practicar actividades deportivas, aunque en número son las que más practican la mayoría de los deportes.

**TABLA 4.1.3.2. ACTIVIDAD DEPORTIVA REALIZADA, FRECUENCIA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS POR SEXO**

Sexo	Nº escolares (%)	Chi <sup>2</sup> *	p	Porcentaje total (nº)
<b>ATLETISMO</b>				1,2 (8)
Masculino	1(0,3%)	3,769	0,052	
Femenino	7(2%)			
<b>BAILE</b>				1,5 (10)
Masculino	0(0%)	8,836	0,003	
Femenino	10(2,9%)			
<b>CICLISMO</b>				4,9 (32)
Masculino	12(4%)	1,102	0,294	
Femenino	20(5,8%)			
<b>CORRER</b>				8,2 (53)
Masculino	12(4%)	13,233	0,001	
Femenino	41(11,8%)			
<b>GIMNASIA RÍTMICA/DEPORTIVA</b>				5,6 (36)
Masculino	5(1,7%)	16,318	0,001	
Femenino	31(9%)			
<b>MONTAR A CABALLO</b>				0,3 (2)
Masculino	0(0%)	1,745	0,186	
Femenino	2(0,6%)			
<b>ESGRIMA</b>				0,2 (1)
Masculino	1(0,3%)	1,151	0,283	
Femenino	0,00%			
<b>ESQUIAR</b>				0,3 (2)
Masculino	0(0%)	1,745	0,186	
Femenino	2(0,6%)			
<b>KÁRATE</b>				0,9 (6)
Masculino	5(1,7%)	3,299	0,069	
Femenino	1(0,3%)			
<b>PATINAJE</b>				2,0 (13)
Masculino	0(0%)	11,541	0,001	
Femenino	13(3,8%)			
<b>JUDO</b>				1,1 (7)
Masculino	5(1,7%)	1,764	0,184	
Femenino	2(0,6%)			
<b>NATACIÓN</b>				4,3 (28)
Masculino	13(4,3%)	0,001	0,992	
Femenino	15(4,3%)			
<b>TENIS</b>				8,0 (52)
Masculino	21(7%)	0,856	0,355	
Femenino	31(9%)			
<b>BALONCESTO</b>				8,8 (57)
Masculino	31(10,3%)	1,554	0,213	
Femenino	26(7,5%)			
<b>BALONMANO</b>				1,5 (10)
Masculino	5(1,7%)	0,049	0,824	
Femenino	1(1,4%)			
<b>FÚTBOL</b>				36,9 (239)
Masculino	169(56,1%)	89,133	0,001	
Femenino	70(20,2%)			
<b>JUGAR</b>				1,9 (12)
Masculino	3(1%)	2,276	0,131	
Femenino	9(2,6%)			
<b>NO PRACTICA ACTIVIDAD DEPORTIVA</b>				27,4 (177)
Masculino	71 (23,6%)	4,023	0,045	
Femenino	106 (30,6%)			

\*Test de Chi<sup>2</sup>, nivel de significación p<0,05

#### 4.1.4. Cuestionario sobre hábitos bucodentales

Los sujetos participantes respondieron acerca de los hábitos bucodentales saludables o no recogidos en la Tabla 4.1.4.1.

**TABLA 4.1.4.1. CARACTERÍSTICAS RESPECTO A HÁBITOS BUCODENTALES**

		% Total población (n=582)	% Hombres (n=281)	% Mujeres (n=301)	p*
<b>Te cepillas después de las comidas (Sí)</b>		75,7	73,0	77,5	0,048
<b>Te cepillas en el colegio (Sí)</b>		9,4	9,9	9,0	0,394
<b>Enjuagues con flúor (Sí)</b>		36,4	37,6	36,2	0,531
<b>Corrector dental (Sí)</b>		10,5	12,1	8,2	0,102
<b>Ultima vez dentista</b>	< 3 meses	31,8	32,0	31,7	0,066
	3 meses a 1 año	16,3	17,3	15,4	
	> 1 año	11,3	12,7	8,7	
	Nunca	40,6	38,1	44,2	
<b>Motivo</b>	Revisión	43,7	43,6	43,1	0,918
	Limpieza	19,2	19,5	19,1	
	Caries	6,8	7,4	6,5	
	Sellador	7,9	8,3	7,4	
	Dolencia	3,9	4,0	4,0	
	Rotura	18,4	17,2	20,0	
<b>Frecuencia cepillado</b>	3 veces/día	37,4	34,2	40,4	0,202
	2 veces/día	22,4	22,3	22,6	
	1 vez/día	24,5	26,0	23,0	
	A veces (no a diario)	13,7	15,1	12,2	
	Nunca	2,0	2,4	1,8	
<b>¿Dónde te han enseñado a cepillarte?</b>	Casa	59,5	55,5	62,7	0,004
	Colegio	0,9	0,8	0,6	
	Dentista	13,4	11,9	14,9	
	Otros	26,2	31,8	21,9	
<b>Tipo de dentífrico</b>	Ninguno	2,2	3,1	1,0	0,001
	Especial para niños	63,9	59,3	69,1	
	El de casa	33,7	37,6	30,0	
<b>Costumbres</b>	Morderse las uñas	26,7	24,0	28,9	0,024
	Dedo en boca	5,2	4,2	6,1	
	Rechinar los dientes	8,4	10,5	6,5	
	Ninguna	59,6	61,3	58,4	
<b>Frecuencia de cariado</b>	Ninguna pieza cariada	53,1	56,9	52,8	0,765
	1-3 piezas cariadas	22,6	19,7	22,1	
	> 3 piezas cariadas	24,3	23,4	25,2	
<b>Frecuencia de tratamiento</b>	Ninguna pieza tratada	41,0	37,2	42,6	0,696
	1-3 piezas tratadas	29,1	28,9	26,6	
	> 3 piezas tratadas	30,0	34,0	30,0	

\*Nivel de significación  $p < 0,05$

#### 4.1.5. Hábitos de alimentación de los escolares

En cuanto a los hábitos de alimentación, se han estimado a partir de los cuestionarios FFQ y R24h ya comentados en Material y Métodos. La Tabla 4.1.5.1 resume los hábitos de alimentación que hacen referencia tanto a la forma de desayunar como a la distribución de la ingesta de ciertos alimentos a lo largo del día. A partir de esta primera toma de contacto se podrán posteriormente estimar con más precisión índices y factores que puedan incidir en el peso y determinar otras características de los niños en estudio. Todas las variables estudiadas en este apartado del cuestionario y expuestas en la Tabla 4.1.5.1 presentaron diferencias significativas, destacando el consumo de fruta, leche y cereales/derivados en el desayuno, siendo la media mañana el momento elegido para consumir otra pieza de fruta, y la casa familiar, el sitio donde se realiza el almuerzo, seguido del comedor escolar. En cuanto al consumo de refrescos, un 46,3% lo hace de 1 a 3 veces por semana.

**TABLA 4.1.5.1. HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN DE LOS ESCOLARES**

		Sí (%)	No (%)	Chi <sup>2</sup> *	p	
<b>Desayuno</b>	Desayuna	94,8	5,2	576,637		
	Fruta	82,1	17,9	305,311		
	Leche	91,3	8,7	505,171	<0,001	
	Cereales/derivados	76,2	23,8	203,438		
	Bollería industrial	13,8	86,2	382,021		
<b>Media mañana</b>		93,4	6,6	556,978	<0,001	
<b>Merienda</b>		95,2	4,8	606,968	<0,001	
<b>Más de un lácteo</b>		84,0	16,0	342,340	<0,001	
<b>Más de una pieza de fruta</b>		62,3	37,7	44,452	<0,001	
		Frecuencia (%)		Chi <sup>2</sup> *	p	
<b>Momento del día que consume fruta</b>	No toma fruta	10,6				
	Desayuno	19,1				
	Media mañana	27,2				
	Almuerzo	22,2				
	Merienda	7,2				
	Cena	1,1		627,552	<0,001	
	Desayuno-Media mañana	0,4				
	Desayuno-Merienda	0,7				
	Media mañana-Merienda	7,9				
	Desayuno-Media mañana-Merienda	3,6				
	<b>Lugar del almuerzo</b>	Casa	52,7			
		Comedor escolar	39,5			
Casa abuelos		4,5				
Casa-Casa abuelos		1,6		1504,914	<0,001	
Casa-Comedor		0,3				
Casa-Otros		0,3				
Otros		1,2				
<b>Consumo de refrescos</b>	Nunca	21,7				
	1-3 v/s	46,8		213,635	<0,001	
	4-6 v/s	12,3				
	Diario	19,2				

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

Las frutas seleccionadas para el cuestionario de nuestro estudio fueron las elegidas por consenso para el cuestionario realizado por la Fundación Thao. Como se observa en la Tabla 4.1.5.2, la fruta más consumida es la manzana (78,3%), seguida del plátano (71,3%). Se encuentran diferencias significativas en el consumo de todas las frutas excepto en la naranja, melón, cerezas y melocotón ( $p=0,813$ ,  $p=0,237$ ,  $p=0,581$ ,  $p=0,075$ , respectivamente).

**TABLA 4.1.5.2. CONSUMO DE FRUTA Y FRECUENCIA**

Fruta		Frecuencia (%)	Chi <sup>2</sup> *	p
<b>Pera</b>	No	43,5	81,255	<0,001
	Si	55,9		
<b>Piña</b>	No	76,4	146,435	<0,001
	Si	23,0		
<b>Uva</b>	No	54,0	79,354	<0,001
	Si	45,3		
<b>Manzana</b>	No	21,7	51,435	<0,001
	Si	78,3		
<b>Mandarina</b>	No	56,5	82,037	<0,001
	Si	42,9		
<b>Plátano</b>	No	28,1	121,663	<0,001
	Si	71,3		
<b>Ciruelas</b>	No	76,4	44,876	<0,001
	Si	23,6		
<b>Naranja</b>	No	49,1	0,056	0,813
	Si	50,9		
<b>Kiwi</b>	No	75,8	42,789	<0,001
	Si	24,2		
<b>Melón</b>	No	37,9	1,398	0,237
	Si	60,9		
<b>Cerezas</b>	No	47,8	0,304	0,581
	Si	52,2		
<b>Higos</b>	No	80,7	60,876	<0,001
	Si	19,3		
<b>Sandía</b>	No	29,8	111,590	<0,001
	Si	68,9		
<b>Fresas</b>	No	32,3	20,180	<0,001
	Si	67,7		
<b>Melocotón</b>	No	45,3	0,065	0,075
	Si	54,7		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación  $p<0,05$

#### 4.1.6. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ)

Se aplicó el cuestionario FFQ a los sujetos en estudio. En él se han analizado 33 alimentos clasificados en 16 grupos: cereales y derivados, legumbres, tubérculos, verdura (fresca y cocinada), frutas, lácteos, carnes (blancas y rojas), derivados cárnicos, pescados (blanco y azul), aceite de oliva, huevo, dulces, golosinas/snacks, precocinados, agua, zumos de fruta (natural y envasado), bebidas tipo refresco.

Las tablas que se desarrollan a continuación (Tablas 4.1.6.1, 4.1.6.2 y 4.1.6.3) muestran las frecuencias de consumo de alimentos de origen animal, vegetal y alimentos no recomendados, extraídas del cuestionario FFQ semicuantitativo. Como se aprecia hay diferencias significativas en la frecuencia del consumo de todos los grupos de alimentos correspondientes a cada una de las categorías.

**TABLA 4.1.6.1. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

Frecuencia (%)				Chi <sup>2</sup> *	p	Frecuencia (%)					
<b>LECHE</b>						<b>CARNE POLLO</b>					
Nunca	3,8					Nunca	5,1				
1-2 v/d	62,7					1-3 v/s	79,6			250,26	<0,001
3-4 v/d	18,4			196,68	<0,001	4-6 v/s	8,9				
> 4 v/d	14,6					Diario	6,4				
<b>YOGUR</b>						<b>CARNE ROJA</b>					
Nunca	8,3					Nunca	22,0				
1-2 v/d	70,7					1-3 v/s	66,0			153,73	<0,001
3-4 v/d	16,6			179,68	<0,001	4-6 v/s	5,7				
> 4 v/d	4,5					Diario	6,3				
<b>QUESO</b>						<b>DERIVADOS CARNICOS</b>					
Nunca	26,1					Nunca	6,9				
1-3 v/s	49,0					1-3 v/s	56,6			96,22	<0,001
4-6 v/s	13,4			56,37	<0,001	4-6 v/s	25,2				
Diario	11,5					Diario	11,3				
<b>POSTRE LACTEO</b>						<b>HAMBURGUESA</b>					
Nunca	18,4					Nunca	29,7				
1-3 v/s	48,7					1-3 v/s	62,0			143,52	<0,001
4-6 v/s	18,4			48,07	<0,001	4-6 v/s	5,7				
Diario	14,6					Diario	2,5				
<b>HUEVOS</b>						<b>PESCADO</b>					
Nunca	10,0					Nunca	7,0				
1-3 v/s	73,1					1-3 v/s	63,7			142,54	<0,001
4-6 v/s	11,3			198,75	<0,001	4-6 v/s	25,5				
Diario	5,6					Diario	3,8				
<b>MARISCO</b>											
Nunca	15,8										
<1v/s	28,5										
1v/s	38,6										
>1v/s	17,1			21,74	<0,001						

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

**TABLA 4.1.6.2. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL**

Frecuencia (%)		Chi <sup>2</sup> *	p	Frecuencia (%)		Chi <sup>2</sup> *	p
<b>PATATAS</b>				<b>PAN</b>			
Nunca	20,1	143,365	<0,001	Nunca	3,1	100,277	<0,001
1-3 v/s	64,8			1-2 v/d	34,6		
4-6 v/s	11,9			3-4 v/d	22,0		
Diario	3,1			> 4 v/d	39,6		
<b>PATATAS FRITAS</b>				<b>CEREALES DESAYUNO</b>			
Nunca	9,4	201,226	<0,001	Nunca	29,7	23,813	<0,001
1-3 v/s	73,6			1-3 v/s	38,7		
4-6 v/s	11,3			4-6 v/s	17,4		
Diario	5,7			Diario	14,2		
<b>VERDURA COCIDA</b>				<b>ARROZ</b>			
Nunca	30,4	56,019	<0,001	Nunca	6,9	217,981	<0,001
1-3 v/s	46,6			1-3 v/s	75,5		
4-6 v/s	13,7			4-6 v/s	12,6		
Diario	9,3			Diario	5,0		
<b>ENSALADA</b>				<b>PASTA</b>			
Nunca	13,2	13,654	0,003	Nunca	4,4	229,392	<0,001
1-3 v/s	31,4			1-3 v/s	76,6		
4-6 v/s	24,5			4-6 v/s	15,2		
Diario	30,8			Diario	3,8		
<b>FRUTA</b>				<b>LEGUMBRES</b>			
Nunca	1,2	59,845	<0,001	Nunca	12,0	81,367	<0,001
1-2 v/d	25,5			< 1 v/s	15,2		
3-4 v/d	29,8			1 v/s	31,0		
> 4 v/d	43,5			≥ 2v/s	41,1		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

**TABLA 4.1.6.3. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS NO RECOMENDADOS**

Frecuencia (%)	Chi²*	p	Frecuencia (%)	Chi²*	p
<b>GALLETAS</b>			<b>DULCES CASEROS</b>		
Nunca	10,8		Nunca	34,4	
1-3 v/s	55,7	81,241 <0,001	1-3 v/s	54,4	120,350 <0,001
4-6 v/s	18,4		4-6 v/s	8,1	
Diario	15,2		Diario	3,1	
<b>BOLLERÍA INDUSTRIAL</b>			<b>CHOCOLATE</b>		
Nunca	36,3		Nunca	35,0	
1-3 v/s	55,0	116,096 <0,001	1-3 v/s	55,4	108,758 <0,001
4-6 v/s	5,6		4-6 v/s	6,4	
Diario	3,1		Diario	3,2	
<b>CHUCHERÍAS</b>			<b>MERMELADA</b>		
Nunca	32,9		Nunca	59,2	
1-3 v/s	57,1	122,453 <0,001	1-3 v/s	24,2	151,323 <0,001
4-6 v/s	6,2		4-6 v/s	8,3	
Diario	3,7		Diario	8,3	
<b>ZUMO</b>			<b>TIPO DE ZUMO</b>		
Nunca	8,8		Natural	36,7	
1-2 v/d	41,3	34,250 <0,001	Envasado	28,7	31,440 <0,001
3-4 v/d	26,9		NS/NC	28,7	
> 4 v/d	23,1				
<b>REFRESCOS</b>			<b>TIPO DE REFRESCO</b>		
Nunca	20,5		Azucarado	22,0	
1-3 v/s	57,8	100,640 <0,001	Sin azúcar	35,5	43,709 <sup>j</sup> <0,001
4-6 v/s	5,0		NS/NC	39,0	
Diario	16,8				
<b>PRECOCINADOS</b>			<b>PIZZAS</b>		
Nunca	22,4		Nunca	15,0	
1-3 v/s	65,2	223,250 <0,001	1-3 v/s	75,6	225,101 <0,001
4-6 v/s	9,3		4-6 v/s	5,0	
Diario	3,1		Diario	4,4	
<b>SNACKS SALADOS</b>					
Nunca	28,5				
1-3 v/s	63,3	225,101 <0,001			
4-6 v/s	5,1				
Diario	2,5				

\*Test de Chi²; nivel de significación p<0,05

Como se observa en la tabla 4.1.6.3, la mayoría de población estudiada consume los alimentos no recomendados 1-3 veces/semana, por ello es conveniente un consumo controlado relación a su composición.

La Tabla 4.1.6.4 recoge la estimación de energía y nutrientes de la población a partir del análisis del cuestionario FFQ semicuantitativo. Se ha seguido el procedimiento descrito en el Capítulo de Material y Métodos.

**TABLA 4.1.6.4 INGESTA MEDIA DE NUTRIENTES Y ENERGÍA Y AJUSTE A LA RECOMENDACIÓN DE LOS MICRONUTRIENTES ESTIMADOS A PARTIR DEL FFQ**

Nutriente	Media	DE	Mediana	% Macronutriente	Mínimo	Máximo
<b>Energía (Kcal)</b>	2265,22	471,57	2216,05		1359,52	3673,28
<b>Proteínas (g)</b>	85,92	19,85	83,53	15,07	46,01	146,27
<b>Carbohidratos (g)</b>	343,7	74,06	342,56	61,80	188,93	543,13
<b>Lípidos (g)</b>	70,89	19,51	66,68	27,10	29,38	140,99
				<b>% DRIs</b>		
<b>Calcio (mg)</b>	1007,24	306,56	1080	135,00	646,09	1464,64
<b>Hierro (mg)</b>	12,59	3,5	13,24	147,10	7,92	17,58
<b>Yodo (µg)</b>	165,53	35,15	165	157,14	76,86	282,21
<b>Magnesio (mg)</b>	303,73	148,34	373,47	149,20	244,92	838,78
<b>Zinc (mg)</b>	8,01	2,39	7,77	77,70	1,62	15,68
<b>Selenio (µg)</b>	57,81	35,27	53,5	178,30	63,06	229,94
<b>Sodio (mg)</b>	3074,08	819,39	3026,12	227,70	1270,43	5257,12
<b>Potasio (mg)</b>	3265,87	819,06	3234,56	161,72	2709,57	5598,77
<b>Fósforo (mg)</b>	752,38	367,38	719,04	102,70	968,14	2791,76
<b>Vit. B<sub>1</sub> (mg)</b>	1,12	0,31	1,09	136,20	0,46	2,25
<b>Vit. B<sub>2</sub> (mg)</b>	1,46	0,41	1,41	117,50	0,13	2,91
<b>Niacina (mg)</b>	21,90	21,36	10,52	80,90	19,19	42,34
<b>Vit. B<sub>6</sub> (mg)</b>	1,67	0,46	1,68	120,20	0,86	2,94
<b>Ac. Fólico (µg)</b>	253,67	71,27	248,49	124,25	192,48	456,07
<b>Vit. C (mg)</b>	81,23	45,04	89,13	162,00	57,55	295,85
<b>Vit. A (µg)</b>	427,19	143,84	412,57	103,15	168,13	1002,28
<b>Vit. D (µg)</b>	1,27	0,68	1,01	22,00	0,19	3,92
<b>Vit. E (mg)</b>	5,42	1,48	5,31	66,37	1,77	10,27

Observamos que los macronutrientes se mantienen en los porcentajes recomendados por los organismos internacionales (OMS/FAO, 2007) y que los micronutrientes se adaptan a las recomendaciones de las DRIs, salvo en el caso del Zinc, Niacina, Vit. D y Vit. E, que quedan por debajo del 100%. La ingesta de sodio es más de doble de elevada que las recomendaciones.

Los resultados de FFQ se sometieron a un análisis de regresión múltiple por pasos para cada nutriente, con la ingesta total de nutrientes como variable dependiente.

Es un método de selección de variables por pasos, que nos permite elegir aquellas variables que mejor cumplen un criterio prefijado basado en la significación estadística de inclusión (para añadirla al modelo) o el criterio de exclusión (para eliminarla). Este método se ha utilizado como primer paso de cribado para seleccionar aquellos alimentos que mejor representan la ingesta de un determinado nutriente (Willett, 1998; Martínez-González et al, 2020).

Los nutrientes que demostraban  $\geq 80\%$  de la variabilidad intrapersona se introdujeron en el FFQ definitivo, que incluía los siguientes grupos de alimentos: cereales y derivados, legumbres, tubérculos, verdura (fresca y cocinada), frutas, lácteos, carnes (blancas y rojas), derivados cárnicos, pescados (blanco y azul), aceite de oliva, huevo, dulces, golosinas/snacks, precocinados, agua, zumos de fruta (natural y envasado), bebidas tipo refresco. Estos 16 grupos de alimentos contienen un total de 33 tipos de alimentos y el FFQ permite estimar el consumo de 18 nutrientes, incluida la energía (Ortega et al, 2016)

En la Tabla 4.1.6.6 se pueden observar los alimentos que más contribuyeron en la energía y en los distintos macro y micronutrientes.



#### 4.1.7. Cuestionario de recuerdo de 24 horas (R24h)

El cuestionario R24h recoge los alimentos consumidos durante tres días, siendo uno de ellos festivo. Se han estimado la media, desviación estándar y la mediana de la ingesta de energía y nutrientes.

La estimación de los nutrientes de la dieta se ha realizado considerando el tamaño medio de la ración ya que se les incluía en el cuestionario el ítem correspondiente al tamaño expresado en medidas caseras (vasos, cucharadas, platos, etc.). En determinados alimentos se ha recurrido también a la presentación comercial del alimento envasado, así como al tamaño recomendado por el Ministerio de Sanidad (Programa Perseo 2020). La Tabla 4.1.7.1 resume el valor medio de los nutrientes estimados.

**TABLA 4.1.7.1. INGESTA MEDIA DE NUTRIENTES Y ENERGÍA Y AJUSTE A LA RECOMENDACIÓN DE LOS MICRONUTRIENTES ESTIMADOS A PARTIR DEL R24h**

Nutriente	Media	DE	Mediana	Macronutriente (%)
<b>Energía (Kcal)</b>	1995,8	341,63	1995,80	
<b>Proteínas (g)</b>	53,5	6,56	52,80	10,58
<b>Carbohidratos (g)</b>	245,5	40,48	235,50	49,20
<b>Lípidos (g)</b>	83,5	10,44	82,20	37,42
				<b>%DRIs</b>
<b>Calcio (mg)</b>	494,78	230,82	465,50	62,35
<b>Hierro (mg)</b>	7,53	3,06	7,20	80,00
<b>Yodo (µg)</b>	151,4	42,78	135,34	144,19
<b>Magnesio (mg)</b>	253,95	59,95	147,50	59,00
<b>Zinc (mg)</b>	9,57	11,01	6,24	62,40
<b>Selenio (µg)</b>	54,86	33,02	56,95	189,60
<b>Sodio (mg)</b>	1266,03	741,05	1469,00	93,7
<b>Potasio (mg)</b>	2538,56	587,01	2611,70	130,58
<b>Fósforo (mg)</b>	716,09	258,05	774,50	110,60
<b>Vit. B<sub>1</sub> (mg)</b>	0,96	0,76	0,86	107,50
<b>Vit. B<sub>2</sub> (mg)</b>	0,94	0,44	1,16	96,60
<b>Niacina (mg)</b>	13,86	8,69	11,35	87,30
<b>Vit. B<sub>6</sub> (mg)</b>	1,16	2,99	1,15	82,14
<b>Ac. Fólico (µg)</b>	224,93	72,96	231,70	115,80
<b>Vit. C (mg)</b>	56,24	49,11	46,20	84,00
<b>Vit. A (µg)</b>	338,5	279,3	403,00	100,70
<b>Vit. D (µg)</b>	1,29	2,34	0,93	18,60
<b>Vit. E (mg)</b>	4,59	2,56	6,61	82,60

Analizando el cuestionario de Recuerdo de 24h se obtienen valores menores que con el FFQ. Los macronutrientes tienen valores muy inferiores a los recomendados y casi todos los micronutrientes no se ajustan a la recomendación de las DRIs.

#### 4.1.7.1. Validación de cuestionarios alimentarios

La Tabla 4.1.7.1.1 muestra la comparación de la ingesta de energía y nutrientes estimada por el cuestionario (media de los tres cuestionarios R24h). Se ha realizado a través de los resultados del test de Bland-Altman, Wilcoxon.

**TABLA 4.1.7.1.1. COMPARACIÓN DE LA INGESTA DE ENERGÍA Y NUTRIENTES. VALIDACIÓN DE CUESTIONARIO**

Nutriente	FFQ (Kcal/día)		R24h (kcal/día)		Test Bland-Altman		
	Mediana	IQR*	Mediana	IQR*	Diferencia significativa (FFQ - R24h)	95% IC	
						Inf.	Sup.
<b>Energía (Kcal/d)</b>	2216,05	690,10	1995,80	580,80	582,28	481,86	682,70
<b>Proteínas (g/d)</b>	83,53	25,20	52,80	23,90	20,89	16,22	25,56
<b>Carbohidratos (g/d)</b>	342,56	72,40	235,50	60,20	172,98	158,86	187,10
<b>Lípidos (g/d)</b>	66,68	43,20	82,20	33,30	-8,80	-14,43	-3,16
<b>Calcio (mg/d)</b>	1080,0	327,10	465,50	308,20	567,62	499,12	636,13
<b>Hierro (mg/d)</b>	13,24	7,0	7,20	5,60	5,04	4,13	5,94
<b>Magnesio (mg/d)</b>	373,47	64,1	147,50	82,10	306,02	278,14	333,89
<b>Zinc (mg/d)</b>	7,77	4,81	6,24	2,78	1,08	0,56	1,60
<b>Selenio (µg/d)</b>	53,50	34,30	56,95	47,34	50,34	40,18	60,50
<b>Sodio (mg/d)</b>	3026,12	695,14	1469,0	979,20	817,39	613,17	1021,61
<b>Potasio (mg/d)</b>	3234,56	486,10	2611,70	944,10	1128,08	954,75	2301,41
<b>Fósforo (mg/d)</b>	719,04	574,70	774,50	398,40	694,89	616,68	773,11
<b>Vit. B<sub>1</sub> (mg/d)</b>	1,09	0,70	0,86	0,73	-0,12	-0,22	-0,02
<b>Vit. B<sub>2</sub> (mg/d)</b>	1,41	0,92	1,16	0,66	-0,02	-0,13	0,08
<b>Niacina (mg/d)</b>	10,52	4,27	11,35	12,60	14,08	11,54	16,63
<b>Vit. B<sub>6</sub> (mg/d)</b>	1,68	1,32	1,15	0,96	0,10	-0,028	0,23
<b>Ac. Fólico (µg/d)</b>	248,49	53,02	231,70	53,93	170,41	152,35	188,47
<b>Vit. C (mg/d)</b>	89,13	28,53	46,20	48,70	109,46	96,82	122,09
<b>Vit. A (µg/d)</b>	412,57	367,93	403,0	299,70	52,14	-8,73	113,01
<b>Vit. D (µg/d)</b>	1,01	1,08	0,93	1,54	-0,58	-0,99	-0,17
<b>Vit. E (mg/d)</b>	5,31	7,22	6,61	5,46	-0,1231	-0,62	0,375

\*Rango intercuartílico

La Tabla 4.1.7.1.2 muestra la validación de los cuestionarios empleados considerando fundamentalmente la estimación de la ingesta de energía o el gasto energético en las actividades diarias. Se aplicó el test de Bland-Altman para comparar los resultados de la frecuencia de la actividad diaria, del FFQ semicuantitativo y de los tres R24h, mostrando la correlación del gasto energético de los individuos con el consumo de energía en la dieta estimado para un período de 24 horas.

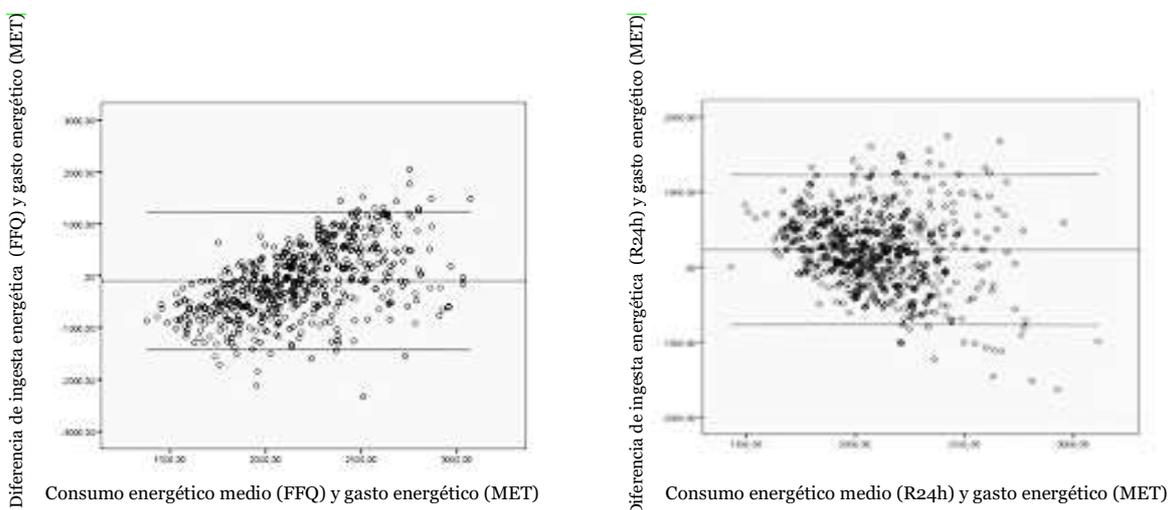
**TABLA 4.1.7.1.2. VALIDACIÓN DE LOS CUESTIONARIOS EMPLEADOS FFQ Y R24h**

	FFQ (Kcal/día)		R24h (kcal/día)		MET 24h (Kcal/día)		Test Bland-Altman			
	Mediana	IQR*	Mediana	IQR*	Mediana	IQR	Diferencia significativa (FFQ-R24h)	95% IC	Diferencia significativa (MET24h-FFQ)	95% IC
<b>Energía (Kcal/d)</b>	2187,1	690,1	1995,8	580,8	2006,7	679,7	121,3	67,6 a 176,1	-8,67	-73,9 a 56,5

\*Rango intercuartílico

Los *outliers* en este análisis oscilaron entre 0 y 5%.

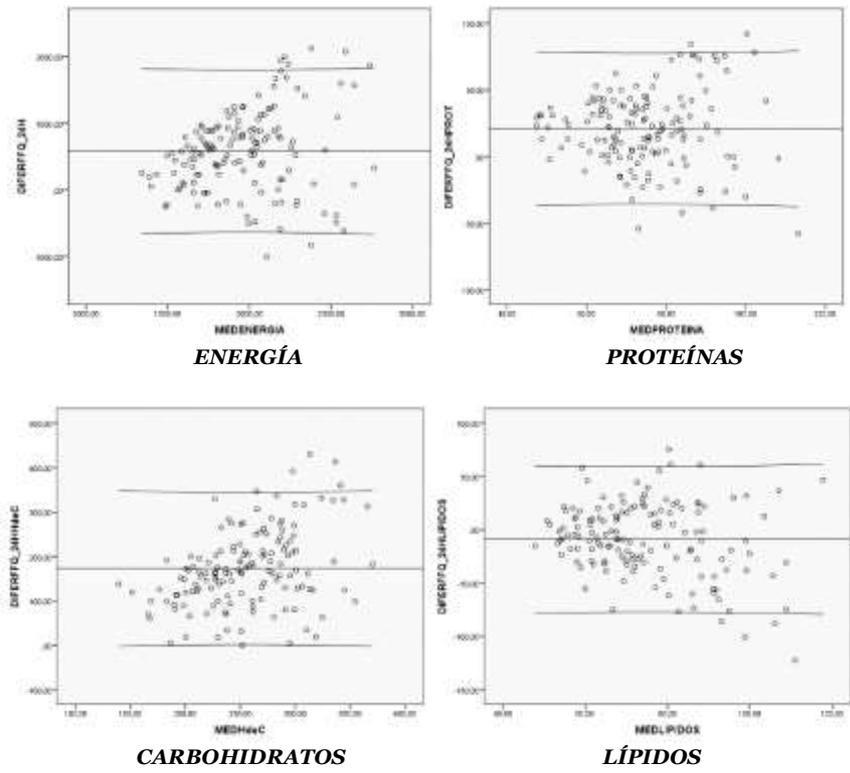
A continuación, se exponen los diferentes gráficos correspondientes a la validación de los cuestionarios FFQ y R24h (Figuras 4.1.7.1.1) y para la energía, los macronutrientes y micronutrientes (Figura 4.1.7.1.2).



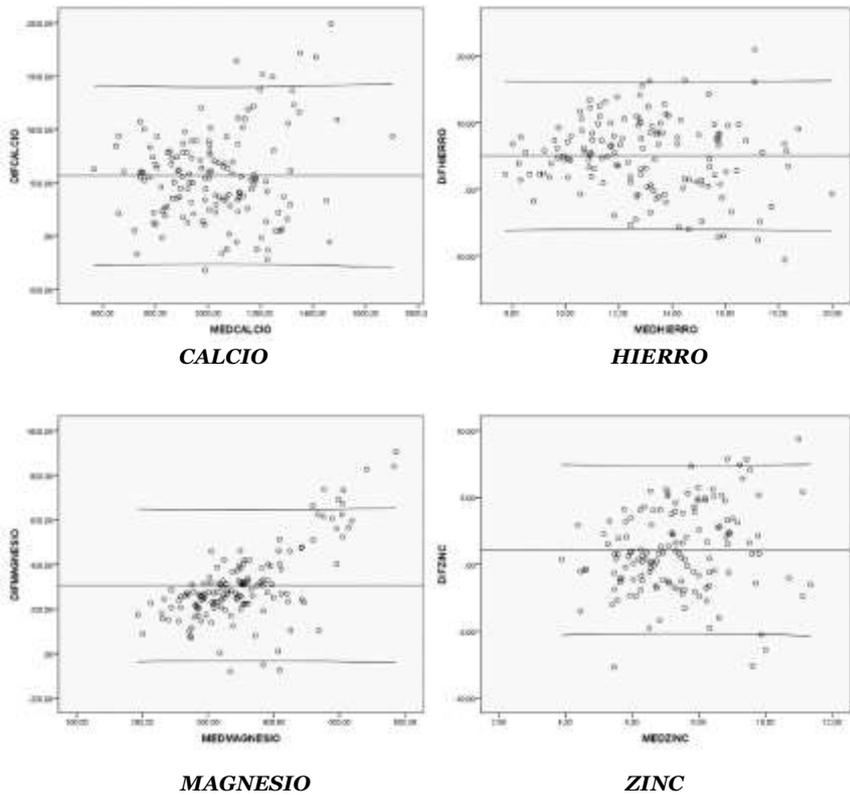
**Figura 4.1.7.1.1. Gráficos de Bland-Altman para la validación del cuestionario FFQ y R24h**

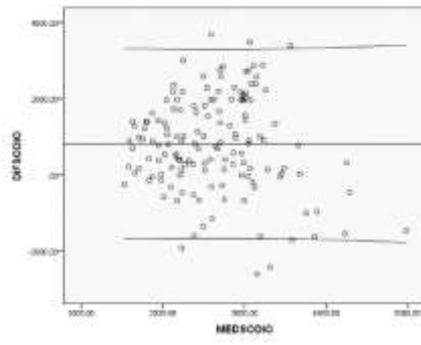
**Figura 4.1.7.1.2. Gráficos Bland-Altman para macronutrientes y micronutrientes**

**Macronutrientes**

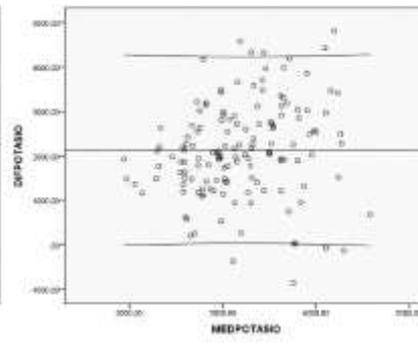


**Micronutrientes - MINERALES**

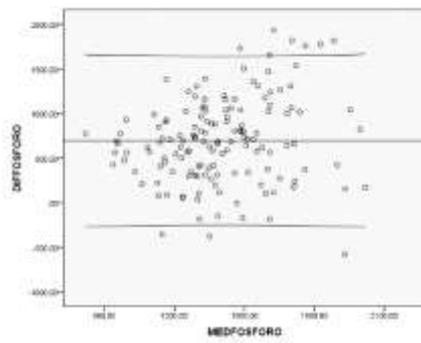




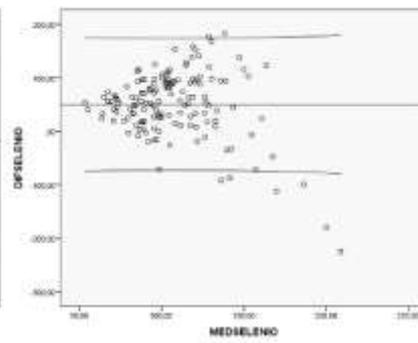
**SODIO**



**POTASIO**

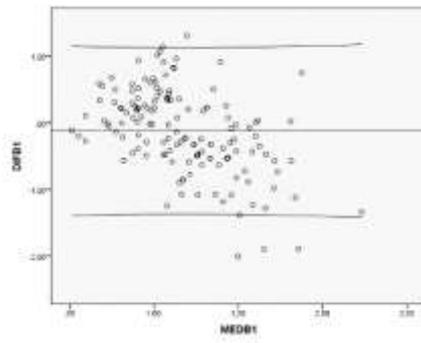


**FÓSFORO**

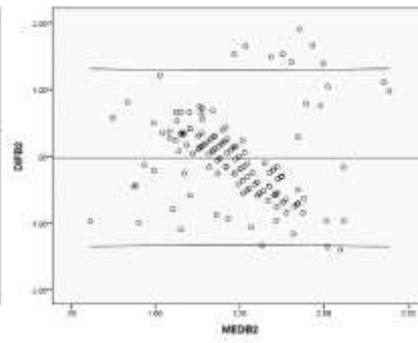


**SELENIO**

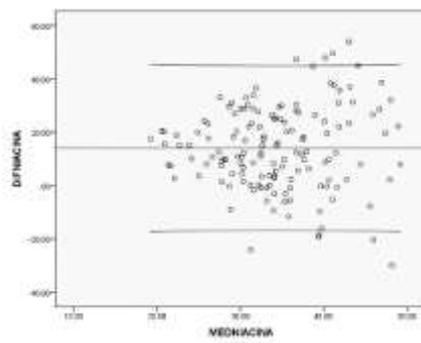
**Micronutrientes - VITAMINAS**



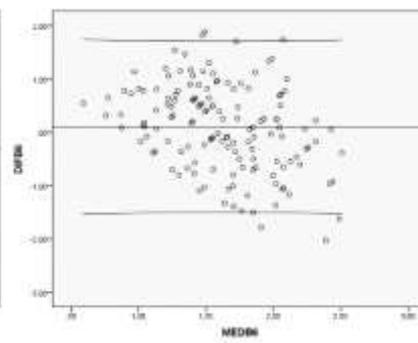
**VIT. B<sub>1</sub>**



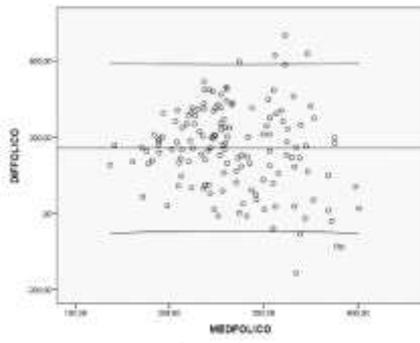
**VIT. B<sub>2</sub>**



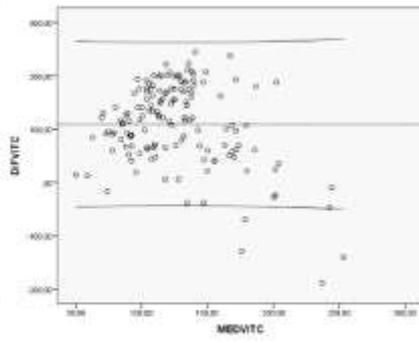
**NIACINA**



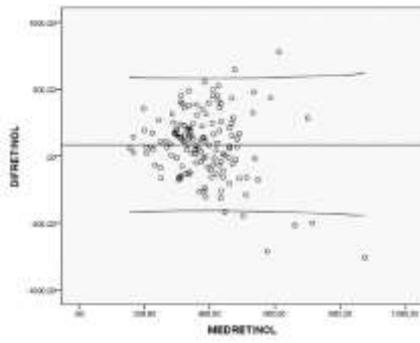
**VIT. B<sub>6</sub>**



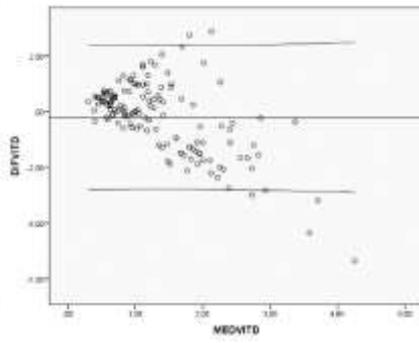
**ÁC. FÓLICO**



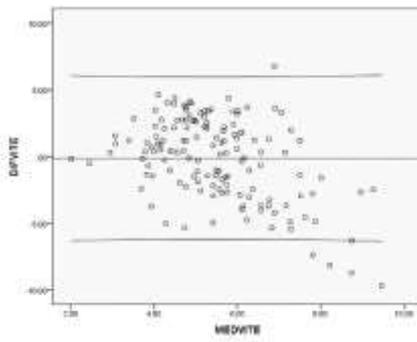
**VIT. C**



**RETINOL**



**VIT. D**



**VIT. E**

#### 4.1.8. Alimentos portadores de productos potencialmente disruptores endocrinos

El consumo de alimentos envasados hace necesario conocer con qué frecuencia nuestra población los consume para, posteriormente, estimar el riesgo de exposición a alguno de los contaminantes que migran desde el envase. Los resultados del cuestionario general utilizado se resumen en la Tabla 4.1.8.1.

**TABLA 4.1.8.1. ENVOLTURA Y FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS ENVASADOS**

	Frecuencia (%)	Chi <sup>2*</sup>	p
<b>Envoltura alimentos</b>			
<b>Papel</b>	13,8		
<b>Plástico</b>	16,2	419,425	<0,001
<b>Aluminio</b>	70,0		
<b>Atún (lata)</b>			
<b>Nunca</b>	34,6		
<b>1-3 v/s</b>	56,4	119,846	<0,001
<b>4-6 v/s</b>	4,5		
<b>Diario</b>	4,5		
<b>Maíz (lata)</b>			
<b>Nunca</b>	52,6		
<b>1-3 v/s</b>	36,5	103,744 <sup>b</sup>	<0,001
<b>4-6 v/s</b>	7,1		
<b>Diario</b>	3,8		
<b>Fruta en almíbar (lata)</b>			
<b>Nunca</b>	31,0		
<b>1-3 v/s</b>	46,8	56,937	<0,001
<b>4-6 v/s</b>	11,4		
<b>Diario</b>	10,8		
<b>Fideos/espaguetis**</b>			
<b>Nunca</b>	31,2		
<b>1-3 v/s</b>	54,5	97,273	<0,001
<b>4-6 v/s</b>	11,0		
<b>Diario</b>	3,2		
<b>Arroz**</b>			
<b>Nunca</b>	57,9		
<b>1-3 v/s</b>	29,6	111,421	<0,001
<b>4-6 v/s</b>	9,9		
<b>Diario</b>	2,6		
<b>Zumo envasado</b>			
<b>Cristal</b>	12,1		
<b>Carton</b>	56,1	305,013	<0,001
<b>Plástico</b>	17,8		
<b>No compra/No contesta</b>	14,0		
<b>Envase refrescos</b>			
<b>Cristal</b>	15,0		
<b>Plástico</b>	26,3	127,437	<0,001
<b>Lata</b>	37,5		
<b>No toma/No contesta</b>	21,2		
<b>Envases flexibles</b>			
<b>Diario</b>	3,8		
<b>Casi todos los días</b>	14,4	132,313	<0,001
<b>&lt; 1v/s</b>	32,5		
<b>Nunca</b>	48,8		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

\*\*Envase polimérico para microondas

#### **4.1.9. Estimación de fitoestrógenos en la dieta escolar**

La composición de los alimentos en la dieta de los escolares estudiados se estimó a partir de las tablas de composición de alimentos. Sin embargo, estas tablas rara vez informan sobre la presencia de componentes específicos, como en el caso de los fitoestrógenos de las verduras. Por ello, para cada alimento, la presencia de cada fitoestrógeno se calculó a partir de los datos publicados en la literatura (Boker et al, 2002). Se utilizó el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos FFQ para recopilar datos sobre la ingesta dietética de fitoestrógenos y de BPA en los alimentos enlatados.

La Tabla 4.1.9.1 muestra la ingesta media (g/día) de los alimentos consumidos y la ingesta media estimada correspondientes.

**TABLA 4.1.9.1. INGESTA MEDIA DE ALIMENTOS POTENCIALMENTE RICOS EN FITOESTRÓGENOS Y MEDIA DE INGESTA ESTIMADA**

ALIMENTO	Máximo	Mediana	Media (g/día)	DE	Media (µg)				
					Daidzeína	Genisteína	Formononetina	Biocanina A	Coumestrol
<b>Pan</b>	211	120	111,80	51,44	0,007	0,007			
<b>Galletas</b>	130	44,4	39,92	28,14	0,003	0,003			
<b>Cereales</b>	70	0	23,68	26,72					
<b>Bollería</b>	160	14	30,83	43,66	0,002	0,002	1,391		
<b>Pasta</b>	36	14	18,98	9,92	0,002	0,002			
<b>Arroz</b>	36	19,6	15,92	9,11					
<b>Pizza</b>	50,4	256	21,64	14,55	0,279	0,084			
<b>Zumo</b>	1000	0	294,3	246,63	0,824	0,200			
<b>Mermelada</b>	30	42	0,33	3,11	0,000	0,002			
<b>Verduras hervidas*</b>	108	150	45,48	36,28	0,007	0,184	0,000	0,000	
<b>Ensalada**</b>	300	8,4	144,8	110,41	0,152	0,371	21,073	0,014	0,452
<b>Legumbres</b>	21,6	0,00	12,93	7,69	0,132	6,418	6,995	0,110	
<b>Manzana</b>	400	0,00	97,00	128,83	2,205	0,010			
<b>Plátano</b>	300	0,00	49,12	85,49	0,147	1,424			
<b>Mandarina</b>	300	0,00	16,42	54,84	0,049	0,476			
<b>Kiwi</b>	150	0,00	4,87	26,60					
<b>Melocotón</b>	13,5	0,00	0,44	2,39	0,002	0,004			
<b>Naranja</b>	400	0,00	44,09	97,47					
<b>Fresa</b>	300	0,00	17,02	57,434	0,085	0,783			
<b>Pera</b>	300	0,00	36,17	73,432	0,018	0,317			
<b>Macedonia</b>	450	0,00	73,61	138,502	40,512	24,958			

\*Composición de verduras hervidas: col, coliflor, brócoli, judías verdes, guisantes.

\*\*Composición de ensalada: lechuga, pepino, tomate, zanahoria, pimiento verde, pimiento rojo, cebolla, espinacas.

La Tabla 4.1.9.2 resume la ingesta de fitoestrógenos y BPA de la población de estudio.

**TABLA 4.1.9.2. INGESTA ESTIMADA ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ) DE CADA FITOESTRÓGENO Y DEL BPA**

Fitoestrógeno	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE
Daidzeína	0,007	13,206	3,022	4,205	2,972
Genisteína	0,007	34,656	11,156	10,740	5,691
Formononetina	0,000	62,556	26,371	29,459	17,257
Biocanina A	0,000	0,214	0,101	0,124	0,068
Coumestrol	0,000	0,936	0,468	0,452	0,344
Matairesinol	0,794	16,791	8,864	8,910	2,895
Enterolactona	4,139	754,629	305,106	313,425	132,199
Enterodiol	0,645	440,739	168,572	169,882	81,902
BPA procedente de envases	0,508	2,815	1,453	1,661	0,638

#### 4.1.10. Resultados del análisis odontológico y concentración de Bisfenol A (BPA) en saliva

El BPA puede formar parte de los selladores y compuestos dentales de tres maneras: como ingrediente directo, como subproducto de la degradación de otros ingredientes [por ejemplo, metacrilato de glicidilo de bisfenol A (bis-GMA) y dimetacrilato de bisfenol A (bis-DMA)], o como material traza de su fabricación. (ADA, 2011; US FDA, 2011, EFSA de 2015) La ventana más significativa de exposición dental potencial al BPA es inmediatamente después de la aplicación de selladores y composites dentales a base de resina. (Olea et al, 1996; Sharma et al, 2016 Berge et al, 2017, Lee et al, 2017).

La muestra sobre la que se realizó este reconocimiento odontológico fue de 300 sujetos recogidos al azar entre el total de participantes en la investigación. La Tabla 4.1.10.1 recoge los resultados obtenidos referentes a la presencia/ausencia de sellador o composite en cada sujeto.

**TABLA 4.1.10.1. PRESENCIA DE SELLADOR O COMPOSITE EN LOS SUJETOS PARTICIPANTES**

Dientes tratados con composite/sellador	Frecuencia %	Porcentaje válido
0	249	83,0
1	20	6,7
2	13	4,3
3	7	2,3
4	6	2,0
5	2	0,7
6	2	0,7
8	1	0,3
Total	300	100,0
Total dientes afectados	51	
% Total dientes afectados		20,48

En la anterior tabla observamos la cantidad de sujetos expuestos a las diferentes cantidades de composite o sellador, dentro de nuestra muestra poblacional. Los resultados indican que el 20,48% del total de nuestra muestra tiene algún diente tratado con algún sellador o composite, con lo que están expuestos a la migración de moléculas vehiculizadas por el material de reestructuración estética dentaria.

La Tabla 4.1.10.2 corresponde al informe de alteraciones dentales sin tratar con composites/selladores, corresponde a un 44% de la población testada por odontólogos. Mientras que el 39% (117 sujetos) no presentan ningún daño dental.

**TABLA 4.1.10.2. DIENTES AFECTADOS Y NO TRATADOS**

Afectados sin tratar (nº)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	31	23,5
2	19	14,4
3	11	8,3
4	10	7,6
5	19	14,4
6	11	8,3
7	13	9,8
8	4	3,0
9	3	2,3
10	5	3,8
11	1	0,8
13	1	0,8
14	2	1,5
16	1	0,8
19	1	0,8

Aunque la revisión oral se realizó sobre 300 sujetos, la muestra de saliva se tomó a todos los niños participantes (657) al mismo tiempo que respondían al cuestionario epidemiológico. En este capítulo se recoge el análisis de las salivas de los niños examinados odontológicamente.

#### **4.1.10.1 Resultados del BPA en saliva**

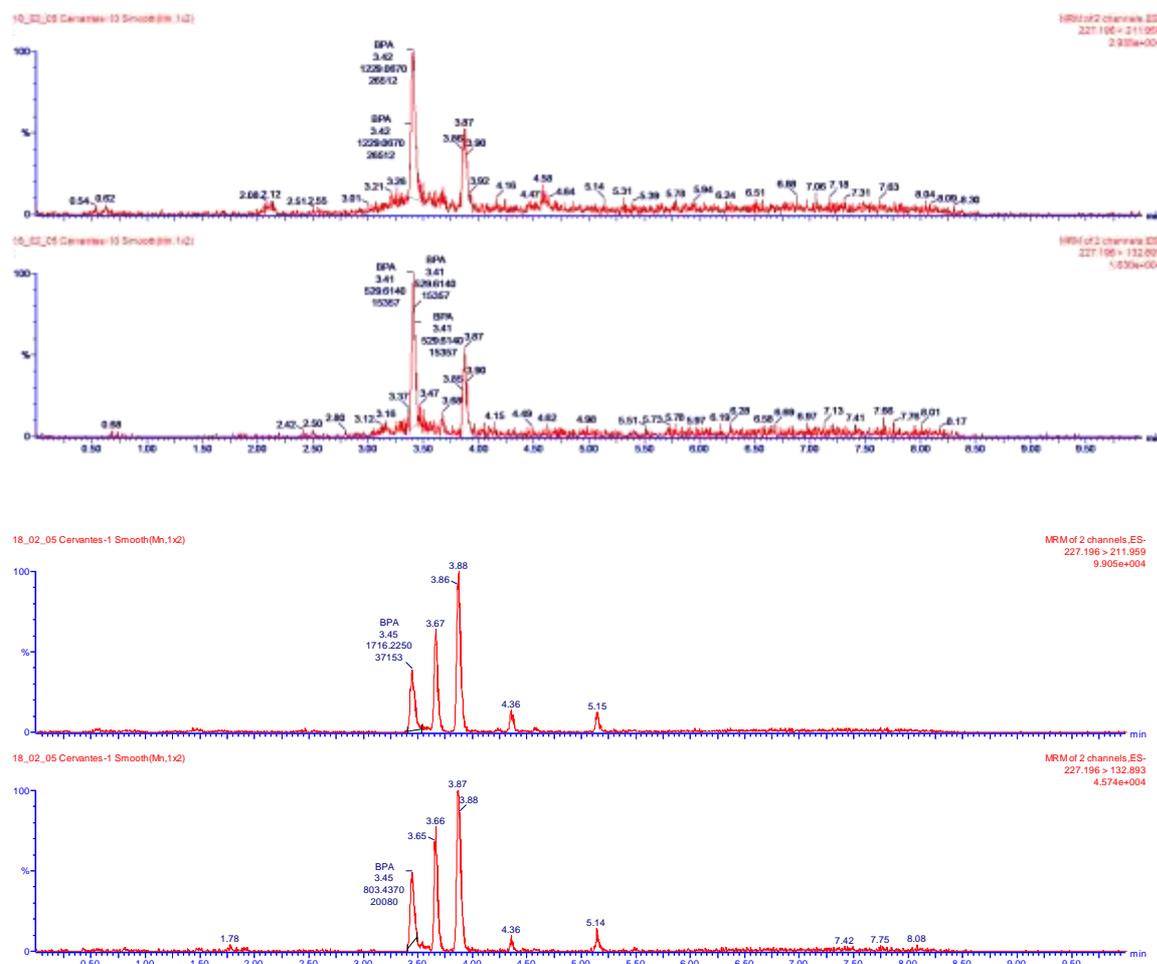
Análisis de saliva: después de descongelar los frascos de boca ancha de vidrio con saliva a temperatura ambiente, se calculó la cantidad de saliva pesando las muestras y restando el peso del frasco vacío y de los 0,5 ml de metanol añadido. El volumen estimado de saliva presenta un rango entre 9,5 y 31,3 y un valor medio de 20,4 mL. Las muestras de saliva se centrifugaron (1000 g, 10 min) y se pasaron a través de un filtro de poros de 0,45 µm HDPE Millipore previamente humidificado con metanol. Se cromatografiaron alícuotas de 20 µl

en las condiciones ya descritas para HPLC y detector de fluorescencia. Igualmente, las muestras recogidas al azar se analizaron en los Servicios Centrales de la Universidad de Granada mediante UHPLC-MS/MS para confirmación de la presencia de BPA. Los valores medios de BPA ng/mL quedan recogidos en la Tabla 4.1.10.1.1:

**TABLA 4.1.10.1.1. CONCENTRACIÓN EN SALIVAS DE BPA (ng/ml) (N= 51)**

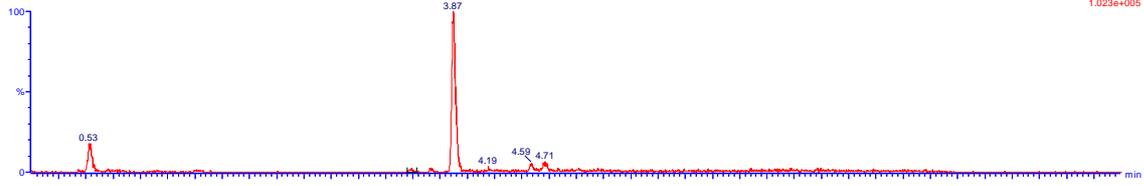
<b>Media</b>	29,59
<b>Mediana</b>	21,52
<b>DE</b>	17,07
<b>Mínimo</b>	10,76
<b>Máximo</b>	75,32
<b>Amplitud intercuartílica</b>	26,90

Los cromatogramas mostrados a continuación corresponden a muestras de saliva analizadas y confirmadas mediante UHPLC-MS/MS:



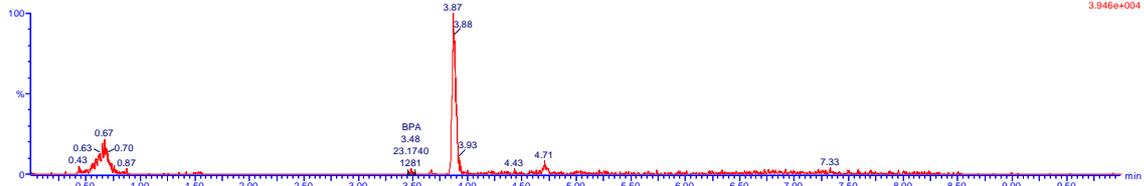


18\_02\_05 Cervantes-13 Smooth(Mn,1x2)



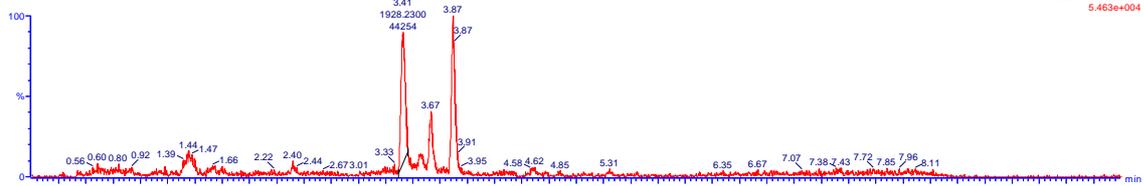
MRM of 2 channels, ES-  
227.196 > 211.959  
1.023e+005

18\_02\_05 Cervantes-13 Smooth(Mn,1x2)



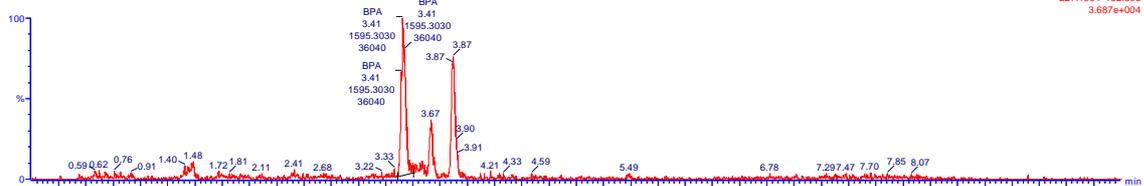
MRM of 2 channels, ES-  
227.196 > 132.893  
3.946e+004

18\_02\_05 Cervantes-17 Smooth(Mn,1x2)



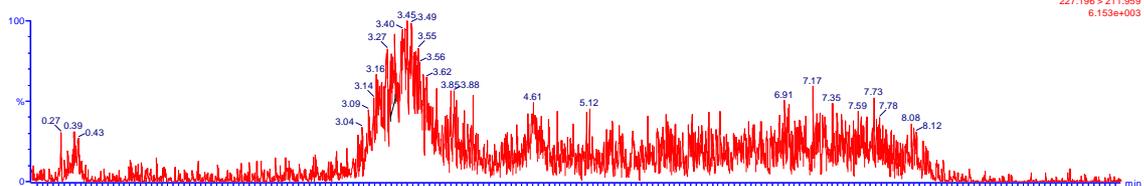
MRM of 2 channels, ES-  
227.196 > 211.959  
5.463e+004

18\_02\_05 Cervantes-17 Smooth(Mn,1x2)



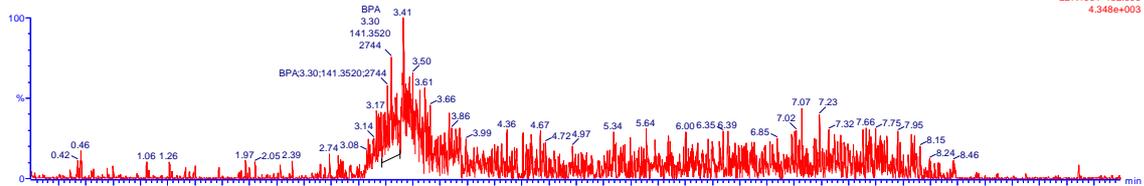
MRM of 2 channels, ES-  
227.196 > 132.893  
3.667e+004

18\_02\_05 Cervantes-20 Smooth(Mn,1x2)



MRM of 2 channels, ES-  
227.196 > 211.959  
6.153e+003

18\_02\_05 Cervantes-20 Smooth(Mn,1x2)



MRM of 2 channels, ES-  
227.196 > 132.893  
4.348e+003

## **4.2. Índices y análisis inferencial**

A partir de las variables descriptivas recogidas en el análisis descriptivo, se han realizado diferentes estudios inferenciales que, de acuerdo con los objetivos marcados en este trabajo, vienen marcados por factores que se pueden relacionar con las características de peso e IMC de la población en estudio.

### **4.2.1. Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea - KIDMED**

El grado de adherencia a la Dieta Mediterránea se valoró empleando el Índice de adherencia a la dieta mediterránea (KIDMED). Su puntuación, tal y como vimos en Material y Métodos, oscila entre 0 y 12 y se establecen tres rangos de calidad de la Dieta Mediterránea:  $\leq 3$  baja calidad dieta; 4-7 necesita mejorar el patrón alimentario para ajustarlo a la DM;  $\geq 8$  DM óptima.

Como se muestra en la Tabla 4.2.1.1 un porcentaje más alto de niños que de niñas dio respuestas positivas a *Desayuna bollería industrial o galletas y Toma golosinas y/o dulces varias veces al día*. En general, la puntuación media del índice fue  $>8$  (DE 2,12), por lo que los escolares estudiados siguen la DM de forma óptima.

**TABLA 4.2.1.1. ADHERENCIA DE LOS ESCOLARES AL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA SEGÚN EL ÍNDICE KIDMED**

KIDMED ítems	% respuestas positivas	Porcentaje de respuestas positivas por sexo	
		Masculino	Femenino
Desayuna	94,8	51,8	48,2
Desayuna bollería industrial o galletas	13,6	62,7	37,3
Desayuna un lácteo (yogurt, leche...)	90,7	49,2	50,8
Desayuna un cereal o derivado (pan...)	76,2	50,6	49,4
Toma 2 yogures y/o 40 g queso a diario	64,9	50,7	49,3
Toma una fruta o un zumo natural a diario	80,5	49,0	51,0
Toma una 2ª pieza de fruta a diario	64,7	50,4	49,6
Toma verduras frescas o cocinadas 1 vez/día	65,4	47,2	52,8
Toma verduras frescas o cocinadas >1 vez/día	30,1	51,1	48,9
Toma pescado por lo menos 2-3 veces/semana	76,7	50,5	49,5
Le gustan las legumbres y las toma >1 vez/semana	69,0	48,7	51,3
Toma pasta o arroz casi a diario (≥5 días/semana)	46,6	52,0	48,0
Toma frutos secos al menos 2-3 veces/semana	58,4	49,6	50,4
Utiliza aceite de oliva	94,1	49,4	50,6
Toma golosinas y/o dulces varias veces al día	12,9	63,2	36,8
Acude una vez o más a la semana a un restaurante de comida rápida	42,8	50,3	49,7
<b>KIDMED puntuación media (DE)</b>	<b>8,96 (2,12)</b>	<b>8,85 (2,17)</b>	<b>9,10 (2,10)</b>

En cuanto a la calidad de la dieta de los participantes, vemos que existen diferencias significativas según el índice KIDMED. Un elevado número de participantes (75,83%) sigue una Dieta Mediterránea óptima (Tabla 4.2.1.2), mientras que un 23,56% necesita mejorarla.

**TABLA 4.2.1.2. CALIDAD DE LA DIETA (KIDMED) EXPRESADA EN PORCENTAJE DE ESCOLARES**

KIDMED*	Escolares (%)	Chi <sup>2</sup> **	p
Baja calidad DM	0,60		
Necesita mejorar DM	23,56	590,369	<0,001
DM óptima	75,83		

\*Puntuación KIDMED: ≤3 baja calidad de la dieta; 4-7 necesita mejorar el patrón alimentario para ajustarlo a la DM; ≥8 DM óptima

\*\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

Al analizar la relación de la adherencia al patrón dietético mediterráneo con la composición corporal, se observa que no hay diferencias significativas en cuanto al número de escolares clasificados según el IMC (Cole, 2002) en Normopeso, Sobrepeso/Obesidad y la calidad de la dieta según el índice KIDMED (Tabla 4.2.1.3).

**TABLA 4.2.1.3. ESCOLARES CON NORMOPESO, SOBREPESO/OBESIDAD SEGÚN IMC (Cole, 2002) Y KIDMED**

KIDMED	Normopeso (%)	Sobrepeso/Obesidad (%)	Chi <sup>2</sup> *	p
<b>Baja calidad DM</b>	50,0	50,0		
<b>Necesita mejorar DM</b>	61,5	38,5	0,451	0,798
<b>DM óptima</b>	63,3	36,7		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

De igual modo ocurre con el % Grasa corporal (Tabla 4.2.1.4), donde no se encuentran diferencias significativas cuando se relaciona con la calidad de la dieta según este índice.

**TABLA 4.2.1.4. ANOVA DEL % GRASA EN RELACIÓN AL ÍNDICE KIDMED**

KIDMED	Mínimo	Máximo	Media	DE	IC 95%		F*	p
					Inferior	Superior		
<b>Baja calidad DM</b>	16,15	39,49	27,17	10,10	11,10	43,25		
<b>Necesita mejorar DM</b>	11,11	41,81	23,91	5,91	22,96	24,85	0,66	0,520
<b>DM óptima</b>	4,56	49,86	24,00	5,52	23,52	24,49		

\*ANOVA; nivel de significación p<0,05

#### 4.2.2. Índice cintura-talla (ICT)

Con el Índice de Cintura-Talla (ICT) se busca una alternativa para clasificar a la población escolar en Normopeso y Sobrepeso/obesidad. El objetivo de este estudio nos llevó a determinar el punto de corte óptimo de ICT para diferenciar entre el Normopeso y el sobrepeso en la infancia y examinar su relación con los hábitos de vida saludables y la adherencia al patrón dietético mediterráneo (KIDMED).

Al analizar el punto de corte para Normopeso/Sobrepeso/Obesidad según el ICT, se halló la mayor concordancia para un valor de 0,48 (ICT≤0,48 = Normopeso; ICT>0,48 = Sobrepeso), que es el que mostró una concordancia estadísticamente significativa (coeficiente Kappa = 0,613) (Tabla 4.2.2.1).

**TABLA 4.2.2.1. CONCORDANCIA (TEST KAPPA) ENTRE DIFERENTES VALORES DE CORTE DEL ICT Y LA CLASIFICACIÓN DEL IMC CORRESPONDIENTES**

ICT	IMC		Kappa	Error estándar asintótico	95% IC		p*
	Normopeso (N)	Sobrepeso/Obesidad (N)			Inferior	Superior	
≤ 0,45	165	16	0,428	0,038	0,353	0,502	<0,001
> 0,46	115	141					
≤ 0,46	197	20	0,530	0,039	0,453	0,604	<0,001
> 0,47	83	137					
≤ 0,47	221	30	0,575	0,040	0,496	0,653	<0,001
> 0,48	59	127					
<b>≤ 0,48</b>	<b>251</b>	<b>44</b>	<b>0,613</b>	0,040	0,534	0,692	<0,001
> 0,49	33	113					
≤ 0,49	258	59	0,559	0,042	0,477	0,641	<0,001
> 0,50	26	98					
≤ 0,50	269	79	0,489	0,043	0,405	0,573	<0,001
> 0,51	15	78					

\*Test-T; nivel de significación p<0,05

En cuanto a la relación del ICT con la adherencia al patrón dietético mediterráneo, vemos que no existen diferencias significativas en cuanto al número de escolares clasificados según el ICT ≤ 0,48, en Normopeso y Sobrepeso/Obesidad y la calidad de la dieta según el índice KIDMED (Tabla 4.2.2.2).

**TABLA 4.2.2.2. ESCOLARES CON NORMOPESO, SOBREPESO/OBESIDAD SEGÚN ICT ≤ 0,48 Y KIDMED**

	Baja calidad DM	Necesita mejorar DM	DM óptima	Chi <sup>2</sup> *	P
<b>Normopeso (%)</b>	50	58	55,8		
<b>Sobrepeso/Obesidad (%)</b>	50	41,7	44,2	0,382	0,826

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

El análisis de regresión logística (Tabla 4.2.2.3) se aplicó para estimar la influencia en el ICT de las siguientes variables independientes: sexo, rango de edad, %G, clasificación en Normopeso/Sobrepeso según el IMC (Cole et al, 2002), adherencia a la Dieta Mediterránea (puntuación índice KIDMED), número de hermanos, práctica de actividad física extraescolar y número de horas de sueño/día. En relación con el límite de ICT de 0,48 se obtuvieron valores significativos de OR para el sexo femenino (OR = 1,492), sueño de <8 h diarias (OR = 2,209), %G por debajo de la mediana (OR = 19,46), IMC clasificado como Normopeso (OR = 20,26) y la puntuación del índice KIDMED por debajo de la mediana (OR = 1,604). Las variables restantes no fueron estadísticamente significativas, pero contribuyeron a una clasificación correcta en el 89,5% de los casos.

**TABLA 4.2.2.3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA DETERMINAR LOS FACTORES ASOCIADOS A UN ICT  $\leq 0,48$**

FACTORES	B	p*	OR	95 % IC para OR	
				Inferior	Superior
<b>SEXO: femenino</b>	0,400	0,135	1,492	0,883	2,521
<b>EDAD: 6-7</b>	0,007	0,965	1,007	0,742	1,366
<b>IMC: Normopeso</b>	3,009	0,001*	20,266	11,770	34,894
<b>%G: &lt; mediana</b>	2,968	0,001*	19,459	12,616	30,012
<b>KIDMED: <math>\leq 8,0</math> (&lt; mediana)</b>	0,473	0,015*	1,604	1,097	2,345
<b>HERMANOS: no</b>	0,023	0,951	1,023	0,494	2,121
<b>DEPORTES EXTRAESCOLARES: no</b>	0,352	0,098	1,422	0,936	2,160
<b>HORAS DURMIENDO: <math>\leq 8,0</math></b>	0,792	0,014*	2,209	1,173	4,160

\*Nivel de significación  $p < 0,05$

### 4.2.3. Práctica de actividad física y relación con el peso corporal

La obesidad y el sobrepeso son consecuencia de numerosos factores. Nuestro estudio se centra en los relacionados con la actividad/sedentarismo y la ingesta diaria de energía. El peso de los individuos se ha asociado con su actividad física, por lo que se investigó la relación entre su gasto total de energía/día y su ingesta total de energía, que se calculó mediante el cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ). Dado que el sobrepeso y la obesidad se ven afectados por el grado de actividad de las personas, nuestro objetivo fue estimar el gasto de energía durante un día estándar (24 h), incluidos los períodos de actividad más intensa (por ejemplo, juegos o deportes) y los períodos sedentarios (p. ej., estudiar, usar el ordenador/teléfono móvil o ver la televisión).

Se dedujo que las actividades extraescolares que más practican los escolares (Tabla 4.2.3.1) son jugar e ir al parque (59%). Entre los tres grupos en los que se dividieron las actividades extraescolares existen diferencias significativas.

**TABLA 4.2.3.1. PORCENTAJE DE ESCOLARES QUE PRACTICAN ACTIVIDADES EXTRAESCOLARES SEGÚN EL TIPO DE ACTIVIDAD**

Actividades Extraescolares	%	Chi <sup>2</sup> *	P
<b>Música/Idiomas</b>	13,7		
<b>Jugar/Parque</b>	59,0	52,26	<0,001
<b>Deporte/Música/Idiomas</b>	27,3		

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación  $p < 0,05$

La Tabla 4.2.3.2 recoge el tipo de actividad extraescolar realizada por los participantes. Comparamos la participación en cada tipo de deporte (individual/de equipo/actividad no deportiva) entre niños y niñas. Como se observa, los deportes de equipo son los elegidos por ambos sexos, aunque el número de participantes de sexo femenino es prácticamente el mismo en cualquiera de los tres grupos (en torno al 32%).

**TABLA 4.2.3.2. ACTIVIDAD EXTRAESCOLAR REALIZADA, FRECUENCIA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS POR SEXO**

Actividad Extraescolar	Sexo	N (%)	Chi <sup>2</sup>	p*	OR	95 % IC para OR	
						Inferior	Superior
Deporte individual**	Masculino	27 (9,0%)	52,251	<0,001	4,857	3,082	7,656
	Femenino	112 (32,4%)					
Deporte de equipo***	Masculino	200 (66,4%)	72,309	<0,001	0,248	0,179	0,344
	Femenino	114 (32,9%)					
Actividad no deportiva	Masculino	71 (26,6%)	4,023	0,045	0,699	0,492	0,993
	Femenino	106 (30,6%)					

\*Test de Chi<sup>2</sup>; nivel de significación p<0,05

\*\*Deporte individual: Bailar, Ciclismo, Gimnasia rítmica, Montar a caballo, Correr, Nadar, Judo.

\*\*\*Deporte de equipo: Fútbol, Baloncesto, Jugar, Balonmano, Tenis.

Según el cuestionario de actividad diaria, el gasto de energía medio (MET) fue 1973,8 Kcal/día para el sexo masculino y 1983,19 Kcal/día para el sexo femenino, según la fórmula para niños propuesta por Harrell et al. (2005) y Ridley et al. (2008) También se calculó el gasto de energía estimado para diferentes actividades durante un período de 24 horas y el gasto energético total correspondiente a actividades moderadas, como se recoge en el Método de Torun (2005). El tiempo dedicado a cada actividad extraescolar osciló entre 2 y 6 h/semana, con un valor medio de 0,29 h/día y un máximo de 2,14 h/día (Tabla 4.2.3.3).

**TABLA 4.2.3.3. GASTO MEDIO DE ENERGÍA POR ACTIVIDAD (MET\*) Y TIEMPO EN HORAS DEDICADO A CADA ACTIVIDAD EN UN DÍA**

	Sexo	Media(DE)	Mediana	Mínimo	Máximo	p**
Horas durmiendo	Masc.	8,49(0,97)	8,00	8,00	12,00	0,535
	Fem.	8,45(0,98)	8,00	7,30	14,00	
MET durmiendo (Kcal/peso/noche)	Masc.	353,53(88,69)	341,28	200,64	806,87	0,639
	Fem.	357,01(97,49)	338,40	199,68	815,76	
Horas andando al colegio	Masc.	0,26(0,25)	0,50	0,00	0,50	0,083
	Fem.	0,23(0,25)	0,00	0,00	0,50	
MET kcal andando al colegio/peso	Masc.	26,64(27,21)	34,43	0,00	96,28	0,174
	Fem.	23,69(27,69)	0,00	0,00	94,54	
Horas de Educación Física	Masc.	1,88(0,54)	2,00	0,00	5,00	0,266
	Fem.	1,91(0,52)	2,00	0,00	7,00	
MET Educación Física (kcal/peso)	Masc.	130,90(50,30)	127,5	0,00	289,2	0,266
	Fem.	135,60(56,05)	133,4	0,00	681,8	
Horas actividad física extraescolar	Masc.	0,33(0,30)	0,29	0,00	2,14	0,013
	Fem.	0,26(0,32)	0,29	0,00	2,14	
MET actividad física extraescolar/día/peso	Masc.	90,54(105,99)	71,14	0,00	578,40	0,026
	Fem.	73,34(89,29)	64,23	0,00	656,57	
Actividad sedentaria/24h	Masc.	13,04(1,36)	13,50	7,86	16,00	0,230
	Fem.	13,15(1,32)	13,50	6,21	16,00	
MET actividad sedentaria/día/peso	Masc.	1372,05(394,45)	1310,53	562,28	2654,57	0,485
	Fem.	1393,35(377,28)	1340,55	595,22	2764,50	
Total MET en 24h (kcal/día)	Masc.	1973,8(500,60)	1891,5	966,58	4212,2	0,743
	Fem.	1983,19(490,30)	1883,2	1099,25	3329,1	

\*Valores MET para diferentes grados de actividad basados en los propuestos por Harrell et al (2005), Torun et al (2005) y Ridley et al (2008). 1 MET= 0,0175 kcal x kg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> y Kcal/min = MET x 0,0175 x peso (kg).

\*\*Test-T, nivel de significación p<0,05

La Tabla 4.2.3.4 muestra el gasto energético diario de los escolares clasificado por el IMC como Normopeso, Sobrepeso u Obesidad. Se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los casos.

**TABLA 4.2.3.4. GASTO ENERGÉTICO/DÍA SEGÚN IMC. ANÁLISIS DE MEDIAS (ANOVA)**

	IMC	Media (DE)	Mínimo	Máximo	F* (p)
<b>MET durmiendo (Kcal/peso/noche)</b>	Normopeso	308,16(52,18)	199,68	524,40	361,5(<0,001)
	Sobrepeso	401,05(69,47)	240,00	652,32	
	Obesidad	511,96(102,41)	334,08	815,76	
<b>MET desplazamiento andando al colegio (kcal/peso)</b>	Normopeso	19,76(22,40)	0,00	68,59	25,4(<0,001)
	Sobrepeso	29,82(29,49)	0,00	84,83	
	Obesidad	42,11(37,88)	0,00	96,28	
<b>MET Educación Física (Kcal/peso)</b>	Normopeso	232,18(68,94)	0,00	518,00	98,5(<0,001)
	Sobrepeso	295,54(132,96)	0,00	1363,60	
	Obesidad	391,46(95,28)	0,00	578,40	
<b>MET actividad física extraescolar (Kcal/día/peso)</b>	Normopeso	72,52(88,42)	0,00	577,60	8,8(<0,001)
	Sobrepeso	90,36(111,67)	0,00	656,57	
	Obesidad	123,76(115,86)	0,00	578,40	
<b>MET actividad sedentaria (Kcal/día/peso)</b>	Normopeso	1197,93(253,84)	562,28	1982,40	248,2(<0,001)
	Sobrepeso	1573,41(327,59)	748,39	2654,57	
	Obesidad	1940,90(378,66)	777,96	2764,50	
<b>Total MET en 24h (Kcal/peso/día)</b>	Normopeso	1830,73(321,77)	966,58	2816,72	356,3(<0,001)
	Sobrepeso	2390,17(418,95)	1525,71	4025,63	
	Obesidad	3010,20(539,14)	1744,79	4501,40	

N(%): Normopeso= 399(62,3%); Sobrepeso=174(26,8%); Obesidad=69(10,9%).

\*ANOVA; nivel de significación p<0,05

El uso de la regresión logística para analizar la influencia de todos los factores presentados hasta ahora sugiere que los únicos predictores estadísticamente significativos de Normopeso versus Sobrepeso son el gasto energético MET (Kcal/día) de los escolares que practican actividad física extraescolar, el gasto energético de las actividades sedentarias y el gasto energético total/día expresado como MET (Tabla 4.2.3.5).

**TABLA 4.2.3.5. FACTORES DE ACTIVIDAD FÍSICA QUE AFECTAN AL NORMOPESO**

Factores	B	p*	OR	95 % IC para OR	
				Inferior	Superior
<b>Deporte/día (MET)*</b>	0,118	0,071	1,686	0,957	2,971
<b>Actividad sedentaria/día (MET)*</b>	1,631	0,001	5,108	2,251	11,591
<b>Actividad total 24h (MET)*</b>	1,305	0,002	3,686	1,638	8,297

\*Ref > mediana

\*\*Nivel de significación p<0,05

#### **4.2.4. Estimación de la calidad de la ingesta proteica de la dieta**

Se propone un índice para estimar la calidad de la ingesta de proteínas en la dieta, considerando la ingesta diaria de aminoácidos esenciales y la energía producida por esta ingesta de proteínas.

El índice de calidad de la ingesta de proteínas (QIDP por sus siglas en inglés – Quality Index Diet's Protein) estima la calidad de la ingesta de proteínas en la dieta, considerando la ingesta total y la energía de las proteínas y los aminoácidos esenciales.

El QIDP se desarrolló basándose en las recomendaciones de ingesta de proteínas y aminoácidos, considerando los requisitos de aminoácidos esenciales para cada grupo de edad. Este índice, basado en una revisión exhaustiva de las recomendaciones para la ingesta de proteínas y aminoácidos, se puede adaptar a cualquier grupo de edad o población considerando las pautas correspondientes.

La estimación de la calidad de la proteína dietética se calcula a partir de la ingesta de 12 componentes: g/día de proteínas totales; mg/día de histidina, isoleucina, leucina, valina, lisina, triptófano, treonina, aminoácidos de azufre (metionina + cisteína) y aminoácidos aromáticos (fenilalanina + tirosina); el consumo total de proteínas como porcentaje de la ingesta diaria total de energía; la calidad del consumo de proteínas, estimada en función del aminoácido limitante de la ingesta total de proteínas en la dieta (se considera el aminoácido que menos frecuentemente llegó a las recomendaciones).

Los valores del índice oscilan entre 0 (baja calidad de proteína) y 12 (alta calidad de proteína). Para todos los componentes de QIDP el valor de la mediana se consideró como el punto de corte. Las recomendaciones de proteínas y aminoácidos se tomaron de las conclusiones publicadas por el grupo internacional de expertos de OMS/FAO/ONU (OMS 2007).

La Tabla 4.2.4.1 muestra la ingesta recomendada de aminoácidos esenciales para las edades escolares y la ingesta estimada de los escolares del estudio. En la población estudiada, la ingesta de todos los aminoácidos fue significativamente mayor que las recomendaciones ( $p < 0,001$ , Test-T). El análisis de la calidad de la proteína en la dieta en función de la ingesta de aminoácidos mostró un contenido significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) en comparación con las recomendaciones de todos los aminoácidos esenciales, excepto la leucina ( $p = 0,994$ ), que mostró una ingesta de 61,01 mg/g de proteína/día (DE = 13,84). La frecuencia de cada aminoácido estaba por encima del valor medio, excepto para la leucina. Por lo tanto, se seleccionó Leucina como el aminoácido limitante para el cálculo del índice QIDP.

**TABLA 4.2.4.1. COMPARACIÓN DE LA INGESTA DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES CON LAS RECOMENDACIONES PARA NIÑOS DE 3-10 AÑOS**

Aminoácidos	Recomend.* mg aa/kg peso/día	Media (DE)	p**	Recomend.* mg aa/g proteína/día	Media (DE)	p**	% Debajo recomend.
<b>Histidina</b>	12	34,76(17,16)	0,001	16	21,59(5,56)	0,001	13,0
<b>Isoleucina</b>	23	62,93(31,10)	0,001	31	39,19(9,38)	0,001	17,4
<b>Leucina</b>	44	97,68(47,57)	0,001	61	61,01(13,84)	0,994	37,9
<b>Lisina</b>	35	85,21(44,71)	0,001	48	52,23(13,54)	0,001	29,2
<b>Metionina- Cisteína</b>	18	45,44(22,52)	0,001	24	28,29(6,37)	0,001	19,9
<b>Fenilalanina- Tirosina</b>	30	101,80(48,13)	0,001	41	63,75(13,60)	0,001	6,2
<b>Treonina</b>	18	51,80(25,56)	0,001	25	32,08(7,30)	0,001	15,5
<b>Triptófano</b>	4,8	16,35(8,02)	0,001	6,6	10,24(2,08)	0,001	5,0
<b>Valina</b>	29	69,14(32,93)	0,001	40	43,21(9,45)	0,001	29,2

\*WHO/FAO/UNU, 2007

\*\*Test-T, nivel de significación  $p < 0,05$

La puntuación media estimada del índice QIPD de los participantes del estudio fue de 10,48 (2,20) y la mediana fue de 11 puntos. La puntuación fue alta por su relación con su dieta rica en proteínas.

Como se observa en la Tabla 4.2.4.2, la puntuación QIDP difirió entre los grupos de Normopeso, Sobrepeso y Obesidad con una diferencia significativa ( $p < 0,001$  - ANOVA) entre Normopeso y Sobrepeso u Obesidad, pero no entre Sobrepeso y Obesidad (Test de Bonferroni).

**TABLA 4.2.4.2. ANOVA CON QIDP COMO VARIABLE DEPENDIENTE**

	Media (DE)	F* (p)
<b>Normopeso</b>	11,33 (1,05)	
<b>Sobrepeso</b>	10,17 (2,98)	11,975 (<0,001)
<b>Obesidad</b>	9,05 (3,24)	

	Test de Bonferroni	Diferencia significativa (p)
<b>Normopeso</b>	Sobrepeso	1,159 (0,009)
	Obesidad	2,277 (<0,001)

\*ANOVA; nivel de significación  $p < 0,05$

La Tabla 4.2.4.3 muestra los OR obtenidos por análisis de regresión logística. Se encontró una puntuación QIDP significativamente más alta para el sexo femenino y para los sujetos que tenían hermanos, realizaban actividad física extracurricular, vivían con sus padres u otros miembros de la familia y tenían padres con un nivel de ocupación más alto. Hubo también tendencia a una puntuación del índice más alta en niños con sobrepeso/obesidad.

**TABLA 4.2.4.3. ANÁLISIS DE LA REGRESIÓN LOGÍSTICA DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON UNA PUNTUACIÓN DEL QIDP POR ENCIMA DE LA MEDIA**

Factores	% individuos	B	p*	OR	95% IC para OR	
					Inferior	Superior
Sexo femenino	50,3	0,377	0,276	1,458	0,740	2,875
Tiene hermanos (sí)	87,6	0,937	0,046	2,551	1,005	7,685
IMC (sobrepeso/obesidad)	37,3	-0,278	0,436	0,757	0,377	1,523
Vive con sus padres u otro familiar (sí)	9,9	1,040	0,065	2,830	0,965	9,257
Practica actividad física extraescolar (no)	13,7	-1,019	0,049	0,361	0,131	0,996
Nivel alto de ocupación de los padres (vs. bajo/medio)	26,1	0,735	0,064	2,086	0,927	4,545

\*Nivel de significación  $p < 0,05$

#### **4.2.5. Consumo de azúcares en la dieta escolar e influencia en la prevalencia de obesidad**

La principal causa del sobrepeso y la obesidad infantil es un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. Existe un consumo cada vez más elevado de azúcares, especialmente de bebidas azucaradas (refrescos y zumos) (OMS, 2015). Se ha informado de que los niños que consumen más bebidas de este tipo tienen más probabilidades de tener sobrepeso u obesidad, aunque esto podría atribuirse no sólo a los carbohidratos de estas bebidas, sino también a los lípidos y proteínas que contienen.

El objetivo de este estudio fue determinar si la ingesta de azúcares a través de alimentos y bebidas habitualmente consumidos por los escolares españoles puede estar relacionada con el sobrepeso y la obesidad en esta población.

El análisis de regresión por pasos de la contribución de cada alimento a la ingesta total de nutrientes de los niños mostró que los batidos industriales eran la fuente predominante de carbohidratos totales suponiendo un 60,9% de los azúcares totales, azúcares libres y azúcares añadidos, lo que representa del 74,7% al 82,1% de los azúcares consumidos por los participantes (Tabla 4.2.5.1).

**TABLA 4.2.5.1. ANÁLISIS DE REGRESIÓN POR PASOS DE LA CONTRIBUCIÓN DE CADA ALIMENTO A LA INGESTA TOTAL DE NUTRIENTES DE LOS ESCOLARES**

	R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup>
	<b>Energía (kcal)</b>		<b>Proteínas</b>		<b>Lípidos</b>		<b>Carbohidratos</b>
Batido	0,501	Leche	0,353	Leche	0,336	Batido	0,609
Flan	0,612	Pan	0,523	Flan	0,646	Flan	0,725
Cacao	0,682	Batido	0,676	Batido	0,744	Zumo	0,787
Galletas	0,745	Yogurt	0,787	Queso	0,821	Cereales	0,830
Pan	0,805	Bollería	0,851	Bollería	0,879	Bollería	0,865
Leche	0,845	Galletas	0,885	Yogurt	0,928	Pan	0,901
Bollería	0,885	Ensalada	0,909	Cacao	0,979	Galletas	0,921
Zumo	0,919	Pasta	0,932			Leche	0,948
Yogurt	0,933	Cereales desayuno	0,953			Manzana	0,958
Cereales desayuno	0,950						
	<b>Azúcares totales</b>		<b>Almidón</b>		<b>Azúcares añadidos</b>		<b>Azúcares libres</b>
Batido	0,747	Cereales desayuno	0,336	Batido	0,821	Batido	0,801
Flan	0,843	Pan	0,550	Flan	0,921	Flan	0,902
Zumo	0,911	Galletas	0,748	Zumo	0,979	Zumo	0,979
Manzana	0,932	Bollería	0,845			Refrescos	0,993
Leche	0,945	Arroz	0,908				
Refrescos	0,954	Flan	0,941				
		Batido	0,960				

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de IMC (Tabla 4.2.5.2) y entre los sexos (Tabla 4.2.5.3) en la ingesta de energía, azúcares totales, azúcares añadidos y azúcares libres.

**TABLA 4.2.5.2. ANOVA DE LA INGESTA DE ENERGÍA Y CARBOHIDRATOS Y EL KIDMED EN FUNCIÓN DEL IMC**

	IMC	Media ± DE	p*
<b>Ingesta total de Energía (kcal)</b>	Normopeso	2433,94±701,33	0,020
	Sobrepeso	2429,20±682,22	
	Obesidad	2183,81±677,22	
<b>Carbohidratos (g)</b>	Normopeso	311,16±135,94	0,028
	Sobrepeso	310,08±133,01	
	Obesidad	301,02±125,09	
<b>Almidón (g)</b>	Normopeso	101,70±47,49	0,112
	Sobrepeso	97,47±44,96	
	Obesidad	89,25±50,37	
<b>Azúcares totales (g)</b>	Normopeso	175,92±107,78	0,033
	Sobrepeso	182,32±107,13	
	Obesidad	158,45±96,78	
<b>Azúcares añadidos (g)</b>	Normopeso	109,85±100,29	0,046
	Sobrepeso	119,21±100,21	
	Obesidad	83,90±94,10	
<b>Azúcares libres (g)</b>	Normopeso	114,64±101,39	0,061
	Sobrepeso	122,60±100,29	
	Obesidad	88,70±95,02	
<b>KIDMED</b>	Normopeso	9,00 ±2,07	0,835
	Sobrepeso	8,91 ±2,18	
	Obesidad	8,85 ±2,08	

N normopeso= 392; sobrepeso=170; obesidad= 69

\*ANOVA; nivel de significación p<0,05

**TABLA 4.2.5.3. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LA INGESTA DE ENERGÍA Y CARBOHIDRATOS Y EL KIDMED ENTRE LOS SEXOS**

	Sexo	Media ± DE	p*
<b>Energía (Kcal)</b>	Masculino	2501,05±698,99	0,001
	Femenino	2321,25±685,12	
<b>Carbohidratos (g)</b>	Masculino	309,36±135,89	0,002
	Femenino	276,27±131,67	
<b>Almidón (g)</b>	Masculino	104,91±47,99	0,004
	Femenino	94,18±46,07	
<b>Azúcares (g)</b>	Masculino	201,02±106,16	0,009
	Femenino	178,63±106,57	
<b>Azúcares añadidos (g)</b>	Masculino	121,11±98,76	0,006
	Femenino	99,37±100,02	
<b>Azúcares libres (g)</b>	Masculino	125,87±99,84	0,005
	Femenino	103,43±100,45	
<b>KIDMED</b>	Masculino	8,58±1,85	0,001
	Femenino	9,37±2,21	

N sexo masculino= 295; sexo femenino=335

\*Test-T; nivel de significación p<0,05

El análisis de regresión logística demostró una asociación significativa entre el mantenimiento del Normopeso y la actividad diaria, medida como actividad en 24 horas o actividad deportiva extraescolar, horas caminando a la escuela y entre el Sobrepeso/Obesidad y la ingesta elevada de almidones, azúcares totales, azúcares libres y azúcares añadidos (Tabla 4.2.5.4).

**TABLA 4.2.5.4. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA DETERMINAR LOS FACTORES ASOCIADOS A NORMOPESO/SOBREPESO+OBESIDAD**

Factores	OR	95% IC para OR		p**
		Inferior	Superior	
<b>KIDMED*</b>	1,44	0,73	0,270	2,16
<b>Sexo (Ref. femenino)</b>	1,33	0,74	0,160	1,91
<b>Energía (Kcal)*</b>	1,64	0,97	0,147	3,21
<b>Carbohidratos*</b>	2,61	1,15	0,250	4,06
<b>Almidón*</b>	0,45	0,27	0,002	0,75
<b>Azúcares totales*</b>	0,58	0,8	0,050	1,97
<b>Azúcares añadidos*</b>	1,11	0,88	0,040	2,78
<b>Azúcares libres*</b>	1,10	0,88	0,040	1,37
<b>Horas desplazamiento andando al colegio*</b>	1,63	1,04	0,032	2,49
<b>Deportes/día (METs)*</b>	1,72	1,12	0,010	2,32
<b>Actividades sedentarias/día (METs)*</b>	3,03	1,59	0,001	5,77
<b>Total actividades/día (METs)*</b>	8,31	4,28	0,001	16,10

Categoría de referencia: sobrepeso + obesidad

\*Referencia > mediana

\*\*Nivel de significación p<0,05

Además de la composición corporal e ingesta energética de la población consideramos importante la evaluación de la composición de la dieta. En este trabajo se ha valorado la presencia de alimentos energéticos como azúcares y proteínas y de otros componentes: 1) de origen natural en los alimentos como los fitoestrógenos (de los que sabemos que se traducen en mensajes hormonales según la edad de los sujetos) y 2) contaminantes no deseados y de comportamiento biológico próximo a los fitoestrógenos. Es el caso del Bisfenol A, clasificado internacionalmente como disruptor endocrino, que proviene potencialmente de los envases que se encuentran en contacto con alimentos o formando parte de los composites dentales y los selladores a los que en ocasiones se somete a la población escolar.

Por todo ello, se han desarrollado los siguientes capítulos de la tesis.

### **4.3. Valoración del efecto estrogénico de los fitoestrógenos en la dieta escolar**

Como ya se explicó en el Apartado 4.1.9. *Estimación de fitoestrógenos en la dieta escolar*, el presente estudio describe la técnica para valorar el efecto estrogénico de la dieta en función de su contenido en isoflavonas y BPA, estimando la exposición alimentaria de niños españoles de 7 a 10 años a fitoestrógenos y BPA y evaluar sus posibles efectos obesogénicos.

Se aplicó la prueba E-Screen para establecer la estrogenicidad de los disruptores endocrinos. Los objetivos del estudio fueron estimar la exposición alimentaria de niños españoles de 7 a 10 años a fitoestrógenos y BPA y evaluar sus posibles efectos obesogénicos.

La clasificación de la población según su IMC como Normopeso, Sobrepeso u Obesidad permite analizar esa la influencia en el estatus ponderal de la exposición dietética a fitoestrógenos y BPA.

Con base en los valores mostrados en Material y Métodos en la Tabla 4.1.9.2, se estimó el efecto proliferativo (PE) de cada disruptor endocrino en función de su ingesta.

La Tabla 4.3.1 muestra los datos sobre el cálculo posterior del efecto proliferativo (EP) y, por tanto, el efecto estrogénico de los productos estudiados, y expresa en  $\mu\text{M}$  la cantidad de fitoestrógenos y BPA que generan esta respuesta estrogénica. La tabla también resume el EP total correspondiente a la exposición en la dieta a fitoestrógenos y BPA. Se expresa como equivalentes de estradiol (Eq E2), con una media de  $5,10^{-12}$  M, que representa el valor

estimado de la estrogenicidad a la que esta población está expuesta diariamente a partir de su dieta habitual. Cuando el EP total estimado se consideró como una variable continua, difirió significativamente entre niños con peso normal y niños obesos ( $p = 0,05$ , prueba U de Mann-Whitney no paramétrica).

**TABLA 4.3.1. EFECTO PROLIFERATIVO (EP) DE CADA FITOESTRÓGENO Y DEL BPA ESTIMADO A PARTIR DE LA INGESTA DE CADA COMPUESTO**

Fitoestrógeno		Mínimo	Mediana	Máximo	Media	DE
<b>Daidzeína</b>	$\mu\text{M}$	0,000	0,012	0,052	0,017	0,012
	EP	0,000	0,007	0,032	0,010	0,007
<b>Genisteína</b>	$\mu\text{M}$	0,000	0,041	0,128	0,040	0,021
	EP	0,000	0,027	0,083	0,026	0,014
<b>Formononetina</b>	$\mu\text{M}$	0,000	0,098	0,233	0,010	0,065
	EP	0,000	0,053	0,126	0,059	0,035
<b>Biocanina A</b>	$\mu\text{M}$	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000
	EP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Cumestrol</b>	$\mu\text{M}$	0,000	0,002	0,004	0,002	0,001
	EP	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000
<b>Matairesinol</b>	$\mu\text{M}$	0,002	0,025	0,047	0,025	0,008
	EP	0,000	0,004	0,008	0,004	0,001
<b>Enterolactona</b>	$\mu\text{M}$	0,014	1,030	2,547	1,056	0,445
	EP	0,002	0,124	0,306	0,127	0,053
<b>Enterodiol</b>	$\mu\text{M}$	0,002	0,558	1,458	0,561	0,270
	EP	0,000	0,067	0,175	0,067	0,032
<b>BPA de envases</b>	$\mu\text{M}$	0,000	0,006	0,012	0,007	0,003
	EP	0,000	0,004	0,008	0,005	0,002
<b>Total EP</b>		0,008	0,298	0,660	0,299	0,119
<b>Total Eq E2</b>					5,10 <sup>-12</sup> M	

La clasificación de la población según su IMC como Normopeso, Sobrepeso u Obesidad permite analizar la influencia en el estado ponderal de su exposición alimentaria a fitoestrógenos y BPA. Se examinó el gasto energético derivado de su actividad diaria, a partir de los resultados de un cuestionario sobre actividad física durante un período de 24 h. La Tabla 4.3.2 analiza los valores MET para horas de Educación Física y de deportes y horas sedentarias al día junto con el efecto proliferativo (PE) total. Muestra que el PE influyó en la obesidad de la población, mientras que las otras variables ejercieron un efecto protector frente a esta condición. En esta muestra de niños, la probabilidad de normopeso versus obesidad se relacionó significativamente con el EP total observado ( $OR = 0,51$ ,  $p = 0,026$ ) y con el gasto energético de la actividad física, ya que con una actividad menor se aumenta el riesgo de obesidad ( $OR = 13,54$ ,  $p = 0,001$ ).

**TABLA 4.3.2. FACTORES QUE PERMITEN PREDECIR EL NORMOPESO O LA OBESIDAD EN LOS ESCOLARES EN FUNCIÓN DE LA EXPOSICIÓN A FITOESTRÓGENOS**

Factores	B	p***	OR	95 % IC para OR	
				Inferior	Superior
Efecto proliferativo total*	-0,683	0,026	0,505	0,277	0,921
Horas de Educación física**	0,331	0,122	1,393	0,818	2,371
Deportes/día MET**	0,712	0,050	2,038	0,827	5,027
MET actividad sedentaria/día**	2,606	0,001	13,538	6,389	28,688

\*Ref > mediana

\*\*Ref < mediana

\*\*\*Nivel de significación p<0,05

Estos resultados han permitido la redacción del artículo recogido en el apartado Anexo.

#### **4.4. Análisis de la exposición a BPA y relación con sobrepeso y obesidad en escolares**

El objetivo de este estudio fue examinar la influencia de la exposición al BPA y la actividad física diaria sobre el riesgo de obesidad en escolares del sur de España.

En la población de estudio se ha analizado la exposición de los sujetos a BPA analizando la saliva (Apartado 4.1.10.1) y se han estudiado, además, características antropométricas, hábitos de consumo de alimentos y alimentos envasados en material polimérico.

De acuerdo con estos factores ya descritos en resultados, se resumen las variables en la tabla siguiente (Tabla 4.4.1):

**TABLA 4.4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN**

	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media ± DE</b>
<b>Edad (años)</b>	7,00	10,00	9,02 ±0,97
<b>Peso (Kg)</b>	17,85	72,30	35,06±8,90
<b>Altura (m)</b>	1,12	1,69	1,36±0,08
<b>IMC (m/Kg<sup>2</sup>)</b>	14,24	31,88	18,74±3,17
<b>Circunferencia cintura (cm)</b>	43,5	104,00	63,56±8,50
<b>ICT</b>	0,36	0,73	0,47±0,05
<b>Composición grasa* (% Grasa)</b>	11,11	49,86	24,21±5,53
<b>Horas durmiendo</b>	7,5	14,00	8,46±1,08
<b>MET durmiendo (Kcal/peso/noche)</b>	166,4	815,76	354,16±25,26
<b>Horas desplazamiento andando al colegio</b>	0,00	0,50 (30´)	0,24 (15´)±0,25
<b>MET Kcal desplazamiento andando al colegio/peso</b>	0,00	96,28	24,73±27,43
<b>Horas de Educación Física</b>	0,00	7,00	1,88±0,55
<b>MET Educación Física (Kcal/peso)</b>	0,00	988,61	192,03±78,39
<b>Horas de actividad física</b>	0,00	17,79	10,89±1,47
<b>Actividad moderada hasta 24 h</b>	6,21	16,00	13,10±1,35
<b>MET actividad sedentaria/día/peso</b>	262,40	1290,10	643,81±180,13
<b>MET total 24h (Kcal/día)</b>	588,16	2673,65	1215,01±316,75
<b>Ingesta (Kcal/día)</b>	602,5	3016,40	1282,73±392,95
<b>Nº tratamientos composites/selladores</b>	0,00	8,00	1,68±2,12
	<b>Porcentaje</b>	<b>p***</b>	
<b>Sujetos con composites/selladores</b>	54,7	0,045	
<b>Sujetos expuestos a diferentes fuentes de BPA</b>	68,5	< 0,001	
<b>Sujetos en cada categoría del IMC</b>	Normopeso	62,3	
	Sobrepeso	26,8	<0,001
	Obesidad	10,9	

\*%G calculado como  $106,50 \times \text{WHI} - 28,36$  para los niños y  $89,73 \times \text{WHI} - 15,40$  para las niñas (Marrodán et al, 2013).

\*\* Valores MET para diferentes grados de actividad basados en los valores propuestos por Harrell et al. (2005), Torun (2005) y Ridley et al. (2008).

\*\*\*nivel de significación  $p < 0,05$

Tras analizar las características de la población del estudio que pueden estar relacionadas con el estado ponderal, se obtuvo una OR estadísticamente significativa para el normopeso, el gasto energético en diversas actividades, como desplazamiento andando a la escuela, actividad física extracurricular e ingesta de energía en la dieta diaria, mientras que se observó una tendencia hacia una mayor probabilidad de desarrollar obesidad para la exposición al BPA en general y para la exposición oral al BPA de composites y selladores (exposición frente a no exposición) en particular, como se muestra en la Tabla 4.4.2.

**TABLA 4.4.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA DETERMINAR FACTORES ASOCIADOS CON NORMOPESO/SOBREPESO**

Normopeso/Sobrepeso Categoría de referencia: Sobrepeso	B	OR (95 % IC)	p*
<b>Sexo masculino</b> Ref. sexo femenino	-0,229	1,008 (0,733, 1,387)	0,431
<b>% Grasa (23,99)</b> Ref > mediana	2,933	10,770 (5,89, 19,70)	0,001
<b>Andando al colegio &lt; 30 min/día</b> Ref > 30 min/día	0,324	1,382 (1,005, 1,902)	0,047
<b>Actividad deportiva diaria &lt; MET (46,2 MET)</b> Ref. > MET	-0,218	1,614 (1,171, 2,223)	0,003
<b>&lt; MET actividad sedentaria/día</b> Ref > actividad sedentaria/día	0,619	12,713 (8,487, 19,041)	<0,001
<b>MET 24h &lt; mediana</b> Ref. MET 24h > mediana	2,289	8,911 (4,738, 16,758)	0,001
<b>Ingesta estimada de Kcal/día &lt; mediana (1887,35)</b> Ref > mediana	0,529	1,696 (0,948, 3,035)	0,075
<b>No exposición a BPA</b> Ref. exposición	-0,393	1,381 (0,938, 1,763)	0,058
<b>BPA en saliva &lt; mediana (21,52 ng/mL BPA)</b> Ref. > mediana	-0,596	0,873 (0,632, 1,207)	0,081

\*Prueba de Chi<sup>2</sup>, Nivel de significación p<0,05



# **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

La hipótesis planteada al inicio de este trabajo trata de establecer la posible relación entre estilo de vida, alimentación y exposición a disruptores hormonales y obesidad infantil. Por ello se eligió a población escolar de 15 centros educativos del sur de España (Granada y Málaga).

El número de participantes incluidos en este estudio ha sido de 657 de una muestra inicial de 700 sujetos los cuales formaron parte de otros proyectos de investigación en los que ha participado el grupo de investigación Evaluación de Nutrición, Dieta y Riesgos: AGR-255.

El rango de edad elegido fue de 7 a 10 años (incluidos) siguiendo las recomendaciones nacionales e internacionales consideradas en función del desarrollo fisiológico de las distintas etapas de la vida y de los requerimientos nutricionales (Cuervo et al, 2009; DRIs, 2005). Ambos sexos contribuyeron de manera similar al estudio (53,5% mujeres y 46,5% hombres).

La mayoría de estos niños conviven con sus padres (91,9%), tienen un único hermano (54,9%) y el nivel ocupacional de los padres es alto (55,61%). Por lo tanto, se puede afirmar teniendo en cuenta los resultados de esta Tesis que, a más nivel cultural de los padres, mejor estado nutricional.

Se valoraron distintas **variables antropométricas** para determinar su relación e influencia en el estado nutricional de los escolares.

El IMC es una razón matemática que asocia el peso y la talla de un individuo. Los rangos de IMC establecidos están relacionados con la adiposidad y se basan en el efecto que tiene el acúmulo excesivo de grasa sobre diversas enfermedades (OMS, 2000). Para la clasificación de la población escolar según el IMC se han tenido en cuenta los puntos de corte aceptados para esas edades (Cole et al, 2000, 2007 y 2012), establecidos en función de la edad y el sexo de los sujetos hasta los 18 años.

Los resultados de nuestro estudio muestran que la mediana del IMC (18,22 varones y 18,36 mujeres) y del ICT (0,47 varones y 0,46 mujeres) se mantiene en normopeso para ambos sexos. Es el sexo femenino el que muestra valores superiores en la composición grasa (%G).

La relación entre el peso y la altura no es constante durante el periodo de crecimiento, por lo que los rangos de IMC establecidos para adultos no son válidos para la población infanto-juvenil. Por esta razón, Marrodán et al. (2011 y 2013) establecieron unos puntos

de corte distintos a través del índice de cintura/talla (ICT), pudiéndose así determinar cada categoría nutricional en la edad pediátrica con mayor precisión. De este modo, establecieron que el corte para el sobrepeso está en  $> 0,48$  en niños y  $> 0,47$  en niñas. Otros autores han propuesto un valor ICT de 0,50 como punto de corte entre adultos normales y con sobrepeso, lo que indica un mayor riesgo de obesidad y síndrome metabólico, aunque otros han optado por un valor de 0,55 (Rodríguez-Pérez et al, 2010). Numerosos autores han utilizado el valor de 0,50 para diferenciar entre la presencia y la ausencia de obesidad central en poblaciones pediátricas y adolescentes; sin embargo, no hay consenso sobre su aplicabilidad en estos grupos de edad (Maffeis et al, 2010; Santomauro et al, 2017). Según Cole et al. (2000) el IMC es fundamental para la clasificación por peso, con un único punto de corte para los adultos, pero con diferentes puntos para cada intervalo de seis meses para menores de 18 años. En este estudio el 10,9% de los escolares eran obesos según la clasificación basada en el IMC de Cole (Rivas et al, 2016). Según estimaciones de la OCDE (2017), el 21% de los españoles será obeso en 2030, de los cuales el 16,5% de los niños españoles tendrá sobrepeso u obesidad.

En comparación con el límite de 0,50 del ICT utilizado para adultos, el límite de 0,48 resultó tener un mejor ajuste para los niños de 7 a 10 años (Ashwell et al, 1996 y 2005). Un valor de corte del ICT de 0,48 entre el normopeso y el sobrepeso mostró una mayor concordancia con la clasificación del IMC de estas edades, en nuestra muestra de 657 niños. Utilizando la clasificación por edad en la población española y europea en general (Li et al, 2006; Khoury et al, 2013), determinamos el punto de corte del ICT que mejor se ajustaba a nuestra población de estudio.

El crecimiento de los niños es continuo y sostenido durante este período (FAO/WHO/UNU, 2001), lo que facilita la investigación de los factores que influyen en el peso infantil, antes de que surjan diferencias entre los sexos con la pubertad (Wells, 2007).

Hay pocos datos disponibles sobre las mediciones de la circunferencia de la cintura en poblaciones pediátricas, pero se han correlacionado significativamente con el IMC y el %G (Santomauro et al, 2017; Hopper et al, 2017). La circunferencia de la cintura varía naturalmente durante la infancia debido al crecimiento, pero la relación cintura/estatura se mantiene estable (Ramírez-Vélez et al, 2017), lo que permite su utilización sin necesidad de aplicar valores de referencia para cada medio año de vida, como es el caso del IMC (Cole et al, 2002). En principio, por lo tanto, puede ser posible establecer un valor de corte del ICT que sirva para todos los grupos de edad. En la población actual de niños de 7 a 10 años, la concordancia más cercana con la clasificación del IMC se obtuvo cuando se aplicó un valor de corte del ICT de 0,48.

El punto de corte del ICT de 0,48 fue influenciado significativamente por el IMC, el %G y las horas de sueño. Aunque no se alcanzó significación para el sexo, el grupo de edad (6-7 años y 8-9 años), presencia/ausencia de hermanos, o la práctica/no práctica de actividad extraescolar, la combinación de todas estas variables explicó el 89,5% de la selección de corte.

La composición corporal está relacionada con los hábitos nutricionales y la ingesta de nutrientes, y la relación estadísticamente significativa entre el IMC y la dieta está bien documentada. Los hábitos de alimentación saludables y de actividad física previenen la aparición de muchas de las enfermedades crónicas como la obesidad, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y/o determinados tipos de cáncer (OMS, 2003). En este sentido, la epidemiología nutricional juega un papel fundamental aportando evidencia científica para entender el papel de la nutrición sobre las causas y la prevención de estas enfermedades (Serra-Majem et al, 2005).

El estudio de hábitos dietéticos en epidemiología nutricional pasa por el uso de encuestas alimentarias como el FFQ y el R24h, herramientas útiles para estimar la ingesta de energía y nutrientes de la población, previa validación (Willett, 1990). En esta Tesis Doctoral se ha validado el cuestionario FFQ y el R24h para el conjunto de la población estudiada (Rivas et al, 2009; Mariscal-Arcas et al, 2010 y 2011) a través del test Bland-Altman, el test de Wilcoxon y la correlación intraclase, mostrando la concordancia de los resultados. Por ello, los resultados obtenidos en cuanto a la estimación de la ingesta de energía y nutrientes son totalmente útiles para orientar la toma de decisiones en cuanto a la prevención de enfermedades relacionadas con la nutrición (Serra-Majem et al, 2005).

En numerosos estudios se ha propuesto que la adherencia a la Dieta Mediterránea puede proteger contra el sobrepeso (Hassapidou et al, 2017; Velázquez-López et al, 2014). En nuestro estudio exploramos este tema empleando el índice KIDMED basado en los resultados del cuestionario FFQ relativo al año anterior. La puntuación media del índice de la población de estudio fue de 8,96 (DE 2,12) de un máximo de 12 puntos, lo que indica un alto nivel de cumplimiento de la DM y, por tanto, buena adherencia y calidad de la DM.

En cuanto a los **hábitos de alimentación** de estos escolares se observaron diferencias de género en algunos de ellos, como que hubo un consumo más frecuente de bollería industrial y dulces/golosinas por parte de los niños. Todas las variables estudiadas y expuestas en la Tabla 4.1.5.1 presentaron diferencias significativas, destacando el consumo de fruta, leche y cereales/derivados en el desayuno, siendo la media mañana el momento elegido para consumir otra pieza de fruta, y la casa familiar, el sitio donde se realiza el almuerzo, seguido del comedor escolar. En cuanto al consumo de refrescos, un 46,3% lo

hace de 1 a 3 veces por semana. La fruta más consumida por los escolares estudiados es la manzana (78,3%), seguida del plátano (71,3%). La mayoría de población estudiada consume los alimentos no recomendados 1-3 veces/semana.

La adecuación de la dieta viene determinada por el aporte de nutrientes esenciales para mantener un grado óptimo de salud en los individuos. Para ello disponemos de las ingestas dietéticas de referencia (DRIs) que cubren la variabilidad en las necesidades de energía y nutrientes para la mayor parte de la población. Estas DRIs aseguran que el 95% de la población tenga cubiertas sus necesidades, aunque a veces esto implica que las recomendaciones para algunos sujetos estén por encima de lo que realmente necesitan (Cuervo et al, 2009; Hernández-Elizondo et al, 2009). Para determinar estos valores de referencia se tienen en cuenta factores como el sexo, la edad, el nivel de actividad física y determinadas situaciones fisiológicas.

Los datos provienen de la información recabada en el FFQ y en el R24h, pero sobre todo del primero, ya que este cuestionario aporta una información global de la ingesta en un periodo amplio de tiempo (último año) integrando las variaciones intrasemanales y estacionales (Gorgojo-Jiménez et al, 2005). Los macronutrientes analizados en el R24h tienen valores muy inferiores a los recomendados y casi todos los micronutrientes no se ajustan a la recomendación de las DRIs. Esto es debido a que en el R24h hay una tendencia a infravalorar lo que se consume en un día, bien por olvido o bien porque no se ajusta a las medidas caseras propuestas.

Observamos que los micronutrientes analizados en el FFQ se adaptan a las recomendaciones de las DRIs, salvo en el caso del Zinc, Niacina, Vit. D y Vit. E, que quedan por debajo del 100%, y del Sodio, que presenta valores dos veces por encima de la recomendación. Es importante destacar el caso de la Vitamina D, cuyo consumo es de solamente un 22% de la recomendación de las DRIs. Esto puede deberse, bien a errores en las tablas de composición de los alimentos, o bien a que las ingestas recomendadas alcanzan valores que quizá no pueden ser administrados sólo con la dieta en algunas etapas de la vida. Los alimentos que principalmente contribuyen al aporte de esta vitamina a la dieta son los cereales de desayuno (50,5%), huevos, bollería industrial y precocinados. El aporte de Sodio a la dieta de estos escolares es elevado, siendo recomendable moderar su consumo, sobre todo en su forma “oculta”, en alimentos precocinados y similares.

La ingesta de **energía** debe ser la adecuada según la edad, actividad física y tasa metabólica basal, ya que si es menor de las necesidades puede ocasionar un retraso en la

maduración y crecimiento en población infantil-juvenil y pérdida de peso en población adulta, mientras que si es excesiva se acumula en forma de grasa aumentando el riesgo de obesidad (OMS, 2003). En nuestra población la mediana de la ingesta de energía es de 2216,05 Kcal, cifra que se adapta a las recomendaciones para este grupo de edad dictadas por la FAO/OMS/UNU (2001).

Los porcentajes de macronutrientes estimados a partir del FFQ se adaptan a las recomendaciones de consumo (SENC, 2011) de carbohidratos (61,80%), proteínas (15,07%) y **lípidos** (27,10%). Según la regresión por pasos desarrollada en la Tabla 4.1.6.6, los alimentos que más contribuyen en la ingesta de los lípidos de la dieta de estos niños son el aceite de oliva (34,8%) y la leche (10%), pero el resto son embutidos, hamburguesas, queso, bollería industrial, precocinados. Es decir, alimentos muy energéticos, pero con escasa calidad de nutrientes y gran aporte de grasas saturadas, féculas y azúcares y sodio.

En cuanto a la ingesta de **proteínas** se desarrolló y probó un índice para medir la calidad de la proteína dietética (QIDP) en escolares de entre 7 y 10 años, basado en el requerimiento promedio de aminoácidos (mg/kg peso corporal/día) para estas edades (EFSA, 2012). La puntuación QIDP media para la población de estudio fue 10,48 (DE 2,20) de 12 puntos, lo que indica una alta calidad de la ingesta de proteínas. Finalmente, se observaron asociaciones de interés entre la puntuación QIDP y las características de la población de estudio, encontrando una puntuación más alta en las mujeres. Otros factores que parecen influir en la puntuación del QIDP son la presencia de hermanos, la participación en actividades físicas extracurriculares, vivir con los padres/ otro familiar y tener algún padre con un nivel ocupacional mayor.

La población de estudio tiene las características típicas de los niños de los países desarrollados: con un alto nivel de consumo de proteínas. Así, se encontró que la ingesta proteica de los niños españoles de Navarra (edad media de 10,5 años) representaba el 20,3% de su consumo energético (Durá-Travé et al, 2014), mientras que otro estudio que utilizó tres cuestionarios R24h encontró que la ingesta proteica de los niños pequeños europeos (de 2 a 9 años de edad) (Börnhorst et al, 2014) representaron el 15,9% (4,8) de su ingesta energética. La EFSA calculó que la ingesta media en Europa osciló entre  $\geq 3$  g/kg peso corporal/día en los grupos de edad más jóvenes y alrededor de 1,2-2,0 g/kg peso corporal/día en el grupo de 10-18 años (EFSA, 2012). Un estudio reciente confirmó que la ingesta de proteínas es generalmente elevada en los niños en edad preescolar del Mediterráneo europeo (Pereira da Silva et al, 2016). Por el contrario, se ha informado que las proteínas y los aminoácidos esenciales son con frecuencia deficientes en los niños pequeños en los países en desarrollo, con un impacto potencialmente adverso en el

crecimiento infantil (Semba et al, 2016), y un estudio en África Occidental confirmó la prevalencia de la deficiencia de proteínas en los niños de la escuela primaria (Fiorentino et al, 2016).

Elango et al. (2011), utilizaron el método de oxidación del aminoácido limitante y recomendaron una ingesta diaria de proteínas de 1,33-1,55 g/kg/día para los niños en edad escolar, valor inferior a las directrices de la OMS de 2007. Las recomendaciones nutricionales nórdicas siguieron el enfoque de Dewey et al. (1996) y recomendaron una ingesta de 0,9 g/kg peso/día para el grupo de edad de 2 a 17 años, de acuerdo con otras recomendaciones (IoM, 2005; D-A-CH, 2008). El Consejo de Salud de los Países Bajos (2001) utilizó un método factorial derivado de experimentos de balance de nitrógeno para estimar los requerimientos de proteínas para niños de 1 a 13 años en 0,9 g/kg de peso corporal/día.

La falta de claridad en las recomendaciones impulsó nuestro desarrollo del QIDP, que considera la ingesta total de proteínas, la energía que se debe suministrar en la dieta a partir de las proteínas y los aminoácidos esenciales que deben contener. Como ya se señaló, la falta de datos sobre la tolerancia de los aminoácidos de la dieta significa que solo se ha propuesto un UL para dos aminoácidos: alrededor de 500 mg/kg/día de leucina para adultos sanos y 8-10 g/día de triptófano, aunque estos límites siguen siendo controvertidos (Kimura et al, 2012; Ramusen et al, 2016).

También se observó una asociación límite entre QIDP y sobrepeso/obesidad. Un estudio informó de una relación entre un alto suministro de proteína en la dieta durante los primeros dos años de vida y un IMC más alto y niveles de tejido adiposo a la edad de siete años (Gunther et al, 2007), y este hallazgo fue corroborado en un estudio de cohorte prospectivo de gemelos (Pimpin et al, 2016).

Se estimó la ingesta de **carbohidratos**, así como la ingesta de las formas principales en que se presentan en los alimentos (carbohidratos totales, almidón, azúcares totales, azúcares libres y azúcares añadidos) a partir de los resultados de FFQ y se utilizó un análisis de regresión por pasos para estimar la contribución de diferentes alimentos a la ingesta de cada carbohidrato estudiado. La probabilidad de sobrepeso/obesidad se asoció con un mayor consumo diario de energía, azúcares totales, almidón, azúcares añadidos y azúcares libres, cuya reducción es ampliamente recomendada para lograr el control de peso. La OMS ha señalado que los programas nutricionales tienen una "doble función", no solo para reducir las tasas de obesidad, sino también para abordar los riesgos de desnutrición planteados por un cambio cada vez mayor de las dietas locales tradicionales hacia una dieta occidental, generalmente más alta en grasas, sal y azúcares y menor

densidad nutricional (Batal et al, 2018). En la población actual de escolares, la probabilidad de tener normopeso fue significativamente mayor con menor gasto energético en actividades sedentarias, mayor gasto energético en actividades deportivas y mayor actividad total/día medida en MET.

El objetivo de este estudio fue determinar si la ingesta por parte de los escolares españoles de los azúcares de los alimentos y bebidas que se consumen habitualmente se puede relacionar con sobrepeso y obesidad en esta población. Los alimentos azucarados y procesados más comunes incluyen productos altamente procesados (por ejemplo, comidas rápidas y bocadillos), que tienden a ser bajos en nutrientes (vitaminas, minerales y antioxidantes) y altos en calorías vacías debido al contenido de harinas refinadas, sodio y azúcar.

Se ha informado previamente que el consumo de bebidas azucaradas contribuye al desarrollo de sobrepeso en los niños (van de Gaar et al, 2017). La ingesta de batidos de producción industrial por la población en estudio, fue la que más contribuyó a la ingesta de azúcares en la población actual, representando el 60,9% de los carbohidratos, el 74,7% de los azúcares totales, el 82,1% de los azúcares añadidos y el 80,1% de los azúcares libres en su dieta. Un hallazgo de especial preocupación es el consumo muy frecuente de estas bebidas en lugar de frutas o zumos naturales en las colaciones de media mañana y tarde (merienda) de los niños.

En 2015, el Consejo Ejecutivo de la OMS recomendó educar a niños, padres y maestros sobre la importancia de consumir alimentos saludables y reducir la ingesta de azúcares y grasas; también propuso la promoción del ejercicio físico y la reducción del sedentarismo (OMS, 2016). Un amplio estudio de escolares mexicanos mostró que solo una pequeña proporción de ellos consumía tentempiés saludables en la escuela y pidió mayores esfuerzos por parte de las autoridades educativas para promover conductas nutricionales saludables y reducir la obesidad infantil (Pérez-Ferrer et al, 2018). Se requieren políticas para reducir la ingesta innecesaria de azúcar por parte de bebés, niños y adolescentes, utilizando medidas fiscales y de otro tipo (Danielzik et al, 2007; Backholer et al, 2016; Redondo et al, 2018; Hageaars et al, 2019). Se debe establecer un enfoque saludable para el consumo de bebidas y alimentos azucarados durante la infancia para prevenir efectos negativos sobre la salud en etapas posteriores de la vida (Keller et al, 2015). Los productos se promocionan utilizando una amplia gama de técnicas para llegar a los niños a través de la televisión e Internet, así como en las escuelas, supermercados y otros entornos, y se sabe que la publicidad televisiva influye en las preferencias y patrones dietéticos de bebés y niños (OMS, 2010).

Las escuelas pueden desempeñar un papel clave en las campañas para reducir el consumo excesivo de alimentos azucarados y procesados. El ejemplo está en un programa en el que se entregaron a los escolares malteses botellas de agua en lugar de refrescos logrando una importante reducción de la ingesta energética media a las 12 semanas (Copperstone et al, 2019) Los alimentos azucarados y procesados más comunes incluyen artículos altamente procesados (por ejemplo, comidas rápidas y bocadillos), que tienden a ser bajos en nutrientes (vitaminas, minerales y antioxidantes) y altos en calorías vacías debido al contenido de harinas refinadas, sodio y azúcar.

Los investigadores han destacado los efectos negativos para los niños y adolescentes de una dieta mal equilibrada y actividades sedentarias, incluido el tiempo que pasan inactivos ante una pantalla. Los presentes hallazgos sobre la relación de la obesidad con la actividad del gasto energético son consistentes con una fuerte evidencia de una asociación entre el tiempo frente a la pantalla y la obesidad/adiposidad y evidencia moderada de una asociación entre el tiempo frente a la pantalla y una mayor ingesta de energía (Stiglic et al, 2019). De hecho, conviene prestar especial atención al aumento de la actividad física en la población del presente estudio, cuya ingesta de azúcar parece tener un impacto menor, probablemente atribuible a la influencia de la dieta mediterránea tradicional en nuestro medio. Estudios de adolescentes han sugerido que desplazarse a la escuela a pie o en bicicleta reduce su grasa corporal y es una forma de mejorar la actividad física general de este grupo de edad (Landsberg et al, 2008).

Sigue habiendo algunas dificultades en la definición de dulces, tentempiés y alimentos que se sirven en las comidas principales. Por ejemplo, investigadores de los EE.UU. informaron sobre problemas con la categorización de postres como galletas o helados, que fueron clasificados como dulces por algunos niños y tentempiés por otros (Adams et al, 2017). Sigue existiendo la necesidad de establecer un consenso sobre los términos y definiciones relacionados con los azúcares y las bebidas azucaradas, como lo propuso recientemente la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas (Fidler Mis et al, 2018).

Se sabe que la actividad física inadecuada y la ingesta calórica excesiva son factores clave en el sobrepeso y obesidad. En nuestro estudio hemos analizado la **actividad deportiva y la actividad total** de este grupo de escolares y se ha examinado su influencia en el control del peso. La realización de ninguna actividad deportiva extracurricular fue reportada por el 27,4% de los niños, encontrando que un porcentaje leve pero significativamente mayor de niñas que de niños no realiza deportes extracurriculares a pesar de la amplia gama de actividades deportivas posibles, clasificadas en dos grupos:

Deporte individual y Deporte de equipo como se muestra en la lista de la Tabla 4.2.3.2. Los deportes de equipo son los elegidos por ambos sexos. Entre estos últimos, el fútbol fue practicado por un porcentaje significativamente mayor de niños que de niñas, reportado por el 36,9% de los escolares. Los resultados del análisis de Bland-Altman revelaron concordancia entre la ingesta energética de la dieta y los valores de gasto energético (MET Kcal/día). También encontramos una probabilidad significativamente mayor de tener normopeso con la práctica deportiva diaria (OR = 1,686), el gasto energético en actividades sedentarias (OR = 5,108) y el gasto energético total al día (OR = 3,686). Según estos datos, la realización regular de actividades deportivas protege a los escolares de esta edad frente al sobrepeso/obesidad en los escolares estudiados.

En un estudio se examinaron 525 niños de entre 8 y 18 años que asistieron a la Feria Alimentaria de Bruselas o al Día de la Ciencia de Bélgica. La edad media de todos los participantes fue de 11,2 años (IC 95%: 8,7-13,7), la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue del 16,3% y 5,4%, respectivamente. Para todos los participantes en el grupo representativo la afiliación a un club deportivo se asoció con un normopeso ( $p < 0,05$ ). Según este estudio, el tipo de desplazamiento a la escuela (a pie/bicicleta o automóvil/autobús) no tuvo ningún efecto en su índice de masa corporal (IMC). La afiliación a un club deportivo se relacionó significativamente con normopeso y una menor prevalencia de sobrepeso y obesidad (Faik et al, 2017). Una propuesta interesante es que padres e hijos se involucren juntos en programas para reducir la ingesta energética y aumentar la actividad física como método para controlar el peso de sus hijos (Boutelle et al, 2017). Los estudios observacionales han asociado un mayor grado de actividad física estructurada con una mayor reducción en la ingesta diaria de energía de los adolescentes obesos (Schwartz et al, 2017). No se observó asociación con el normopeso o el sobrepeso/obesidad para los otros factores considerados en nuestro estudio, incluida la ingesta de macronutrientes o el tipo de deporte extracurricular realizado durante el año anterior (a partir del recuerdo de actividad de 24 horas).

Nuestro estudio, además, describe una técnica para estimar el **efecto estrogénico de la dieta** en función de su contenido en isoflavonas. Para ello se empleó el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ) para recopilar datos sobre la ingesta dietética de fitoestrógenos y de BPA de los alimentos envasados, y se aplicó la prueba E-screen para establecer la estrogénicidad de los disruptores endocrinos consumidos. Los objetivos del estudio fueron estimar la exposición alimentaria de niños españoles de 7 a 10 años a fitoestrógenos y BPA y evaluar sus posibles efectos obesogénicos.

Se estimó que la dieta de esta población de niños españoles sanos tenía una capacidad estrogénica total media de  $5,10^{-12}$  Meq E<sub>2</sub>/día (5 pmol/día). La carga estrogénica media por la ingesta dietética de isoflavonas fue elevada y equivalente a la capacidad hormonal de los propios individuos, que producen entre 0,3 y 597,14 pmol/día según su edad y otros factores (Stricker et al, 2006; Webster, 2006). Los efectos de esta carga adicional son muy controvertidos y algunos autores consideran positiva la exposición a fitoestrógenos en determinadas etapas de la vida (p.e. menopausia), pero otros la consideran un riesgo a cualquier edad (Velentzis et al, 2008; Patisaul et al, 2010). Muchos fitoestrógenos se consideran disruptores endocrinos y, por tanto, pueden tener un impacto potencialmente adverso en la salud (Frankenfeld, 2013; Xu et al, 2015; Testa et al, 2018). En los últimos años, la exposición a disruptores endocrinos se ha asociado con el envasado polimérico de los alimentos y con los fitoestrógenos que contienen. La relación entre la exposición y los efectos negativos o positivos es probablemente compleja y puede depender de la edad, el estado de salud e incluso la presencia o ausencia de una microbiota intestinal específica (Atkinson et al, 2005; Larrosa et al, 2006; Sklenickova et al, 2010; Kolátorová et al, 2018). Los fitoestrógenos están presentes en numerosas verduras que se consumen diariamente (Boker et al, 2002), como se confirma en los resultados del FFQ.

Los efectos de los disruptores endocrinos en bebés y niños no se han esclarecido y no se ha demostrado definitivamente que las isoflavonas u otros estrógenos sintéticos (por ejemplo, BPA) ejerzan efectos obesogénicos; sin embargo, existe una considerable evidencia científica que apunta en esta dirección (Wolff et al, 2008; Li et al, 2013; Frankenfeld, 2013; Valentino et al, 2016). Los resultados se obtuvieron en niños sanos que no recibieron suplementos de estrógenos y se debe tener precaución al extrapolar estos hallazgos a la población general. Este estudio aporta datos novedosos sobre la ingesta dietética de fitoestrógenos en este grupo de edad y sobre su estrogénicidad, estimada utilizando la prueba E-screen con la proliferación celular como criterio de valoración.

Los datos sobre la ingesta de poblaciones específicas pueden ayudar a establecer las verdaderas implicaciones del consumo de fitoestrógenos para la salud humana. En la población de estudio, la probabilidad de normopeso versus obesidad se relacionó significativamente con el efecto proliferativo total observado (OR = 0,51, p = 0,026) y al gasto de energía en la actividad física se le relacionó con menor actividad, aumentando el riesgo de obesidad (OR = 13,54, p = 0,001).

En el **análisis de la exposición a BPA y su relación con sobrepeso y obesidad** en escolares, nuestro estudio tuvo en cuenta las variables de estilo de vida y exposición al BPA debido a la migración de este monómero desde policarbonatos y resinas epoxi utilizadas

en el envasado de alimentos (Brotons et al, 1995; Mariscal-Arcas et al, 2009; González-Castro et al, 2011; García-Córcoles et al, 2018) y los materiales de restauración dental (Olea et al, 1996; Fleisch et al, 2010; Sharma et al, 2016; Lee et al, 2017; Berg et al, 2017).

La envoltura de alimentos más empleada por los niños fue el aluminio (70%). El atún en lata suelen consumirlo, al igual que los fideos/espaguetis con envase polimérico, de 1-3 veces/semana (56,4% y 54,5% respectivamente) (Tabla 4.1.8.1).

Los 657 niños de 7 a 10 años de este estudio tenían una media de 29,59 ng (DE 17,07) de BPA/ml de saliva, según lo confirmado por UHPLC-MS/MS, y el 54,7% experimentó contacto oral directo con BPA de selladores o empastes.

La obesidad y el sobrepeso son consecuencia de numerosos factores (Carwile et al, 2011; Bhandari et al, 2013) y este estudio considera los relacionados con la actividad/sedentarismo, la ingesta diaria de energía y la exposición a un disruptor hormonal (BPA). El peso de los individuos también se ha asociado con su actividad física por lo que se investigó la relación entre su gasto energético total/día y su ingesta energética total, que se estimó mediante el FFQ semicuantitativo. Los factores que surgieron en este estudio como un aumento significativo del riesgo de sobrepeso/obesidad fueron el porcentaje de grasa corporal (OR = 10,77); no ir caminando hacia y desde la escuela (OR = 1,382); menor gasto energético en actividades sedentarias (OR = 12,713); mayor gasto energético en actividades deportivas (OR = 1,614); y exposición a BPA de diferentes fuentes, incluida la presencia de selladores dentales y composites (OR = 1,381; p = 0,058). Se asoció una probabilidad significativamente mayor de la condición de sobrepeso con la presencia de BPA en la saliva, fundamentalmente de composites/selladores (OR = 0,873; p = 0,081). En función de estos resultados se va está preparando una publicación en la que se tendrá en cuenta, además del contenido de BPA en saliva, el contenido en los envases poliméricos de los alimentos.



# **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados presentados en este trabajo ha permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. Se ha analizado población escolar de 7 a 10 años, del sur de España, lo que ha permitido estudiar los patrones de alimentación, de hábitos de vida y de consumo de la misma.

2. Los hábitos alimentarios presentan una buena adherencia a la Dieta Mediterránea, y, a más nivel cultural de los padres, mejor estado nutricional del niño.

3. La actividad física extraescolar diaria es muy inferior a la aconsejada, siendo los deportes de equipo los elegidos por ambos sexos.

4. La mediana de los parámetros antropométricos de esta población se ha mantenido en valores de normopeso, aunque las niñas han presentado valores levemente más altos que los niños en cuanto a la composición grasa corporal.

5. Se ha desarrollado un instrumento para discriminar entre el normopeso y el sobrepeso en escolares del sur de España, basado en un punto de corte del ICT de 0,48. El ICT ofrece un método más rápido y simple para clasificar poblaciones de niños con rangos de edad más amplios. Un valor de corte del ICT de 0,48 se asoció positivamente con el IMC, el porcentaje de grasa corporal, las horas de sueño y la adherencia a la dieta mediterránea.

6. Se ha desarrollado un índice de calidad de la ingesta proteica, el cual recopila todas las recomendaciones disponibles sobre la ingesta de proteínas y aminoácidos y su disponibilidad en la dieta habitual de las poblaciones, y puede adaptarse a cualquier grupo de edad o población considerando las recomendaciones correspondientes para la ingesta de aminoácidos.

7. La probabilidad de tener sobrepeso/obesidad se asoció con un mayor consumo diario de energía, azúcares totales, almidón, azúcares añadidos y azúcares libres, cuya reducción es ampliamente recomendada para combatir la alarmante prevalencia de la obesidad entre los niños, junto con la limitación de la ingesta diaria total de nutrientes energéticos como grasas y proteínas. Se requieren programas bien diseñados que involucren a los padres y las escuelas. Se necesitan más estudios para verificar estos hallazgos y examinar su implicación para las políticas de salud pública.

**8.** La actividad estrogénica de los fitoestrógenos de la dieta se relacionó con un aumento en el peso. Se necesitan más investigaciones sobre los efectos obesogénicos de la exposición a disruptores endocrinos presentes en los alimentos.

**9.** Se han identificado las principales fuentes de exposición a BPA de la población escolar, como son los envases poliméricos y las envolturas de los alimentos, y los composites y selladores dentales. Se ha encontrado una tendencia estadísticamente significativa entre concentración de BPA en saliva y sobrepeso/obesidad en esta población.

**10.** Conclusión final: los factores planteados en esta Tesis que pueden influir en normopeso/sobrepeso/obesidad de esta población escolar se resumen en:

- a) La actividad física total, el gasto energético expresado en MET e ir al colegio andando se relacionan positivamente con normopeso.
- b) Mayor consumo de carbohidratos (almidones y azúcares) se relacionan positivamente con sobrepeso/obesidad.
- c) La exposición a obesógenos (fitoestrógenos y BPA), expresados como efecto proliferativo en el Test E-Screen, se asociaron positivamente con sobrepeso/obesidad.
- d) La concentración de BPA en saliva presenta tendencia positiva asociada a sobrepeso/obesidad.

**11.** Por último, se han recopilado parte de los trabajos científicos que, a lo largo del periodo de investigación de esta memoria de Tesis, han sido publicados en colaboración con otros integrantes del grupo de investigación al que pertenezco.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Dental Association. Bisphenol A and Dental Materials. Disponible en <http://www.ada.org/1766.aspx>.

Adams EL, Savag JS (2017) From the children's perspective: What are candy, snacks and meals *Appetite*, 116, 215-222 doi: 10.1016/j.appet.2017.04.034.

Adlercreutz, H., 1995. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 103–112.

Adlercreutz, H., Mazur, W., 1997. Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann. Med.* 29, 95–120.

Agradi, E., Vegeto, E., Sozzi, A., Fico, G., Regondi, S., Tomè, F., 2006. Traditional healthy Mediterranean diet: estrogenic activity of plants used as food and flavoring agents. *Phytother Res.* 20, 670–675.

Ainsworth BE, Watson KB, Ridley K, Pfeiffer KA, Herrmann SD, Crouter SE, McMurray RG, Butte NF, Bassett DR, Trost SG, Berrigan D, Fulton JE. Utility of the Youth Compendium of Physical Activities. *Res Q Exerc Sport.* 2018; 89(3):273-281. doi: 10.1080/02701367.2018.1487754

Albertazzi, P., Purdie, D.W., 2008. Reprint of the nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas* 61, 214–226.

Alberti-Fidanza A, Fidanza F (2004). Mediterranean adequacy index of Italian diets. *Public health nutrition*, 7(7), 937-941.

American College of Sports Medicine, Sawka MN, Burke LM, Eichner ER, Maughan RJ, Montain SJ, Stachenfeld NS. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Feb;39(2):377-90. doi: 10.1249/mss.ob013e31802ca597.

Anthropometry Procedures Manual- CDC (NHANES) 2007. [https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes\\_07\\_08/manual\\_an.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_07_08/manual_an.pdf)

Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C. Determinants of childhood obesity: ANIBES study. *Nutr Hosp*. 2016 Jul 12;33(Suppl 4):339. doi: 10.20960/nh.339.

Ashwell M; Cole TJ; Dixon AK. Ratio of waist circumference to height is strong predictor of intra-abdominal fat. *BMJ*. 1996; 313(7056):559-60.

Ashwell M; Hsieh SD. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int. J. Food Sci. Nutr*. 2005; 56: 303-307.

Atkinson, C., Frankenfeld, C.L., Lampe, J.W., 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med*. 230, 155–170.

AUSNUT 2011-13 food nutrient database. Disponible en <http://www.foodstandards.gov.au/science/monitoringnutrients/ausnut/ausnutdatafiles/Pages/foodnutrient.aspx>

Asociación Española de Pediatría (AEPED). Decálogo sobre las grasas en la alimentación de niños y adolescentes. *Gastroenterología y Nutrición*. Comité de nutrición de la AEPED. 2014. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-nutricion-y-lactancia-materna/nutricion-infantil/documentos/decalogo-sobre-las-grasas-en-alimentacion>

Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, Medina FX, Battino M, Belahsen R, Miranda G, Serra-Majem L; Mediterranean Diet Foundation Expert Group. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr*. 2011 Dec;14(12A):2274-84. doi: 10.1017/S1368980011002515.

Backholer K, Sarink D, Beauchamp A, Keating C, Loh V, Ball K, Martin J, Peeters A. The impact of a tax on sugar-sweetened beverages according to socio-economic position: a systematic review of the evidence. *Public Health Nutr*. 2016 Dec;19(17):3070-3084. doi: 10.1017/S136898001600104X.

Bacopoulou, F.; Landis, G.; Rentoumis, A.; Tsitsika, A.; Efthymiou, V. Mediterranean diet decreases adolescent waist circumference. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(6):447-455.

Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med*. 2002 Apr;8(2):185-92. doi: 10.1089/107555302317371479.

Ballabriga A, Carrascosa A. *Nutrición en la infancia y adolescencia*. 3ª edición. Madrid: Ergon; 2006. p. 499-571.

Barrios-Vicedo, Ricardo, Navarrete-Muñoz, Eva María, García de la Hera, Manuela, González-Palacios, Sandra, Valera-Gran, Desirée, Checa-Sevilla, José Francisco, Gimenez-Monzo, Daniel, & Vioque, Jesús. (2015). Una menor adherencia a la dieta mediterránea se asocia a una peor salud auto-percibida en población universitaria. *Nutrición Hospitalaria*, 31(2), 785-792. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7874>.

Basulto J, Manera M, Baladia E, Miserachs M, Pérez R, Ferrando C, Amigó P, Rodríguez VM, Babio N, Mielgo-Ayuso J, Roca A, San Mauro I, Martínez R, Sotos M, Blanquer M, Revenga J. Definición y características de una alimentación saludable. Marzo de 2013. (Última actualización: 8 de abril de 2013). [Monografía en Internet]. Citado 29 de mayo de 2019]. Disponible en [http://fedn.es/docs/grep/docs/alimentacion\\_saludable.pdf](http://fedn.es/docs/grep/docs/alimentacion_saludable.pdf).

Batal M, Steinhouse L, Delisle H (2018). The nutrition transition and the double burden of malnutrition. *Med Sante Trop.*, 28(4):345-350. doi: 10.1684/mst.2018.0831.

Belloir C, Neiers F, Briand L (2017); Sweeteners and sweetness enhancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 20(4):279-285. doi: 10.1097/MCO.0000000000000377.

Bhakta, D., dos Santos Silva, I., Higgins, C., Sevak, L., Kassam- Khamis, T., Mangtani, P., Adlercreutz, H., McMichael, A., 2005. A semiquantitative food frequency questionnaire is a valid indicator of the usual intake of phytoestrogens by south Asian women in the UK relative to multiple 24-h dietary recalls and multiple plasma samples. *J. Nutr.* 135, 116–123. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.116>.

Bhandari R, Xiao J, Shankar A. Urinary bisphenol A and obesity in U.S. children. *Am J Epidemiol.* 2013;177(11):1263-70. doi: 10.1093/aje/kws391.

Bibiloni, M.del M.; Pons, A.; Tur, J.A. Defining body fatness in adolescents: a proposal of the AFAD-A classification. *PLoS One.* 2013;8(2):e55849

Binkovitz, L.A.; Henwood, M.J.; Sparke, P. Pediatric DXA: technique, interpretation and clinical applications. *Pediatr Radiol.* 2008; 38 Suppl 2:S227-39

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986 Feb 8;1(8476):307-10.

Bland JM, Altman DG. Transformations, means, and confidence intervals. *BMJ.* 1996 Apr 27;312(7038):1079. doi: 10.1136/bmj.312.7038.1079.

Bleich SN, Ku R, Wang YC. Relative contribution of energy intake and energy expenditure to childhood obesity: a review of the literature and directions for future research. *Int J Obes (Lond).* 2011; 35(1):1-15. doi: 10.1038/ijo.2010.252.

Boker, L.K., Van der Schouw, Y.T., De Kleijn, M.J.J., Jacques, P.F., Grobbee, D.E., Peeters, P.H.M., 2002. Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *J. Nutr.* 132, 1319–1328. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1319>.

Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol Adimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ. Health Perspect.* 115(Suppl. 1):69–76

Börnhorst C, Huybrechts I, Hebestreit A, Krogh V, De Decker A, Barba G, Moreno LA, Lissner L, Tornaritis M, Loit HM, Molnár D, Pigeot I; IDEFICS and the I.Family consortia. Usual energy and macronutrient intakes in 2-9-year-old European children. *Int J Obes (Lond).* 2014;38 Suppl 2:S115-23. doi: 10.1038/ijo.2014.142.

Bountziouka V, Panagiotakos DB (2010) Statistical methods used for the evaluation of reliability and validity of nutrition assessment tools used in medical research. *Curr Pharm Des*,16(34):3770–675.

Bourke, M.; Whittaker, P.J.; Verma, A. Are dietary interventions effective at increasing fruit and vegetable consumption among overweight children? A systematic review. *J Epidemiol Community Health.* 2014;68(5):485-90.

Boutelle KN, Rhee KE, Liang J, Braden A, Douglas J, Strong D, Rock CL, Wilfley DE, Epstein LH, Crow SJ. Effect of Attendance of the Child on Body Weight, Energy Intake, and Physical Activity in Childhood Obesity Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr.* 2017 Jul 1;171(7):622-628. doi: 10.1001/jamapediatrics.2017.0651.

Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N., 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect.* Jun 103 (6), 608–612. doi:10.1289/ehp.95103608.

Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, NeedhamLL. 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 113:391–95

Carreño 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 Jan;103(1):55-61.

Carwile JL, Michels KB. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. *Environ Res.* 2011 Aug;111(6):825-30. doi: 10.1016/j.envres.2011.05.014.

Casals-Casas C, Desvergne B, Endocrine disruptors: From endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:135-62.

CDC Anthropometry Procedures Manual. Disponible en <https://www.cdc.gov/nchs/data/pdf>

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 Mar;62(11):1917-24.

Chen JQ1; Brown TR; Russo J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1793(7):1128-43. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.03.009.

Ciprián, Daniel, Navarrete-Muñoz, Eva M.<sup>a</sup>, García de la Hera, Manuela, Giménez-Monzo, Daniel, González-Palacios, Sandra, Quiles, Joan, & Vioque, Jesús. (2013). Patrón de dieta mediterráneo y occidental en población adulta de un área mediterránea: un análisis clúster. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5), 1741-1749. doi:10.3305/nh.2013.28.5.6758.

Clasificación Internacional de Ocupaciones 2011. Disponible en BOE-A-2010-19389.

Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 2000; 6;320(7244):1240-3.

Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ.* 2007 Jul 28;335(7612):194. doi: 10.1136/bmj.39238.399444.55.

Cole TJ, Lobstein T, Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr Obes.* 2012;7(4):284-94. doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00064.x.

Copperstone C, McNeill G, Aucott L, Jackson DM. A pilot study to improve sugar and water consumption in Maltese school children. *Int J Adolesc Med Health.* 2019 Feb 15:/j/ijamh.ahead-of-print/ijamh-2018-0134/ijamh-2018-0134.xml. doi: 10.1515/ijamh-2018-0134.

Costa LG, Giordano G, Tagliaferri S, Caglieri A, Mutti A. 2008. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. *Acta Biomed.* 79:172–83.

Costa LG, de Laat, R., Tagliaferri, S., & Pellacani, C. (2014). A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. *Toxicology letters*, 230(2), 282-294.

Costa LG, Cole TB, Coburn J, Chang YC, Dao K, Roque P. Neurotoxicants are in the air: convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain. *Biomed Res Int*. 2014;2014:736385. doi: 10.1155/2014/736385.

Cotterchio, M., Boucher, B.A., Manno, M., Gallinger, S., Okey, A., Harper, P., 2006. Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk. *J. Nutr.* 136, 3046–3053.

Couto E, Boffetta P, Lagiou P, Ferrari P, Buckland G, Overvad K, Dahm CC, Tjønneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Cottet V, Trichopoulos D, Naska A, Benetou V, Kaaks R, Rohrmann S, Boeing H, von Ruesten A, Panico S, Pala V, Vineis P, Palli D, Tumino R, May A, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Lund E, Skeie G, Engeset D, Gonzalez CA, Navarro C, Rodríguez L, Sánchez MJ, Amiano P, Barricarte A, Hallmans G, Johansson I, Manjer J, Wirfält E, Allen NE, Crowe F, Khaw KT, Wareham N, Moskal A, Slimani N, Jenab M, Romaguera D, Mouw T, Norat T, Riboli E, Trichopoulou A. Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort. *Br J Cancer*. 2011 Apr 26;104(9):1493-9. doi: 10.1038/bjc.2011.106.

Cuervo, M., Corbalán, M., Baladía, E., Cabrerizo, L., Formiguera, X., Iglesias, C., Lorenzo, H., Polanco, I., Quiles, J., Romero de Ávila, M.D., Russolillo, G., 2009. Villarino A Martínez JA Comparativa de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) de los diferentes países de la Unión Europea, de Estados Unidos (EEUU) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS). *Nutr. Hosp.* 24 (4), 384–414 ISSN 0212-1611.

Cynober L, Bier DM, Kadowaki M, Morris SM Jr, Renwick AG. A proposal for an upper limit of leucine safe intake in healthy adults. *J Nutr.* 2012;142(12):2249S-2250S. doi: 10.3945/jn.112.160853.

D-A-CH. Deutsche Gesellschaft für Ernährung - Österreichische Gesellschaft für Ernährung Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung - Schweizerische Vereinigung für Ernährung, 2008. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr [Reference values for nutrient intakes]. Umschau Braus Verlag, Frankfurt am Main, Germany.

Danielzik S, Pust S, Müller MJ. School-based interventions to prevent overweight and obesity in prepubertal children: process and 4-years outcome evaluation of the Kiel

Obesity Prevention Study (KOPS). *Acta Paediatr.* 2007 Apr; 96(454):19–25. doi:10.1111/j.1651-2227.2007.00165.x

Davis TA, Fiorotto ML and Reeds PJ, 1993. Amino acid compositions of body and milk protein change during the suckling period in rats. *Journal of Nutrition*, 123, 947-956.

De Onis, M. (2015). World Health Organization Reference Curves. In M.L. Frelut (Ed.), *The ECOG's eBook on Child and Adolescent Obesity*. Disponible en [ebook.ecog-obesity.eu](http://ebook.ecog-obesity.eu)

De Onis, M.; Onyango, A.W.; Borghi, E.; Siyam, A.; Nishida C, Siekmann, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ.* 2007;85(9):660-7.

Desmawati, D., Sulastri, D., 2019 Feb 15. Phytoestrogens and their health effect. *Open Access Maced J Med Sci* 7 (3), 495–499. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.086>.

Dewey KG, Beaton G, Fjeld C, Lönnerdal B, Reeds P. Protein requirements of infants and children. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50 Suppl 1:S119-47.

Dixon, R.A., 2004. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 225–261. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141729>.

Dobashi, K.; Takahashi, K.; Nagahara, K.; Tanaka, D.; Itabashi, K. Evaluation of Hip/Height(P) Ratio as an Index for Adiposity and Metabolic Complications in Obese Children: Comparison with Waist-related Indices. *J Atheroscler Thromb.* 2017 1;24(1):47-54.

Dodds, E.C., 1936 Apr. The pharmacological action and clinical use of drugs with a camphor- and coramine-like action: (section of therapeutics and pharmacology). *Proc. R. Soc. Med.* 29 (6), 655–657.

Drobná Z, Henriksen AD, Wolstenholme JT, Montiel C, Lambeth PS, Shang S, Harris EP, Zhou C, Flaws JA, Adli M, Rissman EF. Transgenerational Effects of Bisphenol A on Gene Expression and DNA Methylation of Imprinted Genes in Brain. *Endocrinology.* 2018 Jan 1;159(1):132-144. doi: 10.1210/en.2017-00730.

Durá-Travé T, Gallinas-Victoriano F. Dietary pattern among schoolchildren with normal nutritional status in Navarre, Spain. *Nutrients.* 2014;11;6(4):1475-87. doi: 10.3390/nu6041475.

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein EFSA Journal 2012;10(2):2557.

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) (2013). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs – Part I: exposure assessment.

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Part II - Toxicological assessment and risk characterisation. EFSA Journal 2015;13(1):3978, p.196. Disponible en [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/3978part2.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3978part2.pdf)

Elango R, Humayun MA, Ball RO, Pencharz PB. Protein requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method. Am J Clin Nutr. 2011;94(6):1545-52. doi: 10.3945/ajcn.111.012815.

Elobeid MA; Allison DB. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2008 Oct;15(5):403-8. doi: 10.1097/MED.0b013e32830ce95c

Eloranta AM, Lindi V, Schwab U, Kiiskinen S, Venäläinen T, Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA. Dietary factors associated with metabolic risk score in Finnish children aged 6-8 years: the PANIC study. Eur J Nutr. 2014 Sep;53(6):1431-9. doi: 10.1007/s00394-013-0646-z. Epub 2013 Dec 30.

Encuesta Nacional de consumo de Alimentos en población Infantil y Adolescentes (ENALIA). 2012- 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2017.

Esposito K, Kastorini CM, Panagiotakos DB, Giugliano D. Mediterranean diet and metabolic syndrome: an updated systematic review. Rev Endocr Metab Disord 2013; 14: 255–263.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. N

Engl J Med. 2013 Apr 4;368(14):1279-90. doi: 10.1056/NEJMoa1200303. Epub 2013 Feb 25. Retraction in: N Engl J Med. 2018 Jun 21;378(25):2441-2442. Erratum in: N Engl J Med. 2014 Feb 27;370(9):886. Corrected and republished in: N Engl J Med. 2018 Jun 21;378(25):e34.

Faik A, Vanderhulst E, Rossem I, Devroey D. Influence of physical activity and interest for food and sciences versus weight disorders in children aged 8 to 18 years. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(2):E105-E113.

FAO/WHO/UNU Human energy requirements Rome, 17 -24 October 2001 ISSN 1813-3932.

FAO/WHO/UNU. Energy and Protein Requirements. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2007 WHO technical report serie; no. 935 ISBN 9241209356

Farajian P, Risvas G, Karasouli K, Pounis GD, Kastorini CM, Panagiotakos DB, Zampelas A. Very high childhood obesity prevalence and low adherence rates to the Mediterranean diet in Greek children: the GRECO study. *Atherosclerosis.* 2011 Aug;217(2):525-30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.003.

Fernandez MF, Rivas A, Olea-Serrano F, Cerrillo I, Molina-Molina JM, Araque P, Martinez-Vidal JL, Olea N. Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal Bioanal Chem.* 2004 May;379(1):163-70.

Fernández San Juan PM (2006). Dietary habits and nutritional status of school aged children in Spain. *Nutr Hosp* 21, 374–378.

Fidler Mis N, Kennedy K, Fewtrell M et al (2018) ,Working Group on Early Nutrition Research. European Society for Paediatric Gastroenterology. Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Role of Incentives in Long-term Nutritional and Growth Studies in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 67(6):767-772. doi: 10.1097/MPG.0000000000002143

Fiorentino M, Landais E, Bastard G, Carriquiry A, Wieringa FT, Berger J. Nutrient intake is insufficient among Senegalese urban school children and adolescents: Results from two 24 h recalls in state primary schools in dakar. *Nutrients.* 2016; 20;8(10).

Fisberg, M., Maximino, P., Kain, J., Kovalskys, I., *Pediatr (Rio J), J.,* 2016. Obesogenic Environment - Intervention Opportunities May-Jun, vol. 92. pp. S30–S39. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.02.007>. 3 Suppl 1.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization/United Nations University (2004) Human Energy Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Rome: FAO.

Food Standard Agency, 2003. Phytoestrogens and Health. Committee on Toxicity of Chemical in Food. Consumer Products and the Environment. Food Standard Agency, London (UK).

Fornés NS, Stringhini ML, Elias BM. Reproducibility and validity of a food-frequency questionnaire for use among low-income Brazilian workers. *Public Health Nutr.* 2003 Dec;6(8):821-7. doi: 10.1079/phn2003505.

Frade-Costa, E.M., Spritzer, P.M., Hohl, A., Bachega, T.A.S.S., 2014. Effects of Endocrine Disruptors in the Development of the Female Reproductive Tract Arq Bras Endocrinol Metab. doi:10.1590/0004-2730000003031.

Frankenfeld, C.L., 2013. Relationship of obesity and high urinary enterolignan concentrations in 6806 children and adults: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey data. *Eur J Clin Nutr.* Aug 67 (8), 887–889. doi: 10.1038/ejcn.2013.107.

Fujita Y; Kouda K; Nakamura H; Iki M. Cut off values of body mass index, waist circumference and waist-to-height ratio to identify excess abdominal fat: population-based screening of Japanese school children. *J Epidemiol.* 2011;21(3):191-6.

García-Arias MT, García-Fernández MC (Eds). *Nutrición y dietética*. Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales. Universidad de León (2003). ISBN: 84-9773-023-2.

García-Córcoles, M.T., Cipa, M., Rodríguez-Gómez, R., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Vílchez, J.L., Zafra-Gómez, A., 2018 Feb 1. Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 178, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.067>.

Gerona, R.R., Woodruff, T.J., Dickenson, C.A., Pan, J., Schwartz, J.M., Sen, S., Friesen, M.W., Fujimoto, V.Y., Hunt, P.A., 2013. Bisphenol-A (BPA). BPA glucuronide and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environ. Sci. Technol.* 47 (21), 12477–12485. doi:10.1021/es402764d.

Gil, J.M.; Takourabt, S.; Socio-economics, food habits and the prevalence of childhood obesity in Spain. *Child Care Health Dev.* 2017;43(2):250-258.

González-Castro, M.I., Olea-Serrano, M.F., Rivas-Velasco, A.M., Medina-Rivero, E., Ordoñez-Acevedo, L.G., De León-Rodríguez, A., 2011. Phthalates and bisphenols migration in Mexican food cans and plastic food containers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86 (6), 627–631. doi:10.1007/s00128-011-0266-3.

González-Rodríguez LG, Estaire P, Peñas-Ruiz C, Ortega RM; UCM Research Group VALORNUT (920030). Vitamin D intake and dietary sources in a representative sample of Spanish adults. *J Hum Nutr Diet.* 2013 Jul;26 Suppl 1:64-72. doi: 10.1111/jhn.12061.

Goran, M. I., M. Kaskoun, R. Johnson, C. Martinez, B. Kelly, V. Hood. Energy expenditure and body fat distribution in Mohawk children. *Pediatrics.* 1995; 95:89 –95.

Gorgojo-Jiménez, Martín-Moreno. Cuestionario de Frecuencia de consumo de alimentos. En: *Nutrición y Salud Pública.* Serra-Majem LL, Aranceta-Bartrina J, Mataix-Verdú J. Masson. Barcelona, 2005.

Grün F, Blumberg B. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147:S50–55.

Grün F; Blumberg B. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 May 25;304(1-2):19-29. doi: 10.1016/j.mce.2009.02.018.

Güngör NK Overweight and obesity in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014 Sep;6(3):129-43. doi: 10.4274/Jcrpe.1471

Gunther ALB, Buyken AE, Kroke A. Protein intake during the period of complementary feeding and early childhood and the association with body mass index and percentage body fat at 7 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1626 –33.

Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, Webster TF. 2010. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int. J. Androl.* 33:324–32.

Hagenaars LL, Jeurissen PP, Klazinga NS (2019) Sugar-sweetened beverage taxation in 2017: a commentary on the reasons behind their quick spread in the EU compared with the USA *Public Health Nutr.*, 22(1):186-189. doi: 10.1017/S1368980018002008.

Halden RU. 2010. Plastics and health risks. *Annu. Rev. Public Health* 31:179–94.

Hall, J.M., Powell, A.H., Rajic, L., Korach, K.S., 2019. The role of dietary phytoestrogens and the nuclear receptor PPARc in adipogenesis: an in vitro study. *Environ. Health Perspect.* 127 (3). doi:10.1289/EHP3444.

Hamdan M, Monteagudo C, Lorenzo-Tovar ML, Tur JA, Olea-Serrano F, Mariscal-Arcas M. Development and validation of a nutritional questionnaire for the Palestine population. *Public Health Nutr.* 2014 Nov;17(11):2512-8. doi: 10.1017/S1368980013002711.

Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, Legler J, Brouwer A. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci.* 2006 Jul;92(1):157-73. doi: 10.1093/toxsci/kfj187.

Harrell JS, McMurray RG, Baggett CD, Pennell ML, Pearce PF, Bangdiwala SI. Energy costs of physical activities in children and adolescents. *Med Sci Sports Exerc.* 2005; 37(2):329-36. doi: 10.1249/01.MSS.0000153115.33762.3F

Hassapidou, M.; Tzotzas, T.; Makri, E.; Pagkalos, I.; Kaklamanos, I.; Kapantais, E. et al. Prevalence and geographic variation of abdominal obesity in 7- and 9-year-old children in Greece; World Health Organization Childhood Obesity Surveillance Initiative 2010. *BMC Public Health.* 2017;17(1):126.

Hatch EE; Nelson JW; Stahlhut RW; Webster TF. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl.* 2010 Apr;33(2):324-32. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01035.x

Heald, C.L., Bolton-Smith, C., Ritchie, M.R., Morton, M.S., Alexander, F.E., 2006. Phytoestrogen intake in Scottish men: use of serum to validate a self-administered foodfrequency questionnaire in older men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60, 129–135. doi:10.1038/sj.ejcn.1602277.

Health Council of the Netherlands, 2001. Dietary Reference Intakes: energy, proteins, fats and digestible carbohydrates. Publication no. 2001/19ER, The Hague, The Netherlands.

Hermabessiere L, Dehaut A, Paul-Pont I, Lacroix C, Jezequel R, Soudant P, Duflos G. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms:A review.*Chemosphere.* 2017 Sep;182:781-793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.096.

Hernández-Elizondo, J., Mariscal-Arcas, M., Rivas, A., Feriche, B., Velasco, J., Olea-Serrano, F., 2009. Exposure of phytoestrogens intake through diet in a sample of females. *Nutr. Hosp.* 24, 445–451.

Hernandez-Elizondo, J., Monteagudo, C., Murcia, M.A., Olea, N., Olea-Serrano, F., Mariscal-Arcas, M., 2013. Assessment of the estrogenicity of the diet of a healthy female Spanish population based on its isoflavone content. *Food Addit. Contam. A* 30(4), 627–633. doi:10.1080/19440049.2013.775604.

Hines, E.P., Mendola, P., von Ehrenstein, O.S., Ye, X., Calafat, A.M., Fenton, S.E., 2015. Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. *Reprod Toxicol.* Jul;54:120-128. doi:10.1016/j.reprotox.2014.11.006.

Ho SY; Lam TH; Janus ED. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. *Annals of epidemiology* 2003; 13 (10): 683-691.

Hopper LN, Blackman KF, Page RA, Barnes K, Gizlice Z, Rivera AI, Carter-Edwards L. Seeds of HOPE: Incorporating Community-Based Strategies to Implement a Weight-Loss and Empowerment Intervention in Eastern North Carolina. *N C Med J.* 2017 Jul-Aug;78(4):230-236. doi: 10.18043/ncm.78.4.230.

Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., Mandel, J.E., Koo, J., John, E.M., Smith, J., Smith, M., 2000. Assessing phytoestrogen exposure in epidemiological studies: development of a database (United States). *CCC (Cancer Causes Control)* 11, 289–298.

Human energy requirements Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Rome, 17–24 October 2001.

Iaccarino Idelson, P.; Scalfi, L.; Valerio, G. Adherence to the Mediterranean Diet in children and adolescents: A systematic review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017;27(4):283-299.

Inchley J. et al. (eds.), *Growing Up Unequal: Gender and Socioeconomic Differences in Young People's Health and Well-being, Health Behaviour in School-aged Children (HBSC) Study, International Report from the 2013/2014 Survey*, WHO Regional Office for Europe. 2016

INE, 2018. Disponible en <http://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t15/p419/>

Institute of Medicine (IoM), 2000. *DRI Dietary Reference Intakes: Applications in dietary assessment*. Institute of Medicine, National Academies Press, Washington D.C., USA.

Institute of Medicine (IoM), 2005. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. National Academies Press, Washington D.C., USA.

Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial. Disponible en <https://www.nidcr.nih.gov/>

Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development *Neuropathology*. 2012 Aug;32(4):447-57. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01287.x.

Jakobsson K, Thuresson K, Rylander L, Sjodin A, Hagmar L, Bergman A. 2002. Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians. *Chemosphere* 46:709–16

Janssen I. Physical activity guidelines for children and youth *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2007; 32: S109–S121. doi:10.1139/H07-109.

Janssen I, LeBlanc AG. Systematic review of the health benefits of physical activity and fitness in school-aged children and youth. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2010;11;7:40. doi: 10.1186/1479-5868-7-40.

Jensen AA, Leffers H. 2008. Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances. *Int. J. Androl.* 31:161–69.

Jiang Q, Payton-Stewart F, Elliott S, Driver J, Rhodes LV, Zhang Q, Zheng S, Bhatnagar D, Boue SM, Collins-Burow BM, Sridhar J, Stevens C, McLachlan JA, Wiese TE, Burow ME, Wang G. Effects of 7-O substitutions on estrogenic and anti-estrogenic activities of daidzein analogues in MCF-7 breast cancer cells. *J Med Chem.* 2010 Aug 26;53(16):6153-63. doi: 10.1021/jm100610w.

Jiménez Torres M, Campoy Folgoso C, Canabate Reche F, Rivas Velasco A, Cerrillo Garcia I, Mariscal Arcas M, Olea-Serrano F. Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section. *Sci Total Environ.* 2006 Dec 15;372(1):32-8.

Kaldas, R.S., Hughes, C.L., 1989. Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod. Toxicol.* 3, 81–89.

Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. 2005. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol. Pharmacol.* 67:766–74.

- Keller A, Bucher Della Torre S. (2015) Sugar-Sweetened Beverages and Obesity among Children and Adolescents: A Review of Systematic Literature Reviews. *Child Obes.* 11(4):338-46. doi: 10.1089/chi.2014.0117.
- Kesse-Guyot E, Ahluwalia N, Lassale C, Hercberg S, Fezeu L, Lairon D. Adherence to Mediterranean diet reduces the risk of metabolic syndrome: a 6-year prospective study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 677–683.
- Khoury M; Manhlhiot C; McCrindle BW. Role of the waist/height ratio in the cardiometabolic risk assessment of children classified by body mass index. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(8):742-51.
- Kimura T, Bier DM, Taylor CL. Summary of workshop discussions on establishing upper limits for amino acids with specific attention to available data for the essential amino acids leucine and tryptophan. *J Nutr.* 2012;142(12):2245S-2248S. doi: 10.3945/jn.112.160846.
- Knight, D.C., Eden, J.A., 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* 87, 897–904.
- Kolátorová, L., Lapčík, O., Stárka, L., 2018. Phytoestrogens and the intestinal. *Microbiome Physiol. Res.* 67 (Suppl. 3), S401–S408.
- Koletzko B, Demmelmair H, Grote V, Prell C, Weber M. High protein intake in young children and increased weight gain and obesity risk. *Am J Clin Nutr* 2016;103:303–4.
- Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2015;66(1):5-11.
- Kovács E, Hunsberger M, Reisch L, Gwozdz W, Eiben G, De Bourdeaudhuij I, Russo P, Veidebaum T, Hadjigeorgiou C, Sieri S, Moreno LA, Pigeot I, Ahrens W, Pohlmann H, Molnár D; IDEFICS consortium. Adherence to combined lifestyle factors and their contribution to obesity in the IDEFICS study. *Obes Rev.* 2015 Dec;16 Suppl 2:138-50. doi: 10.1111/obr.12349.
- Kovarova J, Svobodova Z. 2008. Perfluorinated compounds: occurrence and risk profile. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 29:599–608.
- Kranz S, Smiciklas-Wright H, Siega-Riz AM (2005) Adverse effect of high added sugar consumption on dietary intake in American preschoolers. *J Pediatr.*, 146(1):105-11. doi: 10.1016/j.jpeds.2004.08.077.

Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., Kašparovský, T., 2019. Isoflavones. *Molecules* 24, 1076. doi: 10.3390/molecules24061076.

Kusama K, Le DS, Hanh TT, Takahashi K, Hung NT, Yoshiike N, Yamamoto S. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among Vietnamese in Ho Chi Minh City. *J Am Coll Nutr.* 2005 Dec;24(6):466-73. doi: 10.1080/07315724.2005.10719492.

Kwack, S.J., Kim, K.B., Kim, H.S., Yoon, K.S., Lee, B.M., 2009. Risk assessment of soybeanbased phytoestrogens. *J. Toxicol. Environ. Health* 72 (21–22), 1254–1261. doi:10.1080/15287390903212212.

Kundakovic M, Champagne FA. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behav Immun.* 2011 Aug;25(6):1084-93. doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.005.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA.* 2008 Sep 17;300(11):1303-10. doi: 10.1001/jama.300.11.1303.

Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2006. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1611–1620.

Lee DH, Lee IK, Porta M, Steffes M, Jacobs DR Jr. 2007. Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among nondiabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Diabetologia* 50:1841–51.

Lee AA, Owyang C (2017) Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients.* 24;9(7). pii: E653. doi: 10.3390/nu9070653.

Legler, J. Obesity, Diabetes, and Associated Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab*, April 2015, 100(4):1278–1288.

Li C, Ford ES, Mokdad AH, Cook S. Recent trends in waist circumference and waist-height ratio among US children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 118 (5): 390-398.

Li DK, Miao M, Zhou Z, Wu C, Shi H, Liu X, Wang S, Yuan W. 2013. Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school-age children. *PLoS One* 12 (6), e65399. doi:10.1371/journal.pone.0065399.

Long G, Winefordner JD. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical chemistry*, 1983, vol. 55, no 7, p. 712A-724A.

López-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, Molina-Molina JM, Puertollano MC, Rivas A, Fernández M, Cerrillo I, Olea-Serrano MF, López C, Olea N. Estrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit Contam.* 2007 Jan;24(1):95-102.

López-Espinosa MJ, Lopez-Navarrete E, Rivas A, Fernandez MF, Noguerras M, Campoy C, Olea-Serrano F, Lardelli P, Olea N. Organochlorine pesticide exposure in children living in southern Spain. *Environ Res.* 2008 Jan;106(1):1-6.

Lopez-Espinosa MJ, Freire C, Arrebola JP, Navea N, Taoufiki J, Fernandez MF, Ballesteros O, Prada R, Olea N. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere.* 2009 Aug;76(6):847-52. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.03.063.

López-Sobaler AM, Aparicio A, González-Rodríguez LG, Cuadrado-Soto E, Rubio J, Marcos V, Sanchidrián R, Santos S, Pérez-Farinós N, Dal Re MÁ, Villar C, Robledo T, Castrodeza JJ, Ortega RM. Adequacy of Usual Vitamin and Mineral Intake in Spanish Children and Adolescents: ENALIA Study. *Nutrients.* 2017 Feb 13;9(2):131. doi: 10.3390/nu9020131.

López de Ullibarri, Pita S. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. *Cad Aten Primaria*, 1999, vol. 6, p. 169-171.

MacDougall JD, Elder GC, Sale DG, Moroz JR, Sutton JR. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibres. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1980 Feb;43(1):25-34. doi: 10.1007/BF00421352.

Macias M, Adriana Ivette; Gordillo S, Lucero Guadalupe; Camacho R, Esteban Jaime. Hábitos alimentarios de niños en edad escolar y el papel de la educación para la salud. *Rev. chil. nutr.,* Santiago, v. 39, n. 3, p. 40-43, sept. 2012.

Maffei C, Banzato C, Brambilla P, Cerutti F, Corciulo N, Cuccarolo G, Di Pietro M, Franzese A, Gennari M, Balsamo A, Grugni G, Iughetti L, Del Giudice EM, Petri A, Trada M, Yiannakou P; Obesity Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. Insulin resistance is a risk factor for high blood pressure regardless of body

size and fat distribution in obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 May;20(4):266-73. doi: 10.1016/j.numecd.2009.04.005.

Mäkelä S., Santti R., Salo L., McLachlan J.A., 1995. Phytoestrogens are partial estrogen agonist in the adult male mouse. *Environ. Health Perspect.* 103, 123–127. doi:10.1289/ehp.103-1518873.

Mariscal-Arcas M, Romaguera D, Rivas A, Feriche B, Pons A, Tur JA, Olea-Serrano F. Diet quality of young people in southern Spain evaluated by a Mediterranean adaptation of the Diet Quality Index-International (DQI-I). *Br J Nutr.* 2007 Dec;98(6):1267-73. doi: 10.1017/S0007114507781424.

Mariscal-Arcas M, Rivas A, Monteagudo C, Granada A, Cerrillo I, Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean diet index for pregnant women. *Br J Nutr.* 2009 Sep;102(5):744-9. doi: 10.1017/S0007114509274769.

Mariscal-Arcas M, Rivas A, Granada A, Monteagudo C, Murcia MA, Olea-Serrano F. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol.* 2009 Feb;47(2):506-10. doi:10.1016/j.fct.2008.12.011.37.

Mariscal-Arcas M, Rivas A, Velasco J, Ortega M, Caballero AM, Olea-Serrano F. Evaluation of the Mediterranean Diet Quality Index (KIDMED) in children and adolescents in Southern Spain. *Public Health Nutr.* 2009;12(9):1408-12. doi: 0.1017/S1368980008004126.

Mariscal-Arcas M, Velasco J, Monteagudo C, Caballero-Plasencia MA, Lorenzo-Tovar ML, Olea-Serrano F. Comparison of methods to evaluate the quality of the Mediterranean diet in a large representative sample of young people in Southern Spain. *Nutr Hosp.* 2010;25(6):1006-13.

Mariscal-Arcas M, Caballero-Plasencia ML, Monteagudo C, Hamdan M, Pardo-Vasquez MI, Olea-Serrano F. Validation of questionnaires to estimate adherence to the Mediterranean diet and life habits in older individuals in Southern Spain. *J Nutr Health Aging.* 2011 Nov;15(9):739-43. doi: 10.1007/s12603-011-0136-z.

Mariscal-Arcas M, Monteagudo C, Hernandez-Elizondo J, Benhammou S, Lorenzo ML, Olea-Serrano F. Differences in food intake and nutritional habits between Spanish adolescents who engage in ski activity and those who do not. *Nutr Hosp.* 2014; 31;31(2):936-43. doi: 10.3305/nh.2015.31.2.8267.

Marrodán MD, Martínez JR, López-Ejeda N, Pacheco JL, Mesa MS, Carmenate MM. Estimación de la adiposidad a partir del índice cintura talla: ecuaciones de predicción aplicables en población infantil española. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 2011, vol. 31, no 3, p. 45-51.

Marrodán MD, Martínez-Álvarez JR, González-Montero De Espinosa M, López-Ejeda N, Cabañas MD, Prado C. Precisión diagnóstica del índice cintura-talla para la identificación del sobrepeso y de la obesidad infantil [Diagnostic accuracy of waist to height ratio in screening of overweight and infant obesity]. *Med Clin (Barc)*. 2013 Apr 15;140(7):296-301. Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2012.01.032.

Marrodán MD, Alvarez J.M, de Espinosa MG. Carmenate M. López-Ejeda, N, Cabañas M, Pacheco J, Mesa M, Romero-Collazos J, Prado C, Villarino A. 2014. Predicting percentage body fat through waist-to-height ratio (WtHR) in Spanish schoolchildren. *Public Health Nutr*. 17 (4), 870–876. doi: 10.1017/S1368980013000888.

Martín-Calvo, N.; Moreno-Galarraga, L.; Martínez-González, M.A. Association between Body Mass Index, Waist-to-Height Ratio and Adiposity in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2016; 20;8(8).

Martínez-González MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, Lairon D, Estruch R, Trichopoulos A. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev*. 2009 May;67 Suppl 1:S111-6. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00172.x.

Martínez-González MA, Sánchez Villegas A, Toledo E, Faulín FJ. *Bioestadística amigable*. Elsevier. 4ª ed. 2020.

Martínez JA, Astiasarán I, Muñoz M (eds.). *Recomendaciones dietéticas y de salud. Alimentación y Salud Pública*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2002.

Martínez Zazo AB, Pedrón Giner C. *Manual: Conceptos básicos en alimentación*. Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Madrid; 2016.

McAllister EJ, Dhurandhar NV, Keith SW, Aronne LJ, Barger J, Baskin M, Benca RM, Biggio J, Boggiano MM, Eisenmann JC, Elobeid M, Fontaine KR, Gluckman P, Hanlon EC, Katzmarzyk P, Pietrobelli A, Redden DT, Ruden DM, Wang C, Waterland RA, Wright SM, Allison DB. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Nov;49(10):868-913. doi: 10.1080/10408390903372599.

McKenzie TL, Lounsbery MAF. School Physical Education: The Pill Not Taken. *American Journal of Lifestyle Medicine*. 2009;3(3):219-225. doi:10.1177/1559827609331562.

McKinlay R, Plant JA, Bell JN, Voulvoulis N. 2008. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environ. Int.* 34:168–83.

Mistretta A, Marventano S, Antoci M, Cagnetti A, Giogianni G, Nolfo F, Rametta S, Pecora G, Marranzano M. Mediterranean diet adherence and body composition among Southern Italian adolescents. *Obes Res Clin Pract.* 2017 Mar-Apr;11(2):215-226. doi: 10.1016/j.orcp.2016.05.007.

Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. *Tablas de composición de alimentos*. Editorial Pirámide, 2013 (16<sup>o</sup> ed. revisada y ampliada).

Moreno, L.A.; Sarria, A.; Popkin, B.M. The nutrition transition in Spain: A european Mediterranean country. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002, 56, 992–1003.].

Monteagudo C, Mariscal Arcas M, Palacín Arce A, López López M, Olea Serrano F. Estudio de la dieta y conformidad con patrones dietéticos saludables en niños/as escolares de Granada. *Rev esp nut com.* ISSN 1135-3074, Vol. 18, N<sup>o</sup>. 2, 2012, págs. 84-90.

Monteagudo C, Mariscal-Arcas M, Rivas A, Lorenzo-Tovar ML, Tur JA, Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean Diet Serving Score. *PLoS One.* 2015 Jun 2;10(6):e0128594. doi: 10.1371/journal.pone.0128594.

Monteagudo C, Palacín-Arce A, Bibiloni Mdel M, Pons A, Tur JA, Olea-Serrano F, Mariscal-Arcas M. Proposal for a Breakfast Quality Index (BQI) for children and adolescents. *Public Health Nutr.* 2013;16(4):639-44. doi: 10.1017/S1368980012003175.

Monteagudo C, Téllez F, Heras-González L, Ibañez-Peinado D, Mariscal-Arcas M, Olea-Serrano F. School dietary habits and incidence of dental caries. *Nutr Hosp.* 2015; 32(1):383-8. doi: 10.3305/nh.2015.32.1.9086.

Müller MJ, Geisler C, Hübers M, Pourhassan M, Braun W, Bosy-Westphal A. Normalizing resting energy expenditure across the life course in humans: challenges and hopes. *Eur J Clin Nutr.* 2018 May;72(5):628-637. doi: 10.1038/s41430-018-0151-9.

Mulligan, A.A., Welch, A.A., McTaggart, A.A., Bhaniani, A., Bingham, S.A., 2007. Intakes and sources of soya foods and isoflavones in a UK population cohort study (EPICNorfolk). *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 248–254. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602509>.

Muñoz M, Zazpe I. Guías alimentarias. En Martínez JA, Astiasarán I, Muñoz M (eds): Alimentación y Salud Pública Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2002.

Naska A, Trichopoulou A. Back to the future: the Mediterranean diet paradigm. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014; 24:216–9. doi: 10.1016/j.numecd.2013.11.007.

Nilsen, B.B.; Yngve, A.; Sjöberg, A.; Moraeus, L.; Lissner, L.; Werner, B. Using different growth references to measure thinness and overweight among Swedish primary school children showed considerable variations. *Acta Paediatr.* 2016;105(10):1158-65.

Niu, Y., Wang, B., Zhao, Y., Zhang, J., Shao, B., 2017. Highly sensitive and high-ThroughputMethod for the analysis of bisphenol analogues and their halogenated derivatives in breast milk. *J. Agric. Food Chem.* 6 (48), 10452–10463. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04394>.

OCDE 2017. Disponible en [www.oecd.org/health/obesity-update.htm](http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm)

Okely AD, Salmon J, Vella SA, Cliff D, Timperio A, Tremblay M, et al. A Systematic Review to inform the Australian Sedentary Behaviour Guidelines for Children and Young People. Report prepared for the Australian Government Department of Health, June 2012. Disponible en [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-pubhlth-strateg-phys-act-guidelines/\\$File/SR-ASBGCYP.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-pubhlth-strateg-phys-act-guidelines/$File/SR-ASBGCYP.pdf).

Olea N, Olea-Serrano F. Estrogens and the environment. 1996. *Cancer Prev J* 5, 1–6.

Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.* 1996 Mar;104(3):298-305.

Olea, N., Pazos, P., Fernández, M.F., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Pedraza, V., 1999. Phyto and mycoestrogens (Xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. *Med. Biol. Environ. Int. J.* 27, 55–60.

Olea N, Olea-Serrano F, Lardelli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol Ind Health.* 1999 Jan-Mar;15(1-2):151-8.

Olza J, Aranceta-Bartrina J, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G, Gil Á. Reported Dietary Intake, Disparity between the Reported Consumption and the Level Needed for Adequacy and Food Sources of Calcium, Phosphorus, Magnesium and Vitamin D in the Spanish Population: Findings from the ANIBES Study. *Nutrients.* 2017 Feb 21;9(2):168. doi: 10.3390/nu9020168.

OMS (2000). Comité de Expertos de la OMS sobre la obesidad: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. WHO technical report series, 894. Ginebra (Suiza).

OMS (2010). Promoción de alimentos y bebidas no alcohólicas dirigida a los niños. Disponible en <http://www.who.int/dietphysicalactivity/marketing-food-to-children/es/>.

OMS (2014). Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. Disponible en [http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood\\_why/es/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_why/es/)

OMS (2014). Noncommunicable diseases country profiles 2014 Publication date: July 2014. ISBN: 978 92 4 150750 9 NCD country profiles.

OMS (2015). Guideline: Sugars Intake for Adults and Children. Geneva: World Health Organization.

OMS (2016). Executive Board 138th session Geneva 25.30 January 2016. 6.3 Noncommunicable diseases. Disponible en [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB138/B138\\_1\(annotated\)-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB138/B138_1(annotated)-en.pdf)

OMS (2017). Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2017 Authors: World Health Organization Publication date: September 2017 English. ISBN: 978 92 4 151302 9.

Ortega Anta RM, López Sobaler AM. Influencia de la alimentación durante la infancia en enfermedades emergentes en la etapa adulta. En: Serra-Majem L, Aranceta-Bartrina J, editores. Nutrición infantil y juvenil. Barcelona: Masson; 2006. p. 1-11.

Ortega RM, López-Sobaler AM, Andrés P et al. (2016). DIAL software for assessing diets and food calculations. Department of Nutrition (UCM) & Alce Ingeniería. S.L. Madrid. Spain. Available at: <http://www.alceingenieria.net/nutricion/descarga.htm>.

Palacin-Arce A, Montegudo C, Beas-Jimenez Jde D, Olea-Serrano F, Mariscal-Arcas M. Proposal of a Nutritional Quality Index (NQI) to Evaluate the Nutritional Supplementation of Sportspeople. PLoS One. 2015 May 4;10(5):e0125630. doi: 10.1371/journal.pone.0125630.

Park SK, Son HK, Lee SK, Kang JH, Chang YS, Jacobs DR, Lee DH. Relationship between serum concentrations of organochlorine pesticides and metabolic syndrome among non-diabetic adults. J Prev Med Public Health. 2010 Jan;43(1):1-8. doi: 10.3961/jpmph.2010.43.1.1.

Patisaul, H.B., Jefferson, W., 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 400–419. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.03.003>.

Pereira-da-Silva L, Rêgo C, Pietrobelli A. The Diet of Preschool Children in the Mediterranean Countries of the European Union: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 8;13(6). pii: E572. doi: 10.3390/ijerph13060572.

Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V., Olea, N., 1998. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect.* 106, 167–174. doi:10.1289/ehp.98106167.

Pérez-Farinós N, López-Sobaler AM, Dal Re MÁ, Villar C, Labrado E, Robledo T, Ortega RM. The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:163687.

Pérez-Ferrer C, Barrientos-Gutierrez T, Rivera-Dommarco JA, Prado-Galbarro FJ, Jiménez-Aguilar A, Morales-Ruán C, Shamah-Levy T. Compliance with nutrition standards in Mexican schools and their effectiveness: a repeated cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2018 Dec 27;18(1):1411. doi: 10.1186/s12889-018-6330-8.

Pérez-Rodrigo C, Aranceta J. Nutrition education in schools: experiences and challenges. *Eur J Clin Nutr.* 2003 Sep;57 Suppl 1:S82-5. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601824.

Peña Quintana L, Ros Mar L, González Santana D, Rial González R. Alimentación del preescolar y escolar. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEPED;* 2010. p. 297-305.

Pillow, P.C., Duphorne, C.M., Chang, S., Contois, J.H., Strom, S.S., Spitz, M.R., Hursting, S.D., 1999. Development of a database for assessing dietary phytoestrogen intake. *Nutr. Cancer* 33, 3–19.

Pimpin L, Jebb S, Johnson L, Wardle J, Ambrosini GL. Dietary protein intake is associated with body mass index and weight up to 5 y of age in a prospective cohort of twins. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(2):389-97. doi:10.3945/ajcn.115.118612.

Porta M, Lee DH, Puigdomenech E. 2009. Transgenerational inheritance of environmental obesogens. *Occup Environ. Med.* 66:141–42.

Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-

GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect.* 2000 Jan;108(1):21-7.

Ramírez-Vélez R, Moreno-Jiménez J, Correa-Bautista JE, Martínez-Torres J, González-Ruiz K, González-Jiménez E, Schmidt-RioValle J, Lobelo F, Garcia-Hermoso A. Using LMS tables to determine waist circumference and waist-to-height ratios in Colombian children and adolescents: the FUPRECOL study. *BMC Pediatr.* 2017 Jul 11;17(1):162. doi: 10.1186/s12887-017-0919-4.

Rasmussen B, Gilbert E, Turki A, Madden K, Elango R. Determination of the safety of leucine supplementation in healthy elderly men. *Amino Acids.* 2016;48(7):1707-16. doi: 10.1007/s00726-016-2241-0.

Redondo M, Hernández-Aguado I, Lumbreras B (2018). The impact of the tax on sweetened beverages: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 1;108(3):548-563. doi: 10.1093/ajcn/nqy135

Reilly, J.J.; Dorosty, A.R.; Emmett, P.M. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. Identification of the obese child: adequacy of the body mass index for clinical practice and epidemiology. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(12):1623-7.

Ridley K, Olds TS. Assigning energy costs to activities in children: a review and synthesis. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40(8):1439-46. doi: 10.1249/MSS.obo13e31817279e.

Rietjens, I.M.C.M., Lousse, J., Beekmann, K., 2017. The potential health effects of dietary Phytoestrogens. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1263–1280. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.v174.11/issuetoc>.

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.* 2001Mar;109(3):185-97.

Rivas A, Lacroix M, Olea-Serrano F, Laíos I, Leclercq G, Olea N. Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Sep;82(1):45-53.

Rivas A, Monteagudo C, Heras-Gonzalez L, Mariscal-Arcas M, Lorenzo-Tovar ML, Olea-Serrano F. Association of bisphenol A exposure with dietary quality indices in Spanish schoolchildren. *Food Chem Toxicol.* 2016;94:25-30. doi: 10.1016/j.fct.2016.05.010.

Rivas A, Romero A, Mariscal M, Monteagudo C, Hernández J, Olea-Serrano F. Validation of questionnaires for the study of food habits and bone mass. *Nutr Hosp.* 2009 Sep-Oct;24(5):521-8.

Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Toledo, E., Delgado-Rodríguez, M., Gaforio, J.J., 2019. Naturally lignan-rich foods: a dietary tool for health promotion? *Molecules* 24, 917. <https://doi.org/10.3390/molecules24050917>.

Rodríguez Pérez MC, Cabrera De León A, Aguirre-Jaime A, Domínguez Coello S, Brito Díaz B, Almeida González D, Borges Alamo C, Castillo Rodríguez JC, Carrillo Fernández L, González Hernández A, Alemán Sánchez JJ. The waist to height ratio as an index of cardiovascular risk and diabetes. *Med Clin (Barc)*. 2010 Apr 3;134(9):386-91. Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2009.09.047.

Rodríguez-Rodríguez E, Aparicio A, Andrés P, Ortega RM. Moderate vitamin D deficiency and inflammation related markers in overweight/obese schoolchildren. *Int J Vitam Nutr Res.* 2014;84(1-2):98-107. doi: 10.1024/0300-9831/a000197.

Rubin, B.S., Schaeberle, C.M., Soto, A.M., 2019. The case for BPA as an obesogen: contributors to the controversy. *Front. Endocrinol.* 10, 30. doi:10.3389/fendo.2019.00030.

Saarinen, N.M., Bingham, C., Lorenzetti, S., Mortensen, A., Mäkelä, S., Penttinen, P., Sørensen, I.K., Valsta, L.M., Virgili, F., Vollmer, G., Wärri, A., Zierau, O., 2006. Tools to evaluate estrogenic potency of dietary phytoestrogens: A consensus paper from the EU Thematic Network "Phytohealth" (QLKI-2002-2453). *Genes Nutr.* 1 (3-4), 143-158. doi:10.1007/BF02829964.

Sánchez-Cruz JJ, Jiménez-Moleón JJ, Fernández-Quesada F, Sánchez MJ. Prevalence of child and youth obesity in Spain in 2012. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2013 May;66(5):371-6. doi: 10.1016/j.rec.2012.10.012.

Sánchez Echenique, M. (2012). Aspectos epidemiológicos de la obesidad infantil. *Pediatría Atención Primaria*, 14(Supl. 22), 9-14. doi:10.4321/S1139-76322012000200001.

Sánchez-Villegas, A.; Bes-Rastrollo, M.; Martínez-González, M.A.; Serra-Majem, L. Adherence to a mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: The SUN cohort. *Int. J. Obes.* 2006, 30, 350–358.

Santomauro F, Lorini C, Pieralli F, Niccolai G, Picciolli P, Vezzosi S, Bonaccorsi G. Waist-to-height ratio and its associations with body mass index in a sample of Tuscan children in primary school. *Ital J Pediatr.* 2017 Jun 7;43(1):53. doi: 10.1186/s13052-017-0372-x.

Saunders TJ, Gray CE, Poitras VJ, Chaput JP, Janssen I, Katzmarzyk PT, Olds T, Connor Gorber S, Kho ME, Sampson M, Tremblay MS, Carson V. Combinations of physical activity, sedentary behaviour and sleep: relationships with health indicators in school-aged children and youth. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016 Jun;41(6 Suppl 3):S283-93. doi: 10.1139/apnm-2015-0626.

Savva SC, Tornaritis M, Savva ME, Kourides Y, Panagi A, Silikiotou N, Georgiou C, Kafatos A. Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk factors in children than body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Nov;24(11):1453-8. doi: 10.1038/sj.ijo.0801401.

Schwartz C, King NA, Perreira B, Blundell JE, Thivel D. A systematic review and meta-analysis of energy and macronutrient intake responses to physical activity interventions in children and adolescents with obesity. *Pediatr Obes.* 2017;12(3):179-194. doi: 10.1111/ijpo.12124.

Scientific Committee on Food (SCF): Nutrient and Energy Intakes for the European Community. Opinion adopted by the SCF on 11 December 1992. In Reports of the SCF Series N° 31 (ed.): Luxemburg, European Commission, 1992.

Semba RD. The Rise and Fall of Protein Malnutrition in Global Health. *Ann Nutr Metab.* 2016;30;69(2):79-88.

Serra-Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra, Santana P, Peña Quintana L. [Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the EnKid study (1998-2000)]. *Med Clin (Barc).* 2003 Nov 29;121(19):725-32.

Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, García A, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J. Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutr.* 2004;7(7):931-5.

Serra-Majem Ll, Aranceta-Bartrina J, Mataix-Verdú J. *Nutrición y Salud Pública.* Masson. Barcelona, 2005.

Serra-Majem Ll. *Nutrición Basada en la Evidencia.* En: Clínicas Españolas de Nutrición (Volumen I). Aranceta J, Miján de la Torre A, Moreno-Villares JM (eds). Masson. Barcelona, 2005.

Serra-Majem L, Aranceta J. Objetivos nutricionales para la población española: Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) 2011. *Revista española de nutrición comunitaria*, 2011, vol. 17, no 4, p. 178-199.

Servicio Canario de la Salud - Dirección General de Salud Pública. Los selladores dentales. Programa de Salud Oral. Servicio de Promoción de la Salud. Disponible en <https://www3.gobiernodecanarias.org/sanidad/scs////content/348ceb36-2540-11e0-9151-6b8fe63b66f3/Selladores.pdf>.

Setayeshgar S, Maximova K, Ekwaru JP, Gray-Donald K, Henderson M, Paradis G, Tremblay A, Veugelers P. Diet quality as measured by the Diet Quality Index-International is associated with prospective changes in body fat among Canadian children. *Public Health Nutr.* 2017 Feb;20(3):456-463. doi: 10.1017/S1368980016002500.

Sjodin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Kronholm-Diab K, Jakobsson E, Bergman A. 1999. Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environ. Health Perspect.* 107:643-48.

Sklenickova, O., Flesar, J., Kokoska, L., Vlkova, E., Halamova, K., Malik, J., 2010. Selective growth inhibitory effect of biochanin A against intestinal tract colonizing bacteria. *Molecules* 15, 1270-1279. doi:10.3390/molecules15031270.

Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34:1033-49.

Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, Lizárraga A y cols. *Curvas y Tablas de crecimiento (estudios longitudinal y transversal)*. Instituto de Investigación sobre crecimiento y desarrollo. Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre. Bilbao, 2004.

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. 1991. p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92:167-73.

Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. 1992. An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: Colborn, T., Clement, C.R. (Eds.), *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: the Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Publishing, Princeton (NJ), pp. 295-309.

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 Oct;103 Suppl 7(Suppl 7):113-22. doi: 10.1289/ehp.95103s7113.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, 1973, vol. 51, no 5, p. 1409-1416.

Stahlhut R, van Wijngaarden E, Dye T, Cook S, Swan S. 2007. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ. Health Perspect.* 115:876–82

Stensland SH, Margolis S. Simplifying the calculation of body mass index for quick reference. *J Am Diet Assoc.* 1990 Jun;90(6):856. Erratum in: *J Am Diet Assoc* 1990 Oct;90(10):1372.

Stiglic N, Viner RM (2019) Effects of screentime on the health and well-being of children and adolescents: a systematic review of reviews. *BMJ Open* 3;9(1):e023191. doi: 10.1136/bmjopen-2018-023191.

Stricker, R., Eberhart, R., Chevailler, M.C., Quinn, F.A., Bischof, P., Stricker, R., 2006. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 883–887. doi:10.1515/CCLM.2006.160.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K. 2005. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 20:2325–29.

Surh, J., Kim, M.J., Koh, E., Kim, Y.K.L., Kwon, H., 2006. Estimated intakes of isoflavones and coumestrol in Korean population. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 325–344. <https://doi.org/10.1080/09637480600802348>.

Svensson A, Larsson C, Eiben G, Lanfer A, Pala V, Hebestreit A, Huybrechts I, Fernández-Alvira JM, Russo P, Koni AC, De Henauw S, Veidebaum T, Molnár D, Lissner L; IDEFICS consortium. European children's sugar intake on weekdays versus weekends: the IDEFICS study. *Eur J Clin Nutr.* 2014 Jul;68(7):822-8. doi: 10.1038/ejcn.2014.87.

Swainson MG; Batterham AM; Tsakirides C; Rutherford ZH; Hind K. Prediction of whole-body fat percentage and visceral adipose tissue mass from five anthropometric variables. *PLoS ONE.* 2017; 12(5): e0177175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177175>.

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr. J.* 51:165–69

Testa, I., Salvatori, C., Di Cara, G., Latini, A., Frati, F., Troiani, S., Principi, N., Esposito, S., 2018. Soy-based infant formula: are phyto-oestrogens still in doubt? *Front Nutr.* 23 (5), 110. doi:10.3389/fnut.2018.00110.

Thompson M, Ellison S, Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2002, vol. 74, no 5, p. 835-855.

Timmons BW, Naylor PJ, Pfeiffer KA. Physical activity for preschool children--how much and how? *Can J Public Health.* 2007;98 Suppl 2:S122-34.

Tognon G, Moreno LA, Mouratidou T, Veidebaum T, Molnár D, Russo P, Siani A, Akhandaf Y, Krogh V, Tornaritis M, Börnhorst C, Hebestreit A, Pigeot I, Lissner L; IDEFICS consortium. Adherence to a Mediterranean-like dietary pattern in children from eight European countries. The IDEFICS study. *Int J Obes (Lond).* 2014 Sep;38 Suppl 2:S108-14. doi: 10.1038/ijo.2014.141.

Torun B. Energy requirements of children and adolescents. *Public Health Nutr.* 2005;8(7A):968-93. doi: 10.1079/PHN2005791.

Townshend, T., Lake, A., 2017. Obesogenic environments: current evidence of the built and food environments. *Perspect Public Health* 137 (1), 38–44. doi:10.1177/1757913916679860.

Tremblay MS, LeBlanc AG, Kho ME, Saunders TJ, Larouche R, Colley RC, Goldfield G, Connor Gorber S. Systematic review of sedentary behaviour and health indicators in school-aged children and youth. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2011 Sep 21;8:98. doi: 10.1186/1479-5868-8-98.

Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ.* 1995 Dec 2;311(7018):1457-60. doi: 10.1136/bmj.311.7018.1457.

Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional mediterranean diet: An expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr. Rev.* 1997, 55, 383–389.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* 2003; 26;348:2599–608.

Trumbo PR, Rivers CR (2014) Systematic review of the evidence for an association between sugar-sweetened beverage consumption and risk of obesity. *Nutr Rev.* 72(9):566-74. doi: 10.1111/nure.12128.

Tur, J.A.; Serra-Majem, L.; Romaguera, D.; Pons, A. Does the diet of the Balearic population, a mediterranean type diet, still provide adequate antioxidant nutrient intakes? *Eur. J. Nutr.* 2005, 44, 204–213.

US Environ. Prot. Agency. 2000. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC). Washington, DC: U.S. Environ. Prot. Agency. Disponible en <http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/edspoverview/edstac.htm>.

US Environ. Prot. Agency. 2007. What is a pesticide? Disponible en <http://www.epa.gov/pesticides/about/>.

US Food and Drug Administration. Bisphenol A (BPA). Disponible en <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm064437.htm>.

Vafeiadi, M. Association of early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood. *Environmental Research* 146 (2016) 379–387.

Valentino, R., D'Esposito, V., Ariemma, F., Cimmino, I., Beguinot, F., Formisano, P., 2016. Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population? *J. Endocrinol. Investig.* 39 (3), 259–263. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0336-1>.

van de Gaar VM, van Grieken A, Jansen W, Raat H. Children's sugar-sweetened beverages consumption: associations with family and home-related factors, differences within ethnic groups explored. *BMC Public Health.* 2017 Feb 14;17(1):195. doi: 10.1186/s12889-017-4095-0.

van Sluijs EM, McMinn AM, Griffin SJ. Effectiveness of interventions to promote physical activity in children and adolescents: systematic review of controlled trials. *BMJ.* 2007; 6;335(7622):703. doi: 10.1136/bmj.39320.843947

Velasco J, Mariscal-Arcas M, Rivas A, Caballero ML, Hernández-Elizondo J, Olea-Serrano F. Assessment of the diet of school children from Granada and influence of social factors. *Nutr Hosp.* 2009;24(2):193-9.

Velázquez-López, L.; Santiago-Díaz, G.; Nava-Hernández, J.; Muñoz-Torres, A.V.; Medina-Bravo, P. Torres-Tamayo, M. Mediterranean-style diet reduces metabolic

syndrome components in obese children and adolescents with obesity. *BMC Pediatr.* 2014;14:175.

Velentzis, L.S., Woodside, J.V., Cantwell, M.M., Leathem, A.J., Keshtgar, M.R., 2008. Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know. *Eur. J. Cancer* 44 (13), 1799–1806. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.05.019>.

Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruíz de Almodovar, J.M., Pedraza, V., 1995. The E-Screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.* 103, 844–850. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103844>.

Wagner, J., Jiang, L., Lehmann, L., 2008. Phytoestrogens modulate the expression of 17 $\alpha$ -estradiol metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 625–632. doi:10.1007/978-0-387-69080-3\_65.

Webster, R.A., 2006. Reproductive function and pregnancy. In: McPherson, R.A., Pincus, M.R. (Eds.), *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, twenty-first ed. Saunders Elsevier, Philadelphia (PA) (Chapter 25).

Wells JC. Sexual dimorphism of body composition. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2007, 21(3):415-430.

WHO/FAO/UNU (World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations/United Nations University), 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No 935.

Widdowson EM. Nutritional requirement and its assessment, with special reference to energy, protein and calcium. *Bibl Nutr Dieta.* 1979;(28):148-54.

Willett WC. Epidemiologic studies of diet and cancer. *Prog Clin Biol Res.* 1990;346:159-68.

Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jun;61(6 Suppl):1402S-1406S. doi: 10.1093/ajcn/61.6.1402S.

Willett WC. *Nutritional epidemiology.* Oxford university press, 2012.

Wolff, M.S., Britton, J.A., Boguski, L., Hochman, S., Maloney, N., Serra, N., Liu, Z., Berkowitz, G., Larson, S., Forman, J., 2008. Environmental exposures and puberty in inner-city girls. *Environ Res.* Jul 107 (3), 393–400. doi:10.1016/j.envres.2008.03.006.

Xu, C., Liu, Q., Zhang, Q., Gu, A., Jiang, Z.Y., 2015. Urinary enterolactone is associated with obesity and metabolic alteration in men in the US National Health and Nutrition Examination Survey 2001-10. *Br. J. Nutr.* 28 (4), 683–690. <https://doi.org/10.1017/S0007114514004115>. 113.

Zimmers, S.M., Browne, E.P., O'Keefe, P.W., Anderton, D.L., Kramer, L., Reckhow, D.A., Arcaro, K.F., 2014. Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere* 104, 237–243. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12



# **ANEXO**





## The relationship of obesity with lifestyle and dietary exposure to endocrine-disrupting chemicals



L. Heras-González<sup>a</sup>, J.A. Latorre<sup>b</sup>, M. Martínez-Bebía<sup>b</sup>, D. Espino<sup>a</sup>, F. Olea-Serrano<sup>a,\*</sup>, M. Mariscal-Arcas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Group Nutrition, Diet and Risk Assessment (AGR-255), Department of Nutrition and Food Science, University of Granada, Campus of Cartuja s/n, 18071, Granada, Spain

<sup>b</sup> Department of Food Technology, Nutrition and Food Science, Faculty of Health Science, University of Murcia, Lorcó, Murcia, Spain

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
BPA exposure  
Phytoestrogens exposure  
Obesogenic effects

### ABSTRACT

Phytoestrogens are natural components of plants, including numerous foods that form part of the habitual diet of humans and animals. They have similar estrogenic effects to those of synthetic endocrine disruptors such as monomers of plastic materials, e.g., polycarbonates and epoxy resins. The most frequently used monomer is bisphenol A (BPA), which has been found to migrate from drink and food packaging, plastic baby bottles, and the coating of cans. Numerous studies have associated exposure to endocrine disruptors with obesity, classifying them as obesogens. The objectives of this study were to estimate the dietary exposure to phytoestrogens and BPA in a group of Spanish schoolchildren and to estimate their potential obesogenic effects. The diet of this population of healthy Spanish children was estimated to have a mean total estrogenic capacity of  $5.10^{-12}$  M eq.E2 (5 pmol/day). The effects of this additional estrogenic burden are highly controversial, and no definitive conclusion has been reached. Thus, some authors consider exposure to these substances with estrogenic activity to be positive at certain stages of life, whereas others regard it as posing a risk at any age. In the present population of children, the likelihood of normal weight versus obesity was significantly related to the total proliferative effect (OR = 0.51,  $p = 0.026$ ) as well as to the energy expenditure on physical activity, with lesser activity implying a greater risk of obesity (OR = 13.54,  $p = 0.001$ ). Further research is warranted on the obesogenic effects of exposure to endocrine disruptors present in foods.

### 1. Introduction

Phytoestrogens are natural components of plants, including numerous foods that form part of the habitual diet of humans and animals (Mäkelä et al., 1995; Olea et al., 1999; Hernandez-Ellizondo et al., 2013; Křiváková et al., 2019). According to the UK Food Standards Agency (2003), phytoestrogens are defined as any plant, substance, or metabolite that induces biological responses in vertebrates and which can mimic or modulate the action of endogenous estrogens, usually by binding to estrogen receptors. There are various families of phytoestrogens, including lignans, isoflavones, coumestans, and resorcylic acid lactones, although this last group is less important in human nutrition. Isoflavones such as genistein and daidzein appear to be the most potent group and are found in a wide range of foods, notably cereals, pulses, vegetables, and fruit, with soy being the most abundant source for humans (Knight and Eden, 1996; Agradi et al., 2006; Rodríguez-García et al., 2019).

The hormonal activity of these substances has long been known (Kaddas and Hughes, 1989; Wagner et al., 2008; Rietjens et al., 2017), and they have been found to exert estrogenic and/or anti-estrogenic effects in farm and wild animals, in *in vivo* and *in vitro* assays, and in humans (Mäkelä et al., 1995; Dixon, 2004; Saartinen et al., 2006; Jiang et al., 2010). Although humans and animals have adapted to phytoestrogens through evolution, exposure to high concentrations of some of these compounds may be associated with alterations in hormone production, metabolism or action at cell level (Albertazzi and Pardi, 2008; Kwack et al., 2009; Costa et al., 2014) and in protein synthesis, malignant cell proliferation, or angiogenesis, among others (Adlercreutz and Mazur, 1997; Desmawati and Sulastri, 2019; Hall et al., 2019). It has been postulated that the high incidence of hormone-dependent cancers and other diseases in Western societies may be related to the decrease in fruit and vegetable consumption over the past 30–50 years (Adlercreutz, 1995; Bhalita et al., 2005).

*In vitro* assays have demonstrated that certain phytoestrogens have

\* Corresponding author. Department of Nutrition and Food Science (University of Granada), Campus de Cartuja s/n, 18071, Granada, Spain.  
E-mail address: [folea@ugr.es](mailto:folea@ugr.es) (F. Olea-Serrano).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110983>

Received 27 April 2019; Received in revised form 14 November 2019; Accepted 17 November 2019

Available online 20 November 2019

0278-6915/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

agonistic estrogenic activity at low concentrations, stimulating the proliferation of mammary cells and the expression of estrogen-dependent genes, and can antagonize the effect of natural hormones at high concentrations (Soto et al., 1992). The estrogenic effect of phytoestrogens can be agonist or antagonist depending not only on their tissue concentrations but also on the levels of endogenous estrogens present at different stages of human life (Bhakta et al., 2005).

The dietary intake of phytoestrogens has been reported to be < 1 mg day<sup>-1</sup> in Spain, Germany, England and the United States (Bhakta et al., 2005; Mulligan et al., 2007; Hernández-Elizondo et al., 2009), slightly higher (< 1.34 mg day<sup>-1</sup>) in Canada and Scotland (Cotterchio et al., 2006; Heald et al., 2006), and considerably higher (> 20 mg day<sup>-1</sup>) in Japan and Korea, attributable to the elevated consumption of soy derivatives such as natto, miso and tofu (Suh et al., 2006).

Our research group has published numerous studies on the estrogenic effect of synthetic and natural molecules that form part of foods, either as a natural component, especially in vegetables, or due to their contamination. Many of these molecules have been classified as endocrine disrupters after analyses of their behavior in biological media *in vitro* and *in vivo* (Olea and Olea-Serrano, 1996; Perez et al., 1998; Lopez-Espinosa et al., 2009; Wolff et al., 2008). Their estrogenic effects are similar to those of synthetic endocrine disrupters such as monomers of plastic materials, e.g. polycarbonates and epoxy resins. The most frequently used monomer is bisphenol A (BPA), which has been found to migrate from drink and food packaging, plastic baby bottles, and the coating of cans (Binstons et al., 1995; Mariscal-Arcas et al., 2009; Gonzalez Castro et al., 2011; García-Córcoles et al., 2018). Human exposure to BPA is universal, and non-conjugated BPA molecules have been consistently detected in human biological samples (blood, tissues, urine, and milk) (Gerona et al., 2013; Li et al., 2013; Zimmers et al., 2014; Hines et al., 2015; Niu et al., 2017). The estrogenic properties of BPA were first reported in 1936 (Dudds, 1936). Numerous studies have associated exposure to endocrine disrupters with obesity, classifying them as obesogens (Fisher et al., 2016; Townshend and Lake, 2017; Rubin et al., 2019).

This study describes a technique for estimating the estrogenic effect of diet as a function of its isoflavone content. A food frequency questionnaire (FFQ) is used to collect data on the dietary intake of phytoestrogens and of BPA from canned food, and the E-screen test is applied to establish the estrogenicity of the endocrine disrupters consumed. The study objectives were to estimate the dietary exposure of Spanish children aged 7–10 years to phytoestrogens and BPA and to evaluate their potential obesogenic effects.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

The study included 657 schoolchildren (53.5% girls) aged between 7 and 10 years (inclusive) from educational centers in two provinces of Southern Spain (Granada and Málaga). From the initial sample of 700 individuals, 42 (6%) were excluded for incomplete questionnaires. Written informed consent was obtained from parents/guardians of all participants in the study, which was approved by the research ethics committee of the Andalusian Public Health Service.

### 2.2. Materials

Participants completed an encoded questionnaire with four sections. Section A gathered data on sex, age, educational center, school year, and life and family habits, among others; Section B was a semi-quantitative FFQ with reference to the previous 12 months, recording the frequency (times/month, week, or day) and amount (weight/portions) of food consumption; the energy intake was calculated from these data using the Dial program (Copyright © 2015 Alce Ingeniería) (Ortega et al., 2016). Section C was an open-format 24-h recall questionnaire of

physical activity during the previous year, including hours of physical activity in a complete day, the characteristics of sports practiced (type of exercise, frequency of exercise practice, mean duration of each exercise session), hours of sleep, method of going to school (walking, car, bicycle, etc.), and hours/week of physical education in school. Section D collected data on: weight (kg), with a floor scale (model SECA 872; Hamburg, Germany) barefoot and in light clothes; height (m), with a stadiometer (model SECA 214 (20–207 cm); and waist circumference (cm), with a measuring tape (model SECA 201) in accordance with the CDC Anthropometry Procedures Manual (<https://www.cdc.gov/nchs/data/pdf/>); body fat % was calculated using the equations proposed by Marrodán et al. (2014). Each participant was then classified as normal weight, overweight, or obese according to the BMI-based classification of Cole and Lobstein (2012).

The intake of isoflavones (daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, coumestrol, matiresinol, secoisoesinol, enterolactone, and enterodiol) in the daily diet was estimated from published reports on their content in foods (Pillow et al., 1999; Horn-Bloss et al., 2000; Baker et al., 2002). The daily phytoestrogen intake (mg day<sup>-1</sup>) was calculated by multiplying the amount of food (g day<sup>-1</sup>) gathered in the FFQ by the corresponding phytoestrogen value.

### 2.2.1. Estrogenic activity of phytoestrogens and BPA

Chemicals used as standards for the analysis were genistein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), daidzein, formononetin, biochanin A, coumestrol, matiresinol, secoisoesinol, enterolactone, and enterodiol (Fluka, St. Louis, MO, USA). Bisphenol A (BPA) was supplied by SIGMA-Aldrich\* (Munich, Germany), including BPA ( $\geq 99\%$ ; CAS: 80-05-7). Stock solutions of chemicals were prepared in ethanol and stored in a cold room. Working solutions were prepared daily as needed by diluting the stock solution with Chromasolv\* for HPLC ( $\geq 99\%$  ethanol).

Estrogenicity assays were conducted using the platform of the scientific-technical unit of the Bihealth Research Institute of Granada under the supervision of Dr. N Olea. Briefly, cloned MCF-7 cancer cells were grown for routine maintenance in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DME) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (BioWittaker, Walkersville, MD, USA) in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air under saturating humidity at 37 °C. The cells were subcultured at weekly intervals using a mixture of 0.05% trypsin and 0.01% EDTA. Sex steroids were removed from serum by charcoal-dextran stripping. Briefly, a suspension of 5% charcoal (Norit A, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) with 0.5% dextran T-70 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) was prepared. Aliquots of the charcoal-dextran suspension of the same volume as the serum aliquot to be processed were centrifuged at 1000 g for 10 min. Supernatants were aspirated, and serum aliquots were mixed with the charcoal pellets. This charcoal-serum mixture was maintained in suspension by rolling at six cycles min<sup>-1</sup> at 37 °C for 1 h. The suspension was centrifuged at 1000 g for 20 min, and the supernatant was then filtered through a 0.22 µm filter (Millipore, Billerica, MA, USA). Charcoal dextran-treated bovine and human serum (CDFBS and CDHuS, respectively) were stored at -20 °C until needed. MCF7 cells were used for the estrogenicity test, which was a slight modification (Villalobos et al., 1995) of the original technique (Soto et al., 1992). Briefly, cells were trypsinized and plated in 24-well plates (Limbro, McLean, VA, USA) at initial concentrations of 20,000 cells per well in 5% FBS in DME. Cells were allowed to attach for 24 h, and the seeding medium was then replaced with 10% CDFBS or CDHuS-supplemented phenol red-free DME.

Different concentrations of products were added, and the assay was stopped after 144 h by removing medium from the wells, fixing the cells, and staining them with sulforhodamine-B (SRB) as described elsewhere (Olea and Olea-Serrano, 1996; Perez et al., 1998). The linearity of the SRB assay with cell number was verified before the cell growth experiments. The 100% proliferative effect (PE) was calculated as the ratio between the highest cell yield obtained with 50 pM estradiol and the proliferation of hormone-free control cells. Each isoflavone

**Table 1**  
Estrogenicity of phytoestrogens and BPA potentially ingested by the population.

Product	Maximum proliferative effect concentration	Proliferative effect
Positive control E2 ( $1 \times 10^{-12}$ M)	$1 \times 10^{-12}$ M	$6.61^* \pm 0.30$
Negative control (Culture medium)	-	$1.00 \pm 0.14$
Daidzein	$1 \times 10^{-5}$ M	$5.60^* \pm 1.14$
Genistein	$1 \times 10^{-5}$ M	$6.37^* \pm 0.12$
Formononetin	$1 \times 10^{-5}$ M	$6.53^* \pm 1.25$
Biochanin A	$1 \times 10^{-5}$ M	$7.11^* \pm 1.32$
Coumestrol	$1 \times 10^{-5}$ M	$3.09^* \pm 0.18$
Matairesinol	$1 \times 10^{-5}$ M	$1.59^* \pm 0.14$
Enterolactone	$1 \times 10^{-5}$ M	$1.16 \pm 0.05$
Enterodiol	$1 \times 10^{-5}$ M	$1.62 \pm 0.04$
BPA	$1 \times 10^{-5}$ M	$6.20^* \pm 0.33$

\*Significant difference versus negative control, estimating a growth = 1;  $p < 0.05$ .

and BPA was run in triplicate with a negative (vehicle) and positive (50 pM estradiol) control in each plate. The PE of the isoflavone standard was referred to the maximal PE obtained with estradiol, transformed into estradiol equivalent units (Eq.), and expressed as nM concentration by reading from a dose-response curve prepared using estradiol (concentration range of 1 pM–10 nM). Mean cell numbers did not significantly differ from those in steroid-free controls at concentrations  $< 1$  pM estradiol, equivalent to 1 fmol in 1 ml of culture medium. Therefore, 1 fmol estradiol per well was considered the lowest detectable amount of estrogen in this assay (Table 1).

MCF-7 cells were treated with these compounds at the reported concentrations. The results are expressed as the maximum cell proliferation rate induced by the sample (proliferative effect), calculated as the relationship between the maximum proliferation rate obtained for the sample and the proliferation rate reached by the negative control.

A previously published methodology (Rivas et al., 2016; García-Córcobes et al., 2018) was used to evaluate BPA concentrations in 50 samples from: cans of tuna, corn, fruit in syrup; polymer packages of pasta (noodles) and rice (for microwave cooking); and plastic packaging of fruit juice and soft drinks. The foods identified from questionnaire results were purchased locally.

#### 2.2. Statistical analysis

SPSS version 22.0 (IBM, Chicago, IL) was used for the statistical analysis. After a descriptive analysis to calculate means, standard deviations, and median, maximum, and minimum values. A *t*-test, ANOVA, and logistic regression analysis were conducted as specified in table footnotes.  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

At the ages of these children, hardly any have started puberty, producing a homogeneity in their body composition in relation to weight, height, BMA, and waist-height ratio. The age ranges were classified according to recommendations for age intervals by sex in the European Union (Cuervo et al., 2009), while the classification of normal weight and overweight followed the proposals of Cole and Lobstein (2012). Table 2 lists the characteristics of the study population (aged between 7 and 10 yrs). The mean (SD) BMI was  $18.74 \text{ kg/m}^2$  (3.17), and 10.9% of the children were obese.

The composition of foods in their diet was estimated from food composition tables, which are compiled in each country. However, these tables rarely report on the presence of specific components, as in the case of phytoestrogens from vegetables. The foods consumed by the children, expressed in g/day, were estimated from the semi-quantitative FFQ that they completed. For each food, the presence of each type

**Table 2**  
Population characteristics. Anthropometric measurements and macronutrient and energy intake estimated based on the semi-quantitative FFQ.

	Media	Median	SD	Minimum	Maximum
Age (yrs)	9.03	9.00	0.97	7.00	10.00
Weight (Kg)	35.12	33.43	8.91	17.86	72.30
Height (m)	1.36	1.36	0.08	1.12	1.69
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	18.75	18.34	3.18	11.24	31.88
Waist circumference (cm)	63.99	62.00	8.53	32.10	104.00
Waist-to-height ratio	0.47	0.46	0.05	0.22	0.73
% participants in each BMI category	Normal weight	Over weight	Obesity		
	62.3	26.8	10.9	$p < 0.001$	

of phytoestrogen is estimated from data published in the literature (Boher et al., 2002). Table 3 exhibits the mean intake (in g/day) of the foods consumed and the estimated mean intake ( $\mu\text{g/day}$ ) of the corresponding phytoestrogens. Table 4 summarizes the intake by the study population of phytoestrogens and BPA. Based on the values displayed in Table 1, the proliferative effect (PE) of each endocrine disruptor was estimated as a function of its intake. Table 5 reports data on the subsequent calculation of the PE and therefore estrogenic effect of the studied products, and it expresses in  $\mu\text{M}$  the amount of phytoestrogens and BPA that generate this estrogenic response. The table also summarizes the total PE corresponding to their dietary exposure to phytoestrogens and BPA. It can be expressed as estradiol equivalents (Eq E2), with a mean value of  $5.10^{-12}$  M, which represents the estimated value of the estrogenicity to which this population is daily exposed from their habitual diet. When the estimated total PE was considered as a continuous variable, it significantly differed between children with normal weight and obese children ( $p = 0.05$ , non-parametric Mann-Whitney *U* test).

The classification of the population according to their BMI as normal weight, overweight, or obese allows analysis of the influence on weight status of their dietary exposure to phytoestrogens and BPA. The energy expenditure resulting from their daily activity was also examined, based on the results of a questionnaire on their physical activities during a 24-h period. Thus, Table 6 analyzes the MET values for hours of physical education and sports and sedentary hours per day along with the total PE, showing that the PE influenced the obesity of the population, while the other variables exerted a protective effect against this condition. In the present sample of children, the likelihood of normal weight versus obesity was significantly related to the total PE observed (OR = 0.51,  $p = 0.026$ ) and to the energy expenditure on physical activity, with lesser activity increasing the risk of obesity (OR = 13.54,  $p = 0.001$ ).

### 4. Discussion

The diet of this population of healthy Spanish children was estimated to have a mean total estrogenic capacity of  $5.10^{-12}$  M eq.E2/day (5 pmol/day). The mean estrogenic burden due to the dietary intake of isoflavones was elevated and equivalent to the hormonal capacity of the individuals themselves, who produce between 0.3 and 597.14 pmol/day according to their age and other factors (Stricker et al., 2006; Webster, 2006). The effects of this additional burden are highly controversial, with exposure to phytoestrogens being considered positive at certain stages of life (e.g., menopause) by some authors but a risk at any age by others (Velentzis et al., 2008) (Patisaul and Jefferson, 2010).

Many phytoestrogens are considered endocrine disruptors and may therefore have a potentially adverse impact on health (Frankenfeld, 2013; Xu et al., 2015; Testa et al., 2018). In recent years, exposure to

**Table 3**  
Mean intake of foods potentially rich in phytoestrogens and the mean value expressed in µg/day of the schoolchildren.

Food (g/d)	Max.	Median	Mean	SD	Mean (µg)							
					Daidzein	Genistein	Femomonein	Biochanin A	Coumestrol	Matairesinol	Enterolactone	Enterodiol
Bread	211	120	111.79	51.411	0.007	0.007				5.042		
Biscuits	130	44.4	39.924	28.147	0.003	0.003				1.801	0.123	2.430
Cereals	70	0	23.679	26.721							2.450	0.382
Sun	160	14	30.835	43.659	0.002	0.002	1.391					
Pasta	36	14	18.981	9.919	0.002	0.002				1.225	64.751	12.446
Rice	36	19.6	15.923	9.115						0.002		
Pizza	50.4	256	21.645	14.554	0.279	0.084				0.518	1.253	0.913
Juice	1000	0	294.25	246.629	0.824	0.200					28.672	23.328
Jam	30	42	0.325	3.106	0.000	0.002				0.004	0.086	0.094
Boiled Veget	108	150	45.482	36.823	0.007	0.184	0.000	0.000		0.015	5.049	5.558
Salad	300	8.4	144.83	110.406	0.152	0.371	21.073	0.014	0.452		78.208	65.173
Legumes	21.6	0.00	12.926	7.698	0.132	6.418	6.995	0.110		0.005	0.226	1.777
Apple	400	0.00	97.002	128.833	2.205	0.010					22.981	0.970
Banana	300	0.00	49.117	85.496	0.147	1.424					13.262	5.894
Tangerine	300	0.00	16.419	54.839	0.049	0.476					4.433	5.894
Kiwi	150	0.00	4.869	20.602						0.067		
Peach	13.5	0.00	0.438	2.394	0.002	0.004					0.206	0.429
Orange	400	0.00	44.099	97.472							11.907	5.292
Strawberry	300	0.00	17.017	57.434	0.085	0.783				9.720	6.977	6.466
Pear	300	0.00	36.172	73.432	0.018	0.317					40.512	24.958
Mixed fruit	450	0.00	73.611	138.502	40.512	24.958					22.451	10.305

\*Composition of salad: lettuce, cucumber, tomato, carrots, green pepper, red pepper, onion, spinach; \*\*Composition of boiled vegetables: cabbage, cauliflower, broccoli, green string beans, green peas, green beans.

**Table 4**  
Total estimated intake (µg/day) of each phytoestrogen and BPA.

Total (µg/day)	Minimum	Median	Maximum	Mean	SD
Daidzein	0.007	3.022	13.206	4.205	2.972
Genistein	0.007	11.156	34.656	10.740	5.691
Femomonein	0.000	26.371	62.556	29.459	17.257
Biochanin A	0.000	0.101	0.214	0.124	0.068
Coumestrol	0.000	0.468	0.936	0.452	0.344
Matairesinol	0.794	8.864	16.791	8.910	2.895
Enterolactone	4.139	305.106	754.629	313.425	132.199
Enterodiol	0.645	148.572	440.739	169.882	81.902
BPA from packaging	0.508	1.453	2.815	1.661	0.638

**Table 5**  
Proliferative effect (PE) of each phytoestrogen and BPA estimated from the intake of each compound.

	Mean	Median	SD	Min	Max	
Daidzein	µM	0.017	0.012	0.012	0.000	0.052
PE	0.010	0.007	0.007	0.000	0.032	
Genistein	µM	0.040	0.041	0.021	0.000	0.128
PE	0.026	0.027	0.014	0.000	0.083	
Femomonein	µM	0.110	0.098	0.065	0.000	0.213
PE	0.059	0.053	0.035	0.000	0.126	
Biochanin A	µM	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001
PE	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Coumestrol	µM	0.002	0.002	0.001	0.000	0.004
PE	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	
Matairesinol	µM	0.025	0.025	0.008	0.002	0.047
PE	0.004	0.004	0.001	0.000	0.008	
Enterolactone	µM	1.056	1.030	0.445	0.014	2.547
PE	0.127	0.124	0.053	0.002	0.306	
Enterodiol	µM	0.561	0.558	0.270	0.002	1.468
PE	0.067	0.067	0.032	0.000	0.175	
BPA	µM	0.007	0.006	0.003	0.000	0.012
PE	0.005	0.004	0.002	0.000	0.008	
Total PE	0.299	0.298	0.119	0.008	0.660	
Total Eq E2	5.10 <sup>-12</sup> M					

PE = Proliferative effect.

**Table 6**  
Factors that permit predicting normal weight or obesity in participants.

Normal weight/obesity	B	Sig.	OR	95% CI for OR	
				Lower	Upper
PE total (median) ref. > median	-0.683	0.026	0.505	0.277	0.921
Hours of Physical Education ref. > median	0.331	0.132	1.393	0.818	2.371
Spent/day MET ref. > median	0.712	0.050	2.038	0.827	5.027
MET sedentary/day ref. < median	2.606	0.001	13.538	6.389	28.688

PE = Proliferative effect.

endocrine disruptors has been associated with the polymeric packaging of foods and with the phytoestrogens they contain. The relationship of exposure with negative or positive effects is likely complex and may depend upon age, health status, and even the presence or absence of specific gut microflora (Adkinson et al., 2005; Larrosa et al., 2006; Sklenickova et al., 2010; Kolářová et al., 2018). Phytoestrogens are present in numerous vegetables that are consumed every day, as confirmed in the present FFQ results (Baker et al., 2002). The effects of endocrine disruptors on infants and children have not been elucidated, and it has not been definitively demonstrated that isoflavones or other synthetic estrogens (e.g., BPA) exert obesogenic effects; however there is considerable scientific evidence that points in this direction (Walf et al., 2008; Li et al., 2013; Frankenfeld, 2013; Valentino et al., 2016).

The present results were obtained in healthy children not receiving estrogen supplements, and caution should be taken in extrapolating these findings to the general population. This study contributes novel data on the dietary intake of phytoestrogens by this age group, and on its estrogenicity, as estimated using the E-screen test with cell proliferation as endpoint. Data on the intake of specific populations may help to establish the true implications of phytoestrogen consumption for human health. In the present population of children, the likelihood of normal weight versus obesity was significantly related to the total proliferative effect observed (OR = 0.51, p = 0.026) and to the energy expenditure on physical activity, with lesser activity increasing the risk

of obesity (OR = 13.54,  $p = 0.001$ ). Further research is warranted on the obesogenic effects of exposure to endocrine disruptors present in foods.

#### Funding

This study was supported by the Andalusian Regional Government (Nutrition, Diet, Risks Assessment; AGR255) and FEDER-ISCIII PI14/01040.

#### Author contributions

The study was designed by F Olea-Serrano and M Mariscal-Arcas; data were collected and analyzed by JA Latorre, L Heras-González, M Martínez-Bebia, D Espino, M Mariscal-Arcas; data interpretation and manuscript preparation were undertaken by, F Olea-Serrano, JA Latorre, and M Mariscal-Arcas.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

The authors thank Layla Davies-Jimenez and Richard Davies for assistance with the English version. This paper will be part of Leticia Heras-González's doctoral thesis. Being completed as part of the "Nutrition and Food Sciences Program" at the University of Granada, Spain.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110983>.

#### References

- Adlercreutz, H., 1995. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 103–112.
- Adlercreutz, H., Mazur, W., 1997. Phytoestrogens and western diseases. *Ann. Med.* 29, 95–120.
- Agnafri, E., Vogens, E., Siriti, A., Fico, G., Regondi, S., Terzi, F., 2006. Traditional healthy Mediterranean diet: nitrogenic activity of plants used as food and flavoring agents. *Phytother. Res.* 20, 670–675.
- Alberswaart, P., Purdie, D.W., 2008. Reprint of the nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Matanzas* 61, 214–226.
- Akinnusi, C., Frankenfeld, C.L., Lampe, J.W., 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med.* 230, 135–139.
- Bhakta, D., dos Santos Silva, I., Higgins, C., Sevak, L., Kassam-Elhamid, Y., Marghani, P., Adlercreutz, H., McMichael, A., 2005. A semi-quantitative food frequency questionnaire is a valid indicator of the usual intake of phytoestrogens by south Asian women in the UK relative to multiple 24-h dietary recalls and multiple plasma samples. *J. Nutr.* 135, 116–123. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.116>.
- Bokor, L.K., Van der Schouw, Y.T., De Kleijn, M.J.J., Jacques, P.F., Geubbels, D.E., Pooters, P.H.M., 2002. Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *J. Nutr.* 132, 1319–1328. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.1319>.
- Bronzo, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N., 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* Jun 103 (6), 608–612. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103608>.
- Cole, T.J., Lobstein, T., 2012 Aug. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr. Obes* 7 (4), 284–294. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00664.x>.
- Cottarelli, M., Bouchez, B.A., Manns, M., Gallinger, S., Okey, A., Harper, P., 2006. Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk. *J. Nutr.* 136, 3046–3053.
- Carro, M., Cufiñal, M., Baladrà, E., Calvezon, L., Fontegrosa, X., Iglesias, C., Lorenzo, E., Peláez, I., Quiles, J., Romero de Ávila, M.D., Barceño, G., 2009. Villano A Martínez JA Compendio de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) de los alimentos países de la Unión Europea, de Estados Unidos (EEUU) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS). *Nutr. Hosp.* 24 (4), 384–414 ISSN 0212-1611.
- Desmawati, D., Sulastri, D., 2019 Feb 15. Phytoestrogens and their health effect. *Open Access Maced J Med Sci* 7 (3), 495–499. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.086>.
- Dixon, R.A., 2004. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 225–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.55.031003.141720>.
- Dodds, E.C., 1936 Apr. The pharmacological action and clinical use of drugs with a camphor- and creatinine-like action: (serfinin in therapeutics and pharmacology). *Proc. R. Soc. Med.* 29 (8), 685–697.
- Faberg, M., Maximino, P., Kain, J., Kovalkys, I., Prédari (Rio J), J., 2016. Obesogenic Environment - Interventional Opportunities May-Jun, vol. 92 pp. 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.007>. 3 Suppl 1.
- Food Standard Agency, 2003. Phytoestrogens and Health. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Food Standard Agency, London (UK).
- Frade-Costa, E.M., Spreiter, P.M., Hohl, A., Bachege, T.A.S.S., 2014. Effects of Endocrine Disruptors in the Development of the Female Reproductive Tract. *Ann. Rev. Endocrinol. Metab.* [https://doi.org/10.1590/0004-273005003021\\_54/2\\_153](https://doi.org/10.1590/0004-273005003021_54/2_153).
- Frankenfeld, C.L., 2013. Relationship of obesity and high urinary enterolignan concentrations in 6806 children and adults: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey data. *Ear J Clin Nutr.* Aug 67 (8), 887–889. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.107>.
- García-Garcías, M.T., Giza, M., Rodríguez-Gómez, R., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Vilches, J.L., Zafra-Gómez, A., 2018 Feb 1. Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 178, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.067>.
- Gerona, R.R., Woodruff, T.J., Dickerson, C.A., Pan, J., Schwartz, J.M., Sen, S., Frierson, M.W., Fujimoto, Y.Y., Han, P.A., 2013. Bisphenol-A (BPA) BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environ. Sci. Technol.* 47 (21), 12477–12485. <https://doi.org/10.1021/es402764k>.
- González-Castro, M.I., Olea-Serrano, M.F., Rivas-Velasco, A.M., Medina-Biverri, E., Ordóñez-Acevedo, L.G., De León-Rodriguez, A., 2011. Phthalates and bisphenols migration in Mexican food can and plastic food containers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86 (6), 627–631. <https://doi.org/10.1007/s12012-011-0286-3>.
- Hall, J.M., Purohit, A.H., Raju, L., Korach, K.S., 2019. The role of dietary phytoestrogens and the nuclear receptor PPAR $\alpha$  in adipogenesis: an in vitro study. *Environ. Health Perspect.* 127 (3). <https://doi.org/10.1289/ehp.2019.127.344>.
- Heald, C.L., Bulow-Smith, C., Ritchie, M.H., Morton, M.S., Alexander, P.R., 2006. Phytoestrogen intake in Scottish men: use of serum to validate a self-administered food frequency questionnaire in older men. *Br. J. Clin. Nutr.* 60, 129–135. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602277>.
- Hernández-Elizondo, J., Montegudo, C., Murcia, M.A., Olea, N., Olea-Serrano, F., Mariscal-Arcas, M., 2013. Assessment of the estrogenicity of the diet of a healthy female Spanish population based on its isoflavone content. *Food Addit. Contam. A* 30 (4), 627–633. <https://doi.org/10.1080/10440049.2013.775604>.
- Hernández-Elizondo, J., Mariscal-Arcas, M., Rivas, A., Periche, B., Velasco, J., Olea-Serrano, F., 2009. Exposure to phytoestrogen intake through diet in a sample of females. *Nutr. Hosp.* 24, 445–451.
- Hines, E.P., Menéndez, P., von Ehrenstein, O.S., Ye, X., Calafat, A.M., Fenton, S.E., 2015 Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. *Reprod. Toxicol.* Jul;54(120–128). [doi:10.1016/j.reprotox.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.11.006).
- Hunt-Russ, P.L., Barrow, R., Lee, M., Cozzani, L., Mandel, L.E., Koo, J., John, E.M., Smith, J., Smith, M., 2005. Assessing phytoestrogen exposure in epidemiological studies: development of a database (United States). *CCC (Cancer Causes Control)* 11, 289–298.
- Jiang, Q., Peyton-Stewart, F., Elliott, S., Driver, J., Rhodes, L.V., Zhang, Q., Zheng, S., Bhatnagar, D., Buz, S.M., Collins-Barrow, B.M., et al., 2016. Effects of 7-O-substitutions on estrogenic and anti-estrogenic activities of daidzein analogues in MCF-7 breast cancer cells. *J. Med. Chem.* 26 (16), 6153–6163. <https://doi.org/10.1021/jm109619e>.
- Kaldas, R.B., Hughes, C.L., 1989. Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod. Toxicol.* 3, 81–88.
- Knight, D.C., Eden, J.A., 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* 87, 887–904.
- Kušinová, L., Lapčák, O., Šedláková, L., 2018. Phytoestrogens and the intestinal Microbiome. *Physiol. Res.* 67 (Suppl. 3), S401–S408.
- Křížová, L., Dušková, K., Kalpárková, J., Kalpárský, T., 2019. Isoflavones. *Molecules* 24, 1076. <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>.
- Kwak, S.J., Kim, E.B., Kim, H.S., Yoon, K.S., Lee, B.M., 2009. Risk assessment of soybean-based phytoestrogens. *J. Toxicol. Environ. Health* 72 (21–22), 1254–1261. <https://doi.org/10.1080/152875909032212212>.
- Larrosa, M., González-Santas, A., García-García, M.T., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2006. Umbelliferone, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1611–1620.
- Li, D.K., Miao, M., Zhou, Z., Wu, C., Shi, H., Liu, X., Wang, S., Yuan, W., 2013. Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school-age children. *PLoS One* 12 (6), e65399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160399>.
- Makela, S., Saastri, R., Salo, L., McLachlan, J.A., 1995. Phytoestrogens are partial estrogen agonist in the adult male mouse. *Environ. Health Perspect.* 103, 123–127. <https://doi.org/10.1289/ehp.103-123-127>.
- Mariscal-Arcas, M., Rivas, A., Grneda, A., Montegudo, C., Murcia, M.A., Olea-Serrano, F., 2009. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem. Toxicol.* 47 (2), 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.011.37>.

- Marmán, M., Álvarez, J.M., de Espinosa, M.G., Carmenate, M., López-Ejeda, N., Cabañas, M., Pacheco, J., Mesa, M., Romero-Collazo, J., Prado, C., Villarino, A., 2014. Predicting percentage body fat through waist-to-height ratio (WHtR) in Spanish schoolchildren. *Public Health Nutr.* 17 (4), 870–876. <https://doi.org/10.1017/S1368800013000888>.
- Mulligan, A.A., Welch, A.A., McTaggart, A.A., Bhattacharya, A., Raghavan, S.A., 2007. Intakes and sources of soy foods and isoflavones in a UK population cohort study (EPIC-Norfolk). *Br. J. Clin. Nutr.* 61, 246–254. <https://doi.org/10.1038/sj.bcn.1102508>.
- Niu, Y., Wang, R., Zhao, Y., Zhang, J., Shao, B., 2017. Highly sensitive and high-throughput method for the analysis of bisphenol analogues and their halogenated derivatives in breast milk. *J. Agric. Food Chem.* 6 (48), 10452–10463. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04294>.
- Olea, N., Olea-Serrano, F., 1996. Estrogens and the environment. *Cancer Prev. J.* 5, 1–6.
- Olea, N., Pazo, P., Fernández, M.F., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Pedraza, V., 1999. Phyto- and xenoestrogens (diethylstilbestrol) as a preventable cause of breast cancer. *Med. Biol. Environ.* Int. 27, 55–66.
- Ortega, R.M., López-Sobaler, A.M., Andrés, P., Requero, A.M., Aparicio, A., Molinero, L.M., 2016. DIAI. Software for Assessing Diets and Food Calculations. Department of Nutrition (UCM) & Alce Ingeniería, S.L. Madrid, Spain. Available at: <http://www.aleceingenieria.net/informacion/descarga.htm>, Accessed date: 12 November 2016.
- Patiband, H.R., Jørgensen, W., 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 400–419. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.03.001>.
- Pérez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V., Olea, N., 1998. The estrogenicity of bisphenol A-related diglycidylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect.* 106, 167–174. <https://doi.org/10.1289/ehp.98136167>.
- Pillon, P.C., Daphorin, C.M., Chang, K., Contois, J.H., Strom, S.S., Spitz, M.R., Hartung, E.B., 1999. Development of a database for assessing dietary phytoestrogen intake. *Nutr. Cancer* 23, 3–19.
- Rivas, A., Montenegro, C., Heras-González, L., Maizel-Arco, M., Lorenzo-Tovar, M.L., Olea-Serrano, F., 2016. Association of bisphenol A exposures with dietary quality indices in Spanish schoolchildren. *Food Chem. Toxicol.* 94, 25–30. [doi:10.1016/j.fct.2016.05.010](https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.05.010).
- Rätjen, I.M.C.M., Louise, J., Beekmann, M., 2017. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1263–1280. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.1774>.
- Rodríguez García, C., Sánchez-Quesada, C., Toledo, E., Delgado-Rodríguez, M., Gafurio, J.J., 2019. Naturally lignan-rich foods: a dietary tool for health promotion? *Molecules* 24, 917. <https://doi.org/10.3390/molecules24050917>.
- Rubin, R.S., Schaefer, C.M., Soto, A.M., 2019. The case for BPA as an obesogen: contributors to the controversy. *Front. Endocrinol.* 10, 30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00030>. 2019 Feb 6.
- Saartten, N.M., Bingham, C., Lonestatti, S., Møntsen, A., Mikell, S., Penttinen, P., Sørensen, I.K., Valita, L.M., Vigili, F., Vollmer, G., Wäri, A., Ziesu, O., 2006. Tools to evaluate estrogenic potency of dietary phytoestrogens: A consensus paper from the EU Thematic Network "Phytohealth" (QLK1-2002-2453). *Genes Nutr.* 1 (3–4), 143–158. <https://doi.org/10.1007/s0028229964>.
- Silnickova, O., Flesar, J., Kokeška, L., Vrbna, E., Halámková, K., Malik, J., 2010. Selective growth inhibitory effect of bisphenol A against intestinal tract colonizing bacteria. *Molecules* 15, 1270–1279. <https://doi.org/10.3390/molecules15031270>.
- Siu, A.M., Liu, T.M., Justice, H., Soria, R.M., Sommerstein, C., 1992. An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenoestrogens. In: Collins, T., Clement, C.R. (Eds.), *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Publishing, Princeton (NJ), pp. 295–309.
- Stricker, B., Ebehart, R., Chevaller, M.C., Quinn, F.A., Bisher, P., Stricker, R., 2006. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 883–887. <https://doi.org/10.1155/CCM.2006.180>.
- Surh, J., Kim, M.J., Koh, E., Kim, Y.K.L., Kwon, H., 2006. Estimated intakes of isoflavones and genistein in Korean population. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 325–344. <https://doi.org/10.1080/09637480600602348>.
- Testa, I., Salvatori, C., Di Cara, G., Latini, A., Frati, F., Troiani, S., Principi, N., Esposito, S., 2018. Soy-based infant formula: are phyto-estrogens still in doubt? *Front Nutr.* 23 (5), 110. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00110>.
- Tsatsanidou, T., Loko, A., 2017. Obesogenic environments: current evidence of the built and food environments. *Perspect Public Health* 137 (1), 38–44. <https://doi.org/10.1177/1757913916679860>.
- Valentino, R., D'Esposito, V., Arsenima, F., Cimmino, I., Beguinot, F., Formisano, P., 2016. Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population? *J. Endocrinol. Investig.* 39 (3), 259–263. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0336-1>.
- Vekarić, L.S., Woodside, J.V., Castwell, M.M., Latham, A.J., Keltner, M.R., 2008. Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know. *Eur. J. Cancer* 44 (13), 1799–1806. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.05.019>.
- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz de Almodovar, J.M., Pedraza, V., 1995. The E-Screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.* 103, 844–850. <https://doi.org/10.1289/ehp.9510844>.
- Wagner, J., Jiang, L., Lehmann, L., 2008. Phytoestrogens modulate the expression of 17 $\alpha$ -estradiol metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 625–632. [https://doi.org/10.1007/978-0-287-69080-3\\_40](https://doi.org/10.1007/978-0-287-69080-3_40).
- Webster, R.A., 2008. Reproductive function and pregnancy. In: McPherson, R.A., Pincus, M.R. (Eds.), *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, twenty-first ed. Saunders Elsevier, Philadelphia (PA) (Chapter 26).
- Wolf, M.S., Britton, J.A., Bogaski, L., Hochman, S., Milosney, N., Serra, N., Liu, Z., Berkowitz, G., Larson, S., Forman, J., 2008. Environmental exposures and puberty in inter-city girls. *Environ. Res. Jul* 107 (3), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.03.008>.
- Xu, C., Liu, Q., Zhang, Q., Gu, A., Jiang, Z.Y., 2015. Urinary enterolactone is associated with obesity and metabolic alteration in men in the US National Health and Nutrition Examination Survey 2001–10. *Br. J. Nutr.* 28 (4), 683–690. <https://doi.org/10.1017/S000711451400411E>.
- Zimmers, S.M., Boswan, E.P., O'Keefe, P.W., Anderton, D.L., Kramer, L., Beckhous, D.A., Azaro, K.F., 2014. Determination of free bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere* 104, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.085>.

