

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

**Relación entre la exposición a mezclas de  
metales pesados y semimetales y el riesgo de  
desarrollar cáncer en la cohorte EPIC-España**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**Nicolás Francisco Fernández Martínez**

Directores:

María José Sánchez Pérez  
Miguel Rodríguez Barranco

Tutor:

Juan Pedro Arrebola Moreno

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Nicolás Francisco Fernández-Martínez  
ISBN: 978-84-1195-305-4  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92349>



*“In other words, welcome to the 21<sup>st</sup>-century Critical Epidemiology,  
in which history begets a future with more unknowns than ever —  
and expect to see the ecological footprint of our societies' political economies,  
past and present, embodied in the people's health for generations to come.*

*We are all ecologists now.”*

Nancy Krieger



## Agradecimientos

Esta tesis doctoral es fruto del esfuerzo y apoyo de una serie de personas a las que me gustaría agradecer.

A mis directores de tesis, María José Sánchez Pérez y Miguel Rodríguez Barranco, por haber apostado por mí, dándome la oportunidad de hacer el doctorado y de estudiar la cohorte EPIC. Por su conocimiento, supervisión, flexibilidad y paciencia en estos años. Todo lo que sé de salud ambiental y mucho de lo que sé de investigación es gracias a ellos, desde que llamé a su puerta buscando consejos para el tema del Trabajo Fin de Máster allá por 2019. También quiero agradecerles el haberme ayudado en otros proyectos. Espero que estén presentes en lo que me queda de carrera profesional para poder seguir aprendiendo de ellos.

A mi tutor de tesis, Juan Pedro Arrebola Moreno, un investigador que considero excepcional en este campo, por guiarme a lo largo del proceso, mejorar este trabajo con sus valiosos comentarios y dedicarme tiempo en los momentos que más ocupado estaba.

Al equipo del Registro de Cáncer de Granada, y en especial a aquellos que trabajan o trabajaban conmigo en la sala 8 (Blanca, Chema, Dafina, Dani, Javi, Luismi, Óscar y Zuzana), profesionales excelentes y mejores compañeros. En este camino han participado todos de una manera u otra, aunque me gustaría destacar a Dani, por resolverme tantísimas dudas con una sonrisa, a Luismi, siempre dispuesto a echar una mano sin cobrarse jamás el favor, a Dafina, una investigadora brillante de la que ojalá se me pegue alguna virtud, incluyendo su humildad, y a Chema, colega de peripecias predoctorales, por su talante y lecciones sobre genética. Al grupo de desayuno, porque ellos también son parte de esta tesis.

Al grupo de Víctor Moreno Aguado, por el trato recibido durante mi estancia en Barcelona, y sobre todo a Núria Moragas García, por sus conocimientos, su paciencia y su gran capacidad docente para enseñar aspectos de bioinformática a un lego en la materia.

A todas las personas por las que quise investigar, en particular durante la residencia. A los profesionales del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba) y entre ellos Rafa Ruiz, que fue como un segundo tutor y sin quien hoy no sabría usar software de análisis. A Alejandro Rodríguez y demás integrantes del SVEA, por animarme a ir más allá de declarar casos, y por comprender que investigando los brotes podemos aprender de ellos, aunque sea más cómodo guardarlos en un cajón. A Mario Rivera, con quien coincidí primero en la facultad y luego en la residencia, por su espíritu colaborativo y sus ganas incesantes de aprender.

A todas las personas por las que quise dar clase. Gracias a Pablo Lardelli, por sus clases maravillosas en la facultad, que me hicieron fijarme en la docencia (y también en la epidemiología). Gracias a Aurora Bueno por su interés y por permitirme ser profesor invitado de la UGR en el curso 22/23. Gracias también a todos los que me ayudaron en dicho camino, en especial a Luismi y a Eladio, profesores apasionados a los que me encantaría parecerme.

A mi familia, porque ha hecho posible que llegue hasta aquí. Me gustaría agradecer especialmente a mi madre, Otilia –mi primera profesora–, su apoyo y cariño, así como a mi hermano, Aiden, al que admiro enormemente por su forma de ser, su capacidad de trabajo y su talento. Habría que ver dónde estaría yo de haberlo tenido la mitad de difícil de lo que lo ha tenido él.

A mis amigos y amigas: Jorge, Patri, Rafa, Azahara, Mariángeles, Pepe, Mario, Luismi... Por lo bonito que es disfrutar de vuestra compañía, por los ánimos que infundís, por comprenderme a veces y apoyarme siempre. A Rocío, porque sigo sin creerme la suerte que tengo de haber coincidido con ella. Por secundar la elección de un camino laboral incierto. Por su bondad, que logra sacar lo mejor de mí. Por su afecto incondicional. Espero poder acompañarte muchísimo tiempo.

Gracias de corazón a todos.

## **Resumen del trabajo científico asociado a la tesis doctoral**

Fernández-Martínez NF, Rodríguez-Barranco M, Huerta JM, Gil F, Olmedo P, Molina-Montes E, et al. Breast cancer risk for the joint exposure to metals and metalloids in women: Results from the EPIC-Spain cohort. *Sci Total Environ* 2024;912:168816. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.168816>.

Factor de impacto (2022): 9,800.

Posición (2022): 26/275, Q1, D1, en la categoría *Environmental Sciences*.

## **Financiación**

Esta Tesis Doctoral está financiada mediante el proyecto de investigación “*Exposure to mixtures of heavy metals and breast cancer risk in Spain: a causal inference analysis within the EPIC prospective cohort*”, financiado por el Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) del Instituto de Salud Carlos III (P11-2021). Además, el doctorando está contratado a través de un contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) asociado al proyecto “Co-exposición a metales pesados y metaloides, susceptibilidad genética asociada y riesgo de cáncer en la cohorte prospectiva EPIC: el proyecto MixMET”, financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI21/01295).

La estancia predoctoral realizada en el año 2023 en el Instituto Catalán de Oncología fue financiada por una acción de movilidad del CIBERESP.

El doctorando declara no tener conflictos de interés. Las entidades financiadoras no tuvieron ningún papel en ninguna de las fases del estudio ni en la posterior publicación de sus resultados como artículo científico.

# Índice de contenidos

<b>Principales abreviaturas y siglas</b> .....	11
<b>Índice de tablas</b> .....	13
<b>Índice de figuras</b> .....	15
<b>Resumen</b> .....	17
<b>Abstract</b> .....	18
<b>1. Introducción</b> .....	19
1.1. Metales pesados y semimetales .....	19
1.1.1. Determinantes ambientales de la salud.....	19
1.1.2. Contaminantes persistentes.....	20
1.1.3. Biomonitorización humana.....	22
1.1.4. Metales pesados y semimetales.....	25
1.2. Cáncer .....	41
1.2.1. Generalidades del cáncer .....	41
1.2.2. Cáncer de mama .....	50
1.3. Metales pesados y semimetales en relación con el cáncer.....	62
1.4. Mezclas de metales pesados y semimetales: el efecto cóctel.....	65
1.5. Justificación .....	68
<b>2. Hipótesis</b> .....	71
<b>3. Objetivos</b> .....	73
3.1. Objetivo general.....	73
3.2. Objetivos específicos.....	74
<b>4. Material y métodos</b> .....	75
4.1. Población y diseño del estudio.....	75
4.1.1. El estudio EPIC .....	75
4.1.2. La cohorte EPIC-España .....	77
4.1.3. Diseño del estudio .....	77
4.2. Evaluación de covariables.....	80
4.3. Análisis químicos.....	83
4.4. Análisis estadísticos .....	84
4.5. Aspectos éticos.....	87

<b>5. Resultados</b> .....	89
5.1. Descripción de la muestra .....	89
5.2. Análisis bivariante.....	93
5.3. Análisis multivariante .....	97
5.3.1. Metales pesados y semimetales considerados individualmente .....	97
5.3.2. Mezclas de metales pesados y semimetales .....	102
<b>6. Discusión</b> .....	107
6.1. Resultados principales .....	107
6.2. Comparación con otros estudios .....	110
6.3. Mecanismos de acción .....	116
6.4. Fortalezas y limitaciones.....	121
6.5. Estrategias futuras de investigación.....	123
<b>7. Conclusiones</b> .....	125
<b>Bibliografía</b> .....	127
<b>Trabajo científico asociado a la tesis doctoral</b> .....	145
<b>Anexos</b> .....	159

## Principales abreviaturas y siglas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

As: arsénico

ATSDR: Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (Estados Unidos)

Be: berilio

Cd: cadmio

CIE-O-3: 3ª edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología

Co: cobalto

Cr: cromo

Cu: cobre

EPIC: Estudio Prospectivo Europeo sobre Nutrición y Cáncer

ER: receptores de estrógenos

Hg: mercurio

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

IC: intervalo de confianza

ICP-MS: espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente

IMC: índice de masa corporal

LD: límite de detección

MET: equivalente metabólico

Mn: manganeso

Mo: molibdeno

MPS: metales pesados y semimetales

NHANES: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Estados Unidos)

Ni: níquel

NOAEL: niveles sin efectos adversos observables

OR: odds ratio

PR: receptores de progesterona

QgC: g-computación basada en cuantiles

RCBP: registros de cáncer de base poblacional

RIC: rango intercuartílico

ROS: especies reactivas de oxígeno

Pb: plomo

Sb: antimonio

Se: selenio

THS: terapia hormonal sustitutiva

TNM: tumor, ganglios linfáticos y metástasis (clasificación del estadio tumoral)

V: vanadio

W: wolframio

Zn: zinc

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de contaminantes persistentes y no persistentes. ....	22
<b>Tabla 2.</b> Principales sustancias prioritarias de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (Estados Unidos). ....	27
<b>Tabla 3.</b> Grupos de cáncer ordenados en función de la pérdida de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), 2010-2019. ....	52
<b>Tabla 4.</b> Estadios patológicos del cáncer de mama invasivo según la 8ª edición del sistema TNM. ....	60
<b>Tabla 5.</b> Comparación entre los participantes seleccionados y no seleccionados de la cohorte EPIC-España. ....	79
<b>Tabla 6.</b> Características basales del total de la muestra. ....	90
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en el total de la muestra, en ng/ml. ....	91
<b>Tabla 8.</b> Características sociodemográficas y clínicas basales de los casos de cáncer en comparación con los controles. ....	93
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en los casos de cáncer en comparación con los controles, en ng/ml. ....	95
<b>Tabla 10.</b> Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), como variables continuas. ....	97
<b>Tabla 11.</b> Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), tras transformación logarítmica. ....	99
<b>Tabla 12.</b> Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), categorizados en cuartiles. ....	101
<b>Tabla 13.</b> Efecto conjunto de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenido de modelos marginales estructurales de g-computación basada en cuantiles para evaluar efectos no lineales. ....	105
<b>Tabla 14.</b> Efecto conjunto de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenido de modelos marginales estructurales de g-computación basada en cuantiles para evaluar efectos no aditivos. ....	105
<b>Tabla 15.</b> Efecto conjunto de las mezclas de metales pesados y semimetales (MPS) esenciales y no esenciales, obtenido de modelos marginales estructurales de g-computación basada en cuantiles. ....	106
<b>Tabla 16.</b> Principales mecanismos de acción de metales pesados y semimetales (MPS) seleccionados. ....	120



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación del modelo de determinantes de la salud de Dahlgren-Whitehead.....	20
<b>Figura 2.</b> Homeostasis del cobre en humanos. ....	29
<b>Figura 3.</b> Aspecto del mercurio elemental.....	31
<b>Figura 4.</b> Modelo de interacción patológica Zn-Cu con el $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer.....	37
<b>Figura 5.</b> Rasgos distintivos del cáncer.....	44
<b>Figura 6.</b> Distribución global de los casos incidentes (arriba) y las defunciones por cáncer (abajo) en ambos sexos, según localización anatómica, 2022. ....	47
<b>Figura 7.</b> Tasas anuales de incidencia y mortalidad estandarizadas del cáncer de mama en mujeres por 100.000 mujeres, según regiones, 2022. ....	51
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del exposoma. ....	66
<b>Figura 9.</b> Localización de los centros del estudio EPIC. ....	76
<b>Figura 10.</b> Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en el total de la muestra, en ng/ml. ....	91
<b>Figura 11.</b> Matriz de correlación de Spearman de metales pesados y semimetales (MPS).....	92
<b>Figura 12.</b> Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en los casos de cáncer en comparación con los controles, en ng/ml. ....	96
<b>Figura 13.</b> Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), como variables continuas. ....	98
<b>Figura 14.</b> Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), tras transformación logarítmica. ....	99
<b>Figura 15.</b> Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), categorizados en cuartiles. ....	102
<b>Figura 16.</b> Pesos de los componentes de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenidos del modelo condicional de g-computación basada en cuantiles... ..	103
<b>Figura 17.</b> Efecto conjunto de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenidos del modelo marginal estructural de g-computación basada en cuantiles. ....	104



## Resumen

**Introducción.** La literatura científica disponible sugiere que los factores ambientales están implicados en el desarrollo del cáncer. Algunos metales pesados y semimetales (MPS) son carcinógenos, pero su asociación con el cáncer varía según el elemento analizado. La mayoría de los estudios se centran en el efecto individual de MPS. Por ello, el objetivo de esta tesis doctoral fue estimar la asociación entre la exposición a MPS y el riesgo de desarrollar cáncer en la cohorte EPIC (Estudio Prospectivo Europeo sobre Nutrición y Cáncer)-España, considerando el efecto conjunto de la mezcla.

**Material y métodos.** Se realizó un estudio de casos y controles en la cohorte EPIC-España. La muestra analizada consistió en 578 mujeres, incluyendo 286 casos incidentes de cáncer de mama y 292 controles. Se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de 16 MPS en el reclutamiento, mientras que el diagnóstico de cáncer se obtuvo a partir de Registros de Cáncer de Base Poblacional (RCBP). Se aplicaron modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para explorar el efecto de MPS individuales. Se aplicaron modelos de g-computación basada en cuantiles (QgC) para identificar los componentes clave y estimar el efecto conjunto de la mezcla.

**Resultados.** Los MPS que presentaron medias geométricas más elevadas fueron el Cu (845,6 ng/ml) y el Zn (604,8 ng/ml). Las concentraciones de Cu fueron mayores en los casos ( $p=0,010$ ) y las de Zn fueron mayores en los controles ( $p<0,001$ ). Los componentes clave de la mezcla fueron: con pesos positivos, Cu (+0,42) y Mn (+0,13); con pesos negativos, Zn (-0,61) y W (-0,16). El efecto conjunto estimado de la mezcla de MPS arrojó una OR=4,51 (IC 95%=2,32-8,79), sugiriendo una relación dosis-respuesta. No se evidenció no linealidad y tampoco no aditividad. El efecto de la mezcla se asoció a los elementos esenciales ( $p<0,001$ ), pero no a los no esenciales.

**Conclusiones.** Un perfil desfavorable, caracterizado por niveles altos de Cu y bajos de Zn, podría incrementar significativamente el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres de la cohorte EPIC-España, independientemente de otros factores de riesgo conocidos. Para corroborar nuestros hallazgos, se precisan estudios que evalúen esta relación en múltiples matrices biológicas y en diferentes escenarios de exposición.

## Abstract

**Introduction.** Available scientific literature to date suggests that environmental factors are involved in cancer development. While some heavy metals and metalloids (MPS) are carcinogens, their association with cancer depends on the element analyzed. Most studies focus on the individual effect of MPS. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to estimate the association between exposure to MPS and the risk of developing cancer in the EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)-Spain cohort, considering the joint effect of the mixture.

**Materials and methods.** We conducted a case-control study within the EPIC-Spain cohort. The analytic sample comprised 578 women, including 286 incident breast cancer cases and 292 cancer-free controls. Plasma concentrations of 16 MPS were quantified at recruitment, while cancer diagnosis was retrieved from Population-Based Cancer Registries (RCBP). Mixed-effect multivariable logistic regression models were applied to explore the effect of individual MPS. Quantile-based g-computation (QgC) models were applied to identify the main mixture components and to estimate the joint effect of the mixture of MPS.

**Results.** The geometric means were higher for Cu (845.6 ng/ml) and Zn (604.8 ng/ml). Cases had significantly higher concentrations ( $p=0.010$ ) and significantly lower Zn concentrations ( $p<0.001$ ). Cu (+0.42) and Mn (+0.13) showed the highest positive weights, whereas Zn (-0.61) and W (-0.16) showed the highest negative weights. The joint effect of the mixture of MPS was estimated at an OR=4.51 (95% CI=2.32–8.79), suggesting a dose-response relationship. No evidence of non-linearity or non-additivity was found. The mixture effect was associated with essential ( $p<0.001$ ) but not with non-essential elements.

**Conclusions.** An unfavorable exposure profile, primarily characterized by high Cu and low Zn levels, could lead to a significant increase in the risk of developing female breast cancer in the EPIC-Spain cohort, independently of other known risk factors. Further studies assessing multiple biological matrices and a variety of exposure scenarios are warranted to corroborate our findings.

## 1. Introducción

### 1.1. Metales pesados y semimetales

#### 1.1.1. Determinantes ambientales de la salud

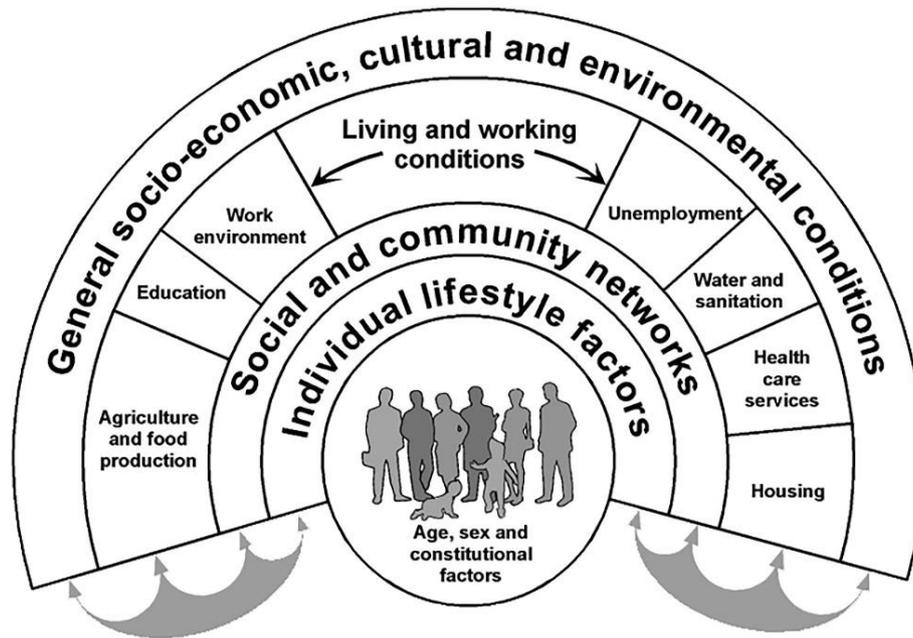
En la salud humana influyen los determinantes de la salud, que son factores relacionados con sus circunstancias individuales y con su entorno. Existen varios tipos de determinantes de la salud, como los individuales –que pueden ser constitutivos, como la susceptibilidad genética, o estar en relación con el contexto, como los estilos de vida (dieta, actividad física, consumo de tabaco...)-, los sociales (como el género o el empleo), los relacionados con el sistema sanitario (por ejemplo, la calidad de la asistencia), y los determinantes ambientales [1]. Cabe matizar que no se trata de compartimentos estancos: a modo de ejemplo, los determinantes ambientales y los sociales están interrelacionados, ya que la exposición a riesgos ambientales varía en función de factores como el estatus socioeconómico y el área geográfica, entre otros [2].

De todos los modelos teóricos de salud pública desarrollados para clasificar los tipos de determinantes de la salud e ilustrar cómo se relacionan entre sí, uno de los más conocidos es el modelo arcoíris propuesto por Dahlgren y Whitehead [3], que representa los determinantes ambientales entre los factores más distales a la salud (Figura 1).

Los determinantes ambientales constituyen un grupo muy amplio, que incluye el acceso a aire limpio, agua potable y alimentos aptos para el consumo, las condiciones de empleo, la situación de la vivienda, las características de las rutas de transporte, la seguridad en el ámbito comunitario, etcétera. En conjunto, se estima que hasta un 20% de la carga de enfermedad en Europa –sobre todo, a expensas de patologías crónicas– es atribuible a los determinantes ambientales [4].

## INTRODUCCIÓN

**Figura 1.** Representación del modelo de determinantes de la salud de Dahlgren-Whitehead.



Fuente: Policies and strategies to promote social equity in health (Dahlgren G, Whitehead M) [3].

Sin embargo, la importancia de los determinantes ambientales no ha sido siempre la misma: desde la Revolución Industrial (en concreto, desde la segunda mitad del siglo XIX) y, especialmente, en las últimas décadas, la exposición a tóxicos de carácter ambiental ha aumentado notablemente [5]. Dicho cambio guarda relación con las transformaciones de la sociedad, como el crecimiento demográfico, la progresiva escasez de recursos, el desarrollo industrial y los consiguientes avances tecnológicos, que han conducido a un gran incremento en los niveles de consumo y contaminación.

### 1.1.2. Contaminantes persistentes

Los contaminantes ambientales se definen como sustancias que, al entrar en contacto con el medioambiente, son potencialmente perjudiciales para la salud humana y el equilibrio de los ecosistemas [6]. Estos agentes pueden encontrarse en diversas formas, desde partículas suspendidas en el aire hasta compuestos químicos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua, los alimentos, o el suelo.

De manera análoga a otros determinantes ambientales como el cambio climático o la pérdida de biodiversidad, los contaminantes vulneran la estabilidad de los sistemas de

## INTRODUCCIÓN

apoyo terrestres (por ejemplo, la integridad de los océanos) y amenazan la supervivencia de las sociedades humanas. Considerando tan solo sustancias sintéticas de origen antropogénico, se estima que existen más de 145.000 [7], muchas de las cuales presentan características toxicológicas y efectos en salud que aún desconocemos.

Los contaminantes ambientales suelen englobarse en dos grandes grupos según su capacidad para resistir a la degradación física, biológica y química: contaminantes persistentes y no persistentes. Los primeros son habitualmente lipófilos y tienen una baja hidrosolubilidad (aunque existen excepciones, como el mercurio inorgánico, presente en entornos acuáticos). Su vida media –el tiempo que transcurre hasta que la concentración inicial de una sustancia se reduce a la mitad– es de años o incluso décadas [8], por lo que tienden a la bioacumulación en seres vivos y el medioambiente, además de a la biomagnificación a lo largo de la cadena trófica [9]. En cambio, los segundos se descomponen con mayor facilidad, siendo rápidamente metabolizados y eliminados por los organismos (su vida media es de horas o días), lo que limita considerablemente su capacidad para acumularse en tejidos biológicos.

A pesar de sus similitudes, estos dos grandes grupos son heterogéneos y comprenden múltiples familias de contaminantes, integradas por agentes que difieren en sus fuentes de exposición, vida media y efectos en salud. De hecho, estos contaminantes pueden ser a su vez orgánicos o inorgánicos, según lo cual difieren en sus características químicas y su toxicidad. La Tabla 1 recoge algunos de los contaminantes ambientales más relevantes para la salud humana, en función de su persistencia.

Las propiedades bioquímicas antes referidas tienen implicaciones para la protección de la salud, ya que regular el empleo de ciertos contaminantes no persistentes puede resolver a corto plazo los problemas de salud derivados de los mismos, mientras que esto, desafortunadamente, no sucede así con los contaminantes persistentes. Para ilustrar la relevancia de estos últimos, cabe mencionar la experiencia de regulación de algunos miembros de la “docena sucia”, denominada así en referencia a los 12 primeros contaminantes (o grupos de contaminantes) orgánicos persistentes en ser regulados a nivel internacional: aldrina, clordano, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrina,

## INTRODUCCIÓN

endrina, heptacloro, hexaclorobenceno, mírex, toxafeno, dioxinas, furanos y bifenilos policlorados (PCBs) [10]. Aunque algunos países europeos ya habían comenzado a regular estos compuestos en los años 80 del siglo pasado, no fue hasta 2001, mediante la firma de la Convención de Estocolmo, cuando se decidió globalmente (151 países) disminuir la producción de estas sustancias, llegando en muchos casos a la prohibición de su uso [11]. Sin embargo, las medidas implantadas podrían ser insuficientes, a causa de la persistencia de estas sustancias, las limitaciones en los métodos empleados para la evaluación del riesgo y la existencia de períodos críticos del desarrollo marcados por una elevada susceptibilidad a los efectos de la contaminación [12]. De hecho, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, los niveles de dioxinas y PCBs en Europa sobrepasaron los niveles actualizados de ingesta tolerables en 2018 [13].

**Tabla 1.** Ejemplos de contaminantes persistentes y no persistentes.

Contaminantes persistentes		Contaminantes no persistentes	
Familia	Sustancias	Familia	Sustancias
Organoclorados	Aldrina Hexaclorobenceno PCBs	Bisfenoles	Bisfenol A Bisfenol F Bisfenol S
Organobromados	HBCD PBDEs TBBPA	Parabenos	Etilparabeno Metilparabenos Propilparabeno
Organofluorados	PFOA PFOS	Benzofenonas	Benzofenona 1 Benzofenona 3
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Antraceno Benzopireno Criseno	Ftalatos	DBP DEHP DINP
Metales pesados	Cadmio Cobre Cromo Mercurio Plomo	Organofosforados	Clorpirifós Malatión Paratión
		Piretroides	Deltametrina Permetrina

Fuente: Elaboración propia. DBP: dibutilftalato. DEHP: di(2-etilhexil)ftalato. DINP: diisonilftalato. HBCD: Hexabromociclodecano. PBDEs: polibromodifenil éteres. PCBs: bifenilos policlorados. PFOA: ácido perfluorooctanoico. PFOS: ácido perfluorosulfónico. TBBPA: tetrabromobisfenol A.

### 1.1.3. Biomonitorización humana

Ante las primeras sospechas de toxicidad por contaminantes ambientales, comenzaron a aparecer distintos abordajes para medir los niveles de exposición, tanto en el medio físico como en el cuerpo humano. La determinación indirecta de contaminantes en el medioambiente –en el aire, el agua, los alimentos, o el suelo– tiene el inconveniente

## INTRODUCCIÓN

de recoger la exposición a una sola fuente. Además, como medida ecológica, suele asumir que la contaminación medida indica la de los sujetos del área de referencia en cuestión, a pesar de que no todos están igualmente expuestos. Por tanto, parece necesario otro enfoque que combine todas las fuentes de exposición, sean o no conocidas, y que permita cuantificar de manera directa la contaminación a la que se ha expuesto cada individuo. Este enfoque se conoce como biomonitorización humana y está considerado el método de elección para evaluar los riesgos para la salud de los contaminantes ambientales [14], aunque presenta algunas limitaciones, como su mayor coste o la introducción de aspectos éticos [15].

Para cuantificar la exposición, la biomonitorización requiere de matrices biológicas, entre las que destacan: la sangre [16], la orina [17], el pelo [18], las uñas [19], el tejido adiposo [20], la placenta [21] y la leche materna [22]. La selección de la matriz depende de las propiedades de la sustancia o sustancias objeto de estudio (así, el tejido adiposo es útil para contaminantes liposolubles, como los organoclorados), del tipo de exposición (por ejemplo, para determinar exposiciones crónicas a contaminantes, una de las matrices preferibles es el pelo) y de la factibilidad (la sangre y la orina suelen ser más sencillas de obtener que, por ejemplo, tejido placentario o leche materna).

Al margen del interés que suscita en el ámbito de la investigación, la biomonitorización hace posible conocer el estado de la exposición a numerosos contaminantes, estudiar su evolución temporal y establecer comparaciones entre poblaciones, lo que en conjunto permite guiar medidas de protección de la salud. Por ello, existen cada vez más proyectos e iniciativas de biomonitorización a escala nacional e incluso internacional. A continuación se enumeran algunos de los más importantes:

- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Estados Unidos (NHANES). Esta encuesta, que depende de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), se considera globalmente el mayor programa de biomonitorización humana. Con inicio en la década de los años 60, en la actualidad recoge anualmente información de una muestra representativa de la población estadounidense, integrando datos demográficos, socioeconómicos, de dieta y salud, incluyendo enfermedades autorreportadas, parámetros clínicos y

## INTRODUCCIÓN

fisiológicos, y pruebas de laboratorio [23]. NHANES cuenta con datos sobre varias familias de contaminantes persistentes, como los metales pesados, los organofluorados, los PCBs y los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

- Encuesta nacional de salud y nutrición de Corea del Sur (KNHANES). Desarrollado en 1998, se trata de un programa de biomonitorización similar a la NHANES en cuanto a exposiciones de interés y tamaño muestral de las encuestas anuales [24]. A nivel de contaminantes persistentes, dispone de mediciones de metales pesados y semimetales, como el arsénico o el plomo.
- Encuesta ambiental alemana (GerES). Esta encuesta representativa de la población general de Alemania comenzó en 1985 y se realiza con una periodicidad de 5 años. Recoge cuestionarios de dieta, exposiciones ambientales y estado de salud, además de pruebas de laboratorio. La última encuesta con datos disponibles se centra en niños y adolescentes, incluyendo datos de metales pesados, organofluorados, organoclorados y PCBs e hidrocarburos aromáticos policíclicos [25].
- Biomonitorización humana en la Unión Europea (HBM4EU). Fruto de la colaboración de 30 países europeos, este proyecto está impulsado por la Agencia Europea de Medio Ambiente y la Comisión Europea. Entre 2017 y 2022, recogió la exposición a un amplio espectro de sustancias químicas. De ellas, la lista de sustancias catalogadas como prioritarias refleja el interés por los contaminantes persistentes, al englobar metales pesados y semimetales (arsénico, cadmio, cromo, mercurio y plomo), retardantes de llama (organobromados), organofluorados, e hidrocarburos aromáticos policíclicos [26].

En España, el Centro Nacional de Sanidad Ambiental ha iniciado recientemente la creación del Nodo Nacional de Biomonitorización Humana [27], aunque todavía no existe propiamente ningún programa de biomonitorización a nivel nacional. Pese a ello, se han llevado a cabo varios estudios, de los que merece la pena mencionar el proyecto Bioambient.es, también desarrollado por el Centro Nacional de Sanidad Ambiental. Con una muestra de casi 2.000 adultos, Bioambient.es se centró en

## INTRODUCCIÓN

determinar contaminantes persistentes entre 2009 y 2010, incluyendo la determinación de metales (cadmio, mercurio y plomo) y de compuestos orgánicos persistentes: organobromados, organofluorados, organoclorados y PCBs [28].

### 1.1.4. Metales pesados y semimetales

Los metales pesados son elementos químicos caracterizados por una alta densidad (a partir de 4,5-5 g/cm<sup>3</sup>), una masa atómica elevada (a partir de 63,5 uma) y un número atómico a partir de 11, que pueden presentar efectos nocivos para la salud, aunque no existe un consenso establecido sobre cuál o cuáles de estas características define inequívocamente a los metales pesados [29,30]. De hecho, algunos elementos presentan similitudes con los metales pesados, pero sus propiedades son intermedias entre las de los metales y las de elementos no metálicos, además de tener una menor masa atómica y toxicidad (sin que ello implique que la masa atómica sea el principal factor determinante de la toxicidad), por lo que se denominan semimetales. Un ejemplo clásico de este grupo es el arsénico. Por otra parte, tanto los metales pesados como los semimetales son heterogéneos en cuanto a su importancia para la vida. Algunos elementos son esenciales, es decir, intervienen en procesos fisiológicos o metabólicos, como determinados mecanismos enzimáticos –por ejemplo, el selenio–, mientras que otros son no esenciales, de manera que carecen de funciones fisiológicas o metabólicas –como el wolframio–.

A pesar de estos matices, en salud ambiental es habitual estudiar conjuntamente ambos grupos de elementos [31,32], ya que comparten buena parte de sus propiedades químicas y los semimetales no están exentos de efectos nocivos para la salud. Por ello, sin menoscabo de las diferencias que presentan, en adelante nos referiremos a los metales pesados y semimetales (MPS) como una única familia de contaminantes.

Los MPS se encuentran presentes de manera natural en el suelo, el agua y la atmósfera; además, tienen origen antropogénico, especialmente por actividades industriales [33], aunque existen otras causas no industriales, como la quema de combustibles fósiles o la actividad militar. El hecho de que tengan origen natural no significa que sean inocuos para la naturaleza; de hecho, tienden a impactar negativamente sobre los ecosistemas, desde el nivel microscópico (produciendo efectos adversos a poblaciones

## INTRODUCCIÓN

bacterianas y favoreciendo el desarrollo de mecanismos de resistencia) hasta el macroscópico (alterando la fisiología y el crecimiento de plantas y animales) [34].

La lista de MPS es bastante amplia, incluyendo elementos como el aluminio (Al), el bario (Ba) o el hierro (Fe). No obstante, a continuación se procede a describir los que son objeto de estudio en esta tesis doctoral: arsénico (As), berilio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plomo (Pb), antimonio (Sb), selenio (Se), vanadio (V), wolframio (W) y zinc (Zn).

### *Arsénico (As)*

El As es un semimetal no esencial que puede estar presente en formas inorgánicas (habitualmente, en combinación con oxígeno, cloro o azufre), o bien en formas orgánicas (en combinación con hidrógeno y carbono), que son significativamente menos tóxicas [29]. Una vez absorbido por el organismo, el As pentavalente experimenta una serie de modificaciones que reducen su toxicidad. En primer lugar, se reduce a trivalente, forma que sigue siendo relativamente tóxica; de hecho, así se ha empleado tradicionalmente como veneno. Posteriormente, el As trivalente es conjugado con uno o dos grupos metilo, dando lugar a metabolitos menos tóxicos y con mayor vida media que son eliminados predominantemente por vía urinaria [35].

El As es de origen natural, liberado al agua a partir de la erosión de rocas y suelo, además de antropogénico, como resultado de la industria (minería, metalurgia, combustión de carbón en centrales termoeléctricas...), la agricultura y, en el caso del As orgánico, la medicina (en antiparasitarios como el melarsoprol, indicado para el tratamiento de la tripanosomiasis africana) [36]. La fuente principal de As son los alimentos, entre los que destacan el arroz, los vegetales, las aves de corral, los champiñones, el pescado y el marisco [37]. Además, el agua de consumo continúa siendo una fuente relevante de As inorgánico [38], especialmente en países en vías de desarrollo, pero también en otros como Estados Unidos. Otras fuentes incluyen el tabaco, residuos industriales y algunos productos herbicidas. En conjunto, la ingesta oral supone la vía de exposición fundamental en la población general, si bien la inhalación puede ser relevante en ciertas áreas industriales [35].

## INTRODUCCIÓN

El As encabeza la lista de sustancias prioritarias, en términos de vigilancia y control, de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) de Estados Unidos (Tabla 2) [39]. La exposición crónica a este semimetal se ha asociado a múltiples problemas de salud: neurológicos (neuropatía periférica), cardiovasculares (hipertensión arterial, arritmias, enfermedad vascular periférica), hepáticos (elevación de transaminasas hepáticas, fibrosis hepática, cirrosis), renales (enfermedad renal crónica), respiratorios (bronquitis crónica), hematológicos (anemia, alteraciones del metabolismo de la porfirina), dermatológicos (hiperpigmentación y queratosis), etc. [29,40]. Sin embargo, desde la toxicología, el As se ha estudiado eminentemente por su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer. Desde 1987, es agente del grupo 1 de carcinógenos de la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) [41], es decir, que su carcinogenicidad en humanos dispone de evidencia suficiente.

**Tabla 2.** Principales sustancias prioritarias de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (Estados Unidos).

Posición	Sustancia
1	<b>Arsénico</b>
2	<b>Plomo</b>
3	<b>Mercurio</b>
4	Cloruro de vinilo
5	Bifenilos policlorados
6	Benceno
7	<b>Cadmio</b>
8	Benzopireno
9	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
10	Benzo(b)fluoranteno

Fuente: ATSDR's Substance Priority List 2022 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) [39]. Se resaltan los metales pesados y semimetales.

### *Cadmio (Cd)*

El Cd es un metal no esencial del que se conocen 8 isótopos naturales, siendo el  $^{114}\text{Cd}$  y el  $^{112}\text{Cd}$  los primeros en frecuencia [29]. Al penetrar en el organismo, se absorbe en una frecuencia muy variable (del 1% al 25%), tras lo que se dirige al hígado y los riñones (además de otros tejidos, en menor medida), mediante su combinación con una proteína denominada metalotioneína [42]. Después, el Cd es trasladado y almacenado

## INTRODUCCIÓN

paulatinamente en los riñones, desde los que se elimina mayoritariamente por vía urinaria en un lento proceso; se estima que su vida media en el cuerpo humano excede los 20 años [43].

A pesar de su procedencia natural (en combinación con otros metales), su origen antropogénico reviste mayor importancia, ya que la contaminación ambiental del Cd ha aumentado eminentemente a raíz de actividades industriales tales como la minería, la metalurgia, la producción de baterías, la generación de energía solar fotovoltaica o la manufacturación de fertilizantes fosforados [44].

Existen numerosas fuentes de exposición al Cd, que pueden resumirse en tres grupos: 1) el humo del tabaco, incluyendo el consumo pasivo [45], 2) algunos alimentos, como vegetales (espinacas), semillas, cereales y frutos secos (arroz, cacahuetes), vísceras de animales (hígado) y marisco (moluscos) y 3) el aire, suelo y polvo contaminado, concretamente en áreas muy industriales o determinados entornos urbanos [44,46]. En consecuencia, la principal vía de exposición al Cd en la población general es la ingesta oral, mientras que en fumadores es la inhalación, con niveles de exposición generalmente muy superiores a los de no fumadores [46].

La exposición crónica al Cd se ha vinculado a patologías renales (síndrome de Fanconi, enfermedad renal crónica), vasculares, por afectación arterial (hipertensión arterial, cardiopatía isquémica), óseas (osteopenia y osteoporosis) y existe evidencia sobre su hepatotoxicidad y neurotoxicidad [47,48]. A lo anterior se ha de añadir que, al igual que el As, el Cd es carcinógeno en humanos (en la clasificación de la IARC, grupo 1) [49].

### *Cobre (Cu)*

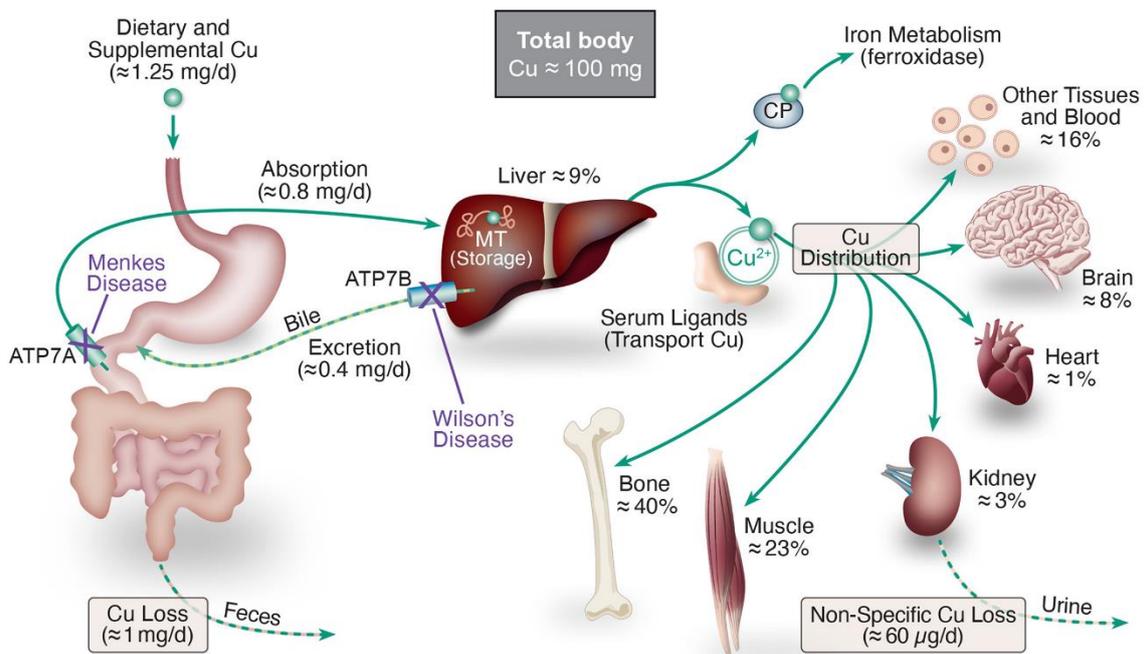
El Cu es un metal esencial rojizo que se encuentra de manera natural en el suelo, el agua y, en bajas concentraciones, el aire. Presenta gran resistencia a la corrosión, elevada durabilidad, excelente conductividad eléctrica y posee actividad antimicrobiana, características por las que tiene múltiples usos comerciales. Además, es un micronutriente necesario para el ser humano, ya que está involucrado en el

## INTRODUCCIÓN

crecimiento, participa en el metabolismo del Fe, favorece la elasticidad pulmonar, y tiene funciones vasculares, neuroendocrinas e inmunitarias [50].

La absorción del Cu, que se produce principalmente en el tracto gastrointestinal (duodeno), presenta una alta variabilidad en adultos. Al menos parcialmente, dicha variabilidad depende de que está estrictamente regulada por la homeostasis del Cu, ilustrada en la Figura 2. Una vez absorbido, el Cu se dirige al hígado a través del sistema venoso portal y, en una segunda fase, se distribuye a través de la circulación sistémica, alcanzando el cerebro, los riñones y otros tejidos. La principal transformación metabólica que experimenta es la reducción a Cu monovalente. Su excreción, eminentemente biliar, determina que el grueso de la eliminación se produzca a través de las heces, aunque parte del Cu se elimina por vía urinaria. Su vida media varía en función del tejido, siendo por ejemplo de unos 450 días en el cerebro [51].

**Figura 2.** Homeostasis del cobre en humanos.



Fuente: Copper nutrition and biochemistry and human (patho)physiology (Collins JF) [52].

Buena parte del Cu es de origen natural, al proceder de la corteza terrestre, plantas y animales. También es el fruto de actividades humanas, como la minería y la industria (metalurgia, construcción, eléctrica, transporte). Existe por tanto una amplia variedad de fuentes de Cu, como el agua de consumo, alimentos (marisco y carne, incluyendo

## INTRODUCCIÓN

vísceras animales, frutos secos, semillas, cereales, patatas...), suplementos dietéticos, tuberías, cableado y dispositivos eléctricos, equipamiento médico como los dispositivos intrauterinos (DIU), utensilios de cocina, fertilizantes, residuos urbanos, etc. [53,54].

De las vías de exposición al Cu, destacan la ingesta oral y la inhalación. Se ha observado un mayor grado de exposición en áreas urbanas y en aquellas con mayor contaminación, ya sea por mayor presencia de Cu de origen natural (por ejemplo, zonas volcánicas) o antropogénico (proximidad de emisiones industriales) [51]. En este punto, debe precisarse que en los niveles de Cu –y de otros elementos esenciales– inciden factores más allá de la exposición a fuentes ambientales. Los trastornos de la homeostasis del Cu influyen notablemente en dichos niveles, bien promoviendo su acumulación en los tejidos o bien un aumento de su eliminación.

El estudio toxicológico de elementos esenciales es complejo, ya que la relación dosis-respuesta suele ser no lineal, por ejemplo, en forma de U (con mayor riesgo para dosis muy bajas o muy elevadas). Hay indicios de que tanto la deficiencia como el exceso pueden resultar perjudiciales para la salud. Por un lado, la deficiencia de Cu se ha relacionado con alteraciones cardiovasculares, óseas, neurológicas e inmunitarias (en las que se verían afectadas tanto la respuesta celular como la humoral) [53]. Por otro, el exceso de Cu se asocia a enfermedades neurológicas –destaca la enfermedad de Wilson, un trastorno genético que afecta al transporte de Cu, provocando su acumulación en el hígado y el sistema nervioso [55]– y cardiovasculares –enfermedad cerebrovascular isquémica y probablemente cardiopatía isquémica–, para las que la evidencia es más sólida [56,57]. También se ha relacionado con síntomas gastrointestinales, elevación de enzimas hepáticas y alteraciones hematológicas [51]. En cuanto a su carcinogenicidad, únicamente se ha evaluado para un compuesto orgánico que contiene Cu, el 8-quinolato de cobre. A raíz de la insuficiente evidencia en humanos y animales, fue categorizado como no clasificable según la IARC (grupo 3) [58].

## INTRODUCCIÓN

### *Mercurio (Hg)*

El Hg es un elemento no esencial, actualmente considerado el metal pesado más tóxico del medioambiente [43]. Puede encontrarse en forma elemental o metálica (con la particularidad de ser el único metal en estado líquido a temperatura ambiente, como se muestra en la Figura 3), en forma inorgánica y en forma orgánica, ostentando esta última un mayor interés en términos de salud.

**Figura 3.** Aspecto del mercurio elemental.



Fuente: Element mercury (Hg), liquid form (Bionerd) [59].

La absorción de Hg depende de su forma y de la vía de exposición, siendo elevada para la ingesta oral de las formas orgánicas, como el metilmercurio. Una vez absorbido, el Hg se distribuye por el organismo, con especial tropismo por el sistema nervioso central (ya que atraviesa la barrera hematoencefálica), los riñones y el hígado [29]; asimismo, puede pasar al feto y al lactante a través de la placenta y la leche materna, respectivamente [60]. Tras una serie de transformaciones metabólicas, el Hg es eliminado del organismo por una vía preferente que depende de la forma: aire exhalado (Hg elemental), orina (Hg inorgánico) y heces (Hg orgánico).

El principal origen del Hg es humano, como consecuencia de actividades básicamente industriales –minería, metalurgia, producción de fármacos y productos agrícolas, combustión de carbón en centrales termoeléctricas, quema de residuos, etc.–, aunque

## INTRODUCCIÓN

también puede encontrarse en la naturaleza, por ejemplo en relación con la actividad volcánica [29].

La principal fuente de Hg orgánico la constituyen ciertos alimentos, en especial pescado y marisco, aunque existen otros, como las aves de corral o el arroz [61]. También está presente en pesticidas, fungicidas, vacunas y productos de medicina complementaria. El Hg inorgánico se emplea sobre todo como aditivo en el polvo dental, medicamentos y cosméticos [36]. Si bien el Hg elemental ha sido usado clásicamente en la fabricación de termómetros, hoy en día apenas tiene aplicaciones, de las que destacan las amalgamas para el tratamiento de la caries dental [61]. En la población general, la dieta es la vía predominante de exposición, especialmente a las formas orgánicas. Otras vías posibles son la inhalación y la absorción cutánea (por ejemplo, de Hg inorgánico en cosméticos). Debe matizarse que el nivel de exposición es mayor en determinados ámbitos laborales como la odontología [62].

La exposición crónica a Hg se asocia a diversos problemas de salud, eminentemente a nivel neuropsicológico (pérdida de memoria, alteración del estado de ánimo, trastornos del sueño, dificultad de coordinación, alteraciones visuales) y renal (daño tubular y posible disminución del filtrado glomerular) [42,60]; más aún, se han descrito efectos cardiovasculares (arritmias, hipertensión arterial) y reproductivos (infertilidad, anomalías congénitas) [60,63]. En cambio, no se ha esclarecido su papel en el desarrollo de cáncer: el Hg orgánico es posible carcinógeno en humanos (en la clasificación de la IARC, grupo 2B), mientras que las demás formas no tienen evidencia suficiente y por ende se categorizaron como no clasificables (grupo 3) [64].

### *Plomo (Pb)*

El Pb es un metal no esencial presente en pequeñas cantidades en la corteza terrestre, que puede encontrarse formando compuestos inorgánicos (los más comunes son PbO, PbO<sub>2</sub> y Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) o, con menor frecuencia, en forma elemental o en formas orgánicas (como el tetraetilo de plomo) [65]. Entre sus propiedades destaca particularmente su elevada resistencia a la corrosión, junto con su carácter tóxico y acumulativo.

## INTRODUCCIÓN

La absorción de Pb en el organismo es variable, por lo general superior para la inhalación de pequeñas partículas; determinados factores nutricionales, como la deficiencia de Fe, podrían relacionarse con una menor absorción de Pb [66]. Una vez absorbido, pasa a sangre transportado por los eritrocitos unido a proteínas y se dirige mayoritariamente (90%) al tejido óseo, donde se acumula progresivamente (en adultos, con mayor frecuencia en hueso cortical) [67]. Como sucede con el Hg, el Pb se transmite desde la madre en las primeras etapas de la vida, ya que atraviesa la placenta y la leche materna [68]. Tras procesos metabólicos que difieren para formas inorgánicas y orgánicas, la eliminación tiene lugar esencialmente a través de orina y heces, aunque existen otras vías secundarias, como el sudor, el pelo o las uñas. La vida media de eliminación desde el tejido óseo evidencia el potencial acumulativo del Pb, con un rango comprendido entre 10 y 20 años [29].

Indudablemente, su origen más habitual se encuentra en la actividad humana. La lista de fuentes de exposición al Pb es extensa, incluyendo la gasolina (conviene recordar que las prohibiciones de su uso como aditivo en carburantes no han impedido que los niveles ambientales en años previos continúen formando parte de la exposición actual), la quema de combustibles fósiles (carbón y petróleo), el tabaco, las tuberías antiguamente empleadas para el suministro de agua, pinturas y tintes, residuos de productos electrónicos, etc. [36]. Igualmente, está presente en pescado, marisco, arroz y algunas especias, entre otros componentes de la dieta. Aunque se ha descrito la absorción cutánea, en conjunto, la ingesta oral (agua, alimentos, polvo doméstico, suelo) y la inhalación (aire, polvo doméstico) conforman los principales mecanismos de exposición al Pb en la población general [65]. La carga de exposición es mayor en zonas urbanas y zonas próximas a emisiones industriales.

La toxicidad por exposición crónica a Pb a nivel hematológico (anemia hemolítica con reticulocitos atípicos), renal (daño tubular, reducción del filtrado glomerular) y neurológico (alteraciones del neurodesarrollo, neuropatía periférica) está ampliamente demostrada [42]. Cierta evidencia, que según algunos autores podría no ser del todo extrapolable al grado de exposición en la actualidad [69], apoya la existencia de efectos adicionales a largo plazo: cardiovasculares, inmunitarios, digestivos y reproductivos

## INTRODUCCIÓN

[70]. En cuanto al riesgo de cáncer, el Pb recibe la consideración de agente posiblemente carcinógeno en humanos (grupo 2B según la IARC) y sus compuestos inorgánicos, de probablemente carcinógeno en humanos (grupo 2A) [71]. En cambio, los compuestos orgánicos de Pb se han categorizado como no clasificables (grupo 3) [71].

### *Selenio (Se)*

El Se es un micronutriente esencial para seres humanos y animales. Químicamente, se trata de un semimetal de características similares a las del azufre. Se puede encontrar en forma inorgánica, en 4 estados diferentes de oxidación (incluyendo el Se elemental, también denominado polvo de Se) o formando compuestos orgánicos, como las selenoproteínas [72]. Dichas proteínas, de las que se han identificado 25, desempeñan numerosas funciones biológicas, como estimular la inmunidad adaptativa. Para entender la importancia del Se basta señalar que es el único elemento traza especificado en el código genético –en particular, el aminoácido selenocisteína– para llevar a cabo reacciones de reducción-oxidación (redox) [73].

El Se posee una elevada biodisponibilidad en el tracto digestivo, con una absorción que alcanza el 90%, con valores generalmente superiores para las formas orgánicas que para las inorgánicas [74]. Tras ser absorbido, el Se es transportado en sangre unido a albúmina y otras proteínas. Se distribuye principalmente al hígado, donde es metabolizado (por ejemplo, el Se elemental sufre una serie de metilaciones para reducir su potencial toxicidad), aunque también se dirige a otras localizaciones, como los riñones, los testículos y el cerebro. El Se abandona el organismo mediante excreción urinaria, si bien se han descrito vías de eliminación secundarias, como las heces [74].

De manera natural, el Se está presente en las rocas y el suelo, aunque algunas de sus formas (Se elemental) son extremadamente raras en la naturaleza. El Se ambiental tiene asimismo un origen humano, a partir de actividades como la quema de carbón y otros combustibles fósiles, la minería, la metalurgia, la generación de energía solar (células fotovoltaicas) y la producción de cristal [36]. La principal vía de exposición en la población general es la dieta, sobre todo para las formas orgánicas. Algunos alimentos ricos en Se son cereales, carnes (en especial las vísceras), marisco y pescado, frutos

## INTRODUCCIÓN

secos y productos lácteos [75]; los suplementos dietéticos suponen una fuente adicional. Pese a la menor contribución de la inhalación y el contacto cutáneo como mecanismos de exposición en la población general, pueden ser una vía a tener en cuenta en el ámbito laboral, particularmente para trabajadores industriales, mecánicos, pintores y profesionales sanitarios [72].

Además de estar involucrado en el eje tiroideo del sistema endocrino, el Se participa en el adecuado funcionamiento del sistema nervioso central y el aparato cardiovascular, así como en la respuesta inmunitaria (por ejemplo, estimulando la proliferación y diferenciación de linfocitos T colaboradores CD4+) [76]. Sus propiedades antioxidantes podrían incluso contrarrestar el daño producido por otros MPS, como el As o el Cd [77]. Por todo ello, se ha asociado el déficit de Se con problemas de salud potencialmente graves: alteraciones inmunitarias –sobre todo, por desregulación de la respuesta inflamatoria, que a su vez aumenta el riesgo de infecciones y de enfermedades autoinmunes–, alteraciones cardiovasculares (daño miocárdico, disfunción endotelial, cambios en el perfil lipídico), disfunción tiroidea, trastornos osteomusculares (como la osteoporosis postmenopáusica) e infertilidad masculina [78].

No obstante, el exceso crónico de selenio también resulta deletéreo para la salud, a nivel dermatológico (alopecia, alteraciones ungueales, despigmentación cutánea) [72], endocrinológico (disfunción tiroidea, diabetes tipo 2) y neurológico (disminución de la sensibilidad, dolor) [79]. Su estrecho margen de seguridad motiva que la suplementación con selenio sea objeto de debate [80]. Respecto al riesgo de cáncer, la IARC considera al Se y sus compuestos como no clasificables (grupo 3) [81].

### *Zinc (Zn)*

El Zn es el segundo elemento traza más abundante en el cuerpo humano, solo por detrás del Fe, y constituye un nutriente esencial para la vida animal. Podemos encontrarlo en forma elemental –un metal blanco azulado resplandeciente (forma ausente en la naturaleza, dada su alta reactividad)–, formando compuestos inorgánicos –los más habituales son ZnO y ZnS– y en forma orgánica. Además de su importancia biológica, tanto el Zn elemental como sus compuestos tienen múltiples aplicaciones

## INTRODUCCIÓN

industriales, al mejorar las propiedades de múltiples productos (por ejemplo, confiriendo resistencia a la degradación) y/o prolongar su vida útil [82].

La absorción oral del Zn es variable, pero suele estar comprendida entre el 20% y el 35% en personas con una ingesta nutricional adecuada. La dieta afecta a su biodisponibilidad, disminuyendo en sujetos con una dieta rica en vegetales. En sangre, el Zn es transportado en los eritrocitos, además de viajar unido a proteínas plasmáticas (albúmina,  $\alpha$ -2-macroglobulina). Los niveles de otros MPS, como el Cu o el Hg, influyen en dicho transporte. El Zn se distribuye a un amplio número de tejidos, como el aparato digestivo, el cerebro y los riñones, aunque la gran mayoría se dirige al aparato locomotor, que acumula el 90% de la carga corporal [36]. El metabolismo del Zn se da fundamentalmente a nivel hepático, con excreción biliar. Por tanto, la principal vía de eliminación es digestiva, seguida de la urinaria; otras vías documentadas incluyen la piel, el pelo y la leche materna.

El Zn es un elemento relativamente abundante en el suelo, el aire y el agua, tras su liberación por la erosión eólica, las erupciones volcánicas y distintas emisiones biogénicas, entre otras fuentes naturales. Sin embargo, la mayor parte del Zn es de origen antropogénico, eminentemente como resultado de minería y metalurgia (en la producción de hierro y acero). Otras actividades humanas incluyen la galvanoplastia (un proceso electrolítico de revestimiento metálico de superficies) y la fabricación de pintura, goma, cosméticos y demás productos en los que se emplea como aditivo [83].

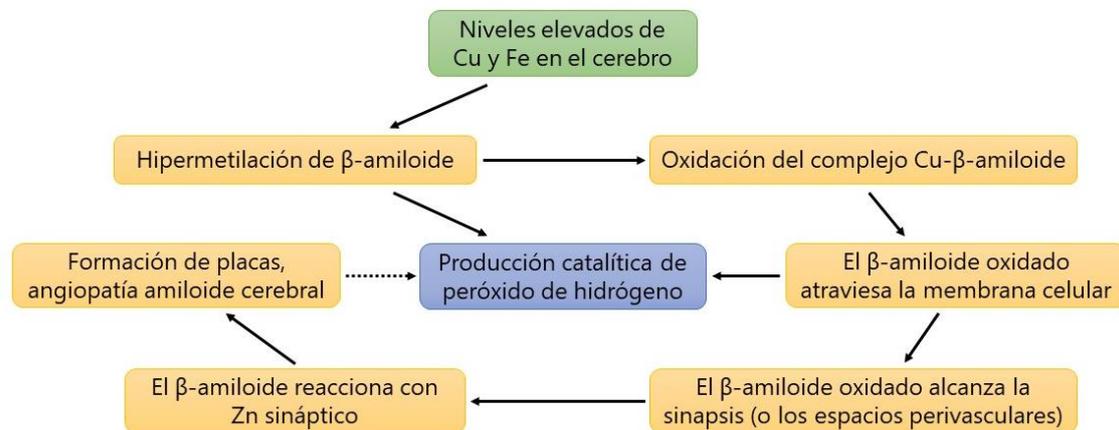
La principal vía de exposición en la población general es la dieta, fundamentalmente mediante la ingesta de marisco (ostras), pescado y carne, aunque el agua de consumo y los vegetales también contienen Zn [84]. La inhalación puede constituir una vía de exposición adicional en determinadas poblaciones, como los trabajadores de la industria metalúrgica, en los que se han identificado exposiciones a altas dosis [85], o los fumadores, ya que el Zn es un componente minoritario del humo de tabaco [83]. En cambio, no se considera que la absorción cutánea pueda ocasionar toxicidad, con la salvedad de determinadas sales de Zn (por ejemplo, el  $\text{ZnCl}_2$ ).

El Zn es un metal esencial requerido para el funcionamiento de más de 300 metaloenzimas, como la anhidrasa carbónica y la fosfatasa alcalina [86]. Además, es

## INTRODUCCIÓN

necesario para la estabilidad de proteínas, mediante los llamados dedos de zinc, un conjunto de motivos estructurales que facilitan la unión de proteínas al ADN, y que participan en la transcripción genética. Otras de las funciones destacadas del Zn son la protección frente al daño oxidativo y la regulación de la proliferación celular, incluyendo la apoptosis de células malignas. En consecuencia, la deficiencia de Zn se ha asociado a trastornos en múltiples aparatos y sistemas: alteraciones inmunitarias con aumento de marcadores inflamatorios e inadecuada respuesta frente a infecciones, infertilidad masculina, enfermedades neurodegenerativas (el papel que desempeñaría en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer se esquematiza en la Figura 4 [87]), enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis), enfermedad renal crónica [88], síntomas depresivos, pérdida de mineralización ósea y, recientemente, se ha relacionado con obesidad y diabetes tipo 2 [89,90].

**Figura 4.** Modelo de interacción patológica Zn-Cu con el  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer.



Fuente: The neurobiology of zinc in health and disease (Frederickson et al.) [87]. Aunque el Zn contrarresta las reacciones redox, la formación de peróxido de hidrógeno y la oxidación son muy abundantes en los depósitos de  $\beta$ -amiloide.

El exceso de Zn también se ha vinculado a algunos efectos en salud a largo plazo, sobre todo por interferir con el metabolismo de otros MPS. Niveles elevados inhiben la absorción de Cu y de Fe, dando lugar a anemia y disminución de ferritina [83]. Por otro lado, se ha descrito la disminución del colesterol de alta densidad (HDL), que podría facilitar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La evidencia disponible no apoya la capacidad mutagénica, carcinogénica ni teratogénica del Zn [91], siendo uno

## INTRODUCCIÓN

de los pocos MPS cuya relación con el riesgo de cáncer no ha sido evaluada por la IARC.

### *Otros elementos*

El Cr es un metal esencial empleado en la fabricación de aleaciones que puede encontrarse en una amplia variedad de productos de madera y cuero tratados, en utensilios de cocina, en prótesis metálicas (por ejemplo, las utilizadas en el tratamiento quirúrgico de fracturas femorales), etc. La principal vía de exposición es la ingesta oral de alimentos, como verdura, fruta, frutos secos, carne y algunas bebidas. La inhalación no constituye un mecanismo relevante para la población general, pero sí para trabajadores industriales, fumadores y residentes en áreas próximas a industrias o a instalaciones que almacenan residuos tóxicos [92].

La exposición al Cr se ha asociado a problemas respiratorios (disminución de la función pulmonar, bronquitis), hematológicos (anemia microcítica), digestivos (dolor abdominal, vómitos, diarrea) y, posiblemente, reproductivos (infertilidad masculina) [92]. Los compuestos de Cr hexavalente son carcinógenos establecidos en humanos (grupo 1) según la IARC, mientras que su forma elemental y los compuestos de Cr trivalente se consideran no clasificables (grupo 3) [41].

El Mn es otro metal esencial muy abundante en la naturaleza. Desempeña funciones importantes en el organismo, contribuyendo a la formación de hueso y cartílago o a la cicatrización de heridas. Asimismo, cuenta con diversas aplicaciones industriales, como la fabricación de productos agrícolas, cosméticos y pirotécnicos. La vía de exposición mayoritaria en la población general es la dieta, cuyas principales fuentes son el arroz, frutos secos, cereales, legumbres, té y el agua de consumo (a la que los usuarios de pozos privados estarían particularmente expuestos) [36]. Por el contrario, en el ámbito laboral (mineros, soldadores), la inhalación es el principal mecanismo de exposición, a concentraciones de Mn que exceden en varios órdenes de magnitud a las normalmente presentes en el aire exterior.

La toxicidad del Mn se da fundamentalmente en el sistema nervioso central. La exposición a niveles altos de Mn da lugar a un síndrome típico denominado

## INTRODUCCIÓN

manganismo, que cursa con debilidad, afectación del habla, temblores y, en los casos más graves, bradicinesia y rigidez muscular discapacitante. Exposiciones de menor intensidad pueden producir efectos subclínicos en adultos y alterar el neurodesarrollo en la infancia [93,94]. La evidencia disponible no apoya la carcinogenicidad del Mn en humanos [93], que no ha sido objeto de evaluación por parte de la IARC.

El Ni es un metal esencial para microorganismos, plantas y animales. No existe consenso sobre su consideración como elemento traza esencial en humanos [95]. Se emplea en la producción de acero inoxidable, baterías, dispositivos médicos y como aleación en monedas y joyas. La población general está expuesta al ingerir alimentos de origen vegetal (espinacas, espárragos, tomate, cacao, frutos secos, etc.) y agua. También es posible la exposición por vía inhalatoria, sobre todo en fumadores de tabaco y en poblaciones próximas a fuentes industriales, y mediante contacto cutáneo [96].

La toxicidad por Ni se ha documentado eminentemente tras la exposición inhalatoria, habiéndose observado alteraciones respiratorias como el desarrollo de asma o el empeoramiento de la función pulmonar. Pese a que la exposición aguda puede alterar la inmunidad innata y adquirida, no están claros los efectos a largo plazo sobre el sistema inmunitario [96]. Además, los compuestos de Ni son carcinógenos en humanos (grupo 1 de la IARC), en tanto que el Ni elemental se clasifica como posiblemente carcinógeno en humanos (grupo 2B) [41].

El Sb es un semimetal no esencial caracterizado por su baja conductividad eléctrica, lo que lo diferencia de la mayoría de MPS. De origen natural y antropológico (destaca la minería), tiene aplicaciones industriales, típicamente en aleaciones metálicas para mejorar sus propiedades (armas, cableado eléctrico, tuberías, baterías...), aunque también se emplea en la síntesis de antiparasitarios y como retardante de llama en polímeros y textiles. La población general está expuesta a bajos niveles de Sb a través de la dieta (las fuentes de exposición incluyen alimentos y el agua de consumo) y de la inhalación de aire contaminado. El grado de exposición es mayor en determinadas ocupaciones, como el personal de extinción de incendios o los trabajadores de incineradoras de residuos [97].

## INTRODUCCIÓN

La toxicidad del Sb se da principalmente a nivel respiratorio, ocasionando inflamación intersticial y fibrosis pulmonar [98]. También se han descrito efectos cardiovasculares (alteraciones electrocardiográficas) y metabólicos, en relación con el metabolismo de la glucosa [97]. La evidencia parece indicar la carcinogenicidad de los compuestos de Sb trivalente, recientemente clasificado como agente probablemente carcinógeno en humanos (grupo 2A), mientras que el Sb pentavalente se considera no clasificable (grupo 3) [99].

La lista de MPS de interés no se limita a los elementos anteriormente comentados. Existen otros, aunque no se van a describir en detalle al ser relativamente menos importantes. Estos incluyen el Be, del que preocupa la exposición inhalatoria en el ámbito laboral por sus efectos inmunológicos y respiratorios, incluyendo el cáncer de pulmón [100]; el Co, que puede producir alteraciones respiratorias, cardiovasculares y hematológicas, así como cáncer (agente del grupo 2A) [101]; el Mo, micronutriente esencial con potencial tóxico a nivel respiratorio [102]; el V, del que no se conocen bien sus efectos en salud, destacando su posible asociación con el cáncer (el pentóxido de V pertenece al grupo 2B) [103]; y el W, vinculado a efectos patológicos pulmonares en trabajadores expuestos por vía inhalatoria [104].

# INTRODUCCIÓN

## 1.2. Cáncer

### 1.2.1. Generalidades del cáncer

El cáncer es un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas a nivel patológico por dos factores: el desarrollo neoplásico, que se define como la proliferación anormal y descontrolada de células en un tejido, y el carácter maligno, referido a su capacidad para diseminarse a distancia –metástasis– a través de la sangre o de los vasos linfáticos. Pese a la heterogeneidad entre los distintos tipos de cáncer (e incluso dentro de cada tipo) comparten características comunes, en especial su base genética. No obstante, esta afirmación no es sino una simplificación conceptual de la plétora de mecanismos implicados en su desarrollo. Por ello, tomando como referencia el trabajo de D. Hanahan y R. A. Weinberg [105,106], seguidamente se resumen los principales rasgos distintivos del cáncer (capacidades biológicas, características facilitadoras y ciertos aspectos extracelulares) para esbozar una visión global de este proceso (Figura 5).

La lista de capacidades biológicas de las células cancerosas se puede subsumir en nueve grandes bloques:

- Señalización proliferativa mantenida en el tiempo. La proliferación anormal está mediada por vías de señalización en las que intervienen factores de crecimiento, aunque existen formas de proliferación independientes de dichos factores. En condiciones normales, existen bucles de retroalimentación negativa para garantizar la regulación homeostática, pero en el contexto de cáncer se han identificado defectos en dichos bucles (por ejemplo, en la proteína Ras), lo que favorece la señalización proliferativa.
- Evasión de supresores del crecimiento. Las células cancerosas deben eludir los mecanismos que inhiben su proliferación, que habitualmente dependen de los genes supresores de tumores. Los más importantes son *TP53* (de hecho, se le denomina “el guardián del genoma”) y *RB*. Cada uno de ellos participa en una gran vía o circuito de control celular, habiéndose observado alteraciones en una o ambas vías en células cancerosas. Adicionalmente, en poblaciones celulares

## INTRODUCCIÓN

densas de tejidos normales, el contacto físico entre células desemboca en la interrupción de la proliferación, fenómeno ausente en muchos tipos de cáncer.

- Resistencia a la muerte celular. Las células cancerosas son resistentes a varios tipos de muerte celular. El más importante es la apoptosis o muerte celular programada, cuyo circuito interno funciona como una barrera frente a la carcinogénesis, pero las células tumorales desarrollan estrategias para limitar o evadir la apoptosis, como la pérdida de *TP53* o la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, de la familia Bcl-2). También se ha evidenciado resistencia a la autofagia, un tipo de muerte celular que puede operar de la mano o independientemente de la apoptosis. Por último, la necrosis está relacionada con el cáncer, contexto en el que la liberación de señales proinflamatorias y el reclutamiento de células inmunitarias promueve la proliferación celular, la invasividad y la angiogénesis (estos conceptos se desarrollarán más adelante).
- Inmortalidad replicativa. Para que la proliferación celular origine tumores macroscópicos, las células cancerosas requieren de un potencial de replicación ilimitado. Este proceso pivota sobre los telómeros, elementos que protegen los extremos de los cromosomas, y sobre la telomerasa, enzima que añade segmentos teloméricos al ADN. La telomerasa, prácticamente ausente en células normales, aumenta drásticamente su expresión en células “inmortalizadas”.
- Inducción de angiogénesis. Consiste en la generación de neovasculatura asociada a los tumores. Se origina por la desregulación del equilibrio entre factores proangiogénicos (por ejemplo, la familia de factores de crecimiento endotelial vascular) y antiangiogénicos (por ejemplo, la trombospondina-1), en un proceso en el que también participa la médula ósea (células inmunitarias y progenitoras endoteliales) y, hasta cierto punto, los pericitos. Los vasos sanguíneos resultantes, aberrantes en su morfología y funcionamiento, permiten el aporte de nutrientes y oxígeno necesario para el crecimiento descontrolado de las células tumorales.

## INTRODUCCIÓN

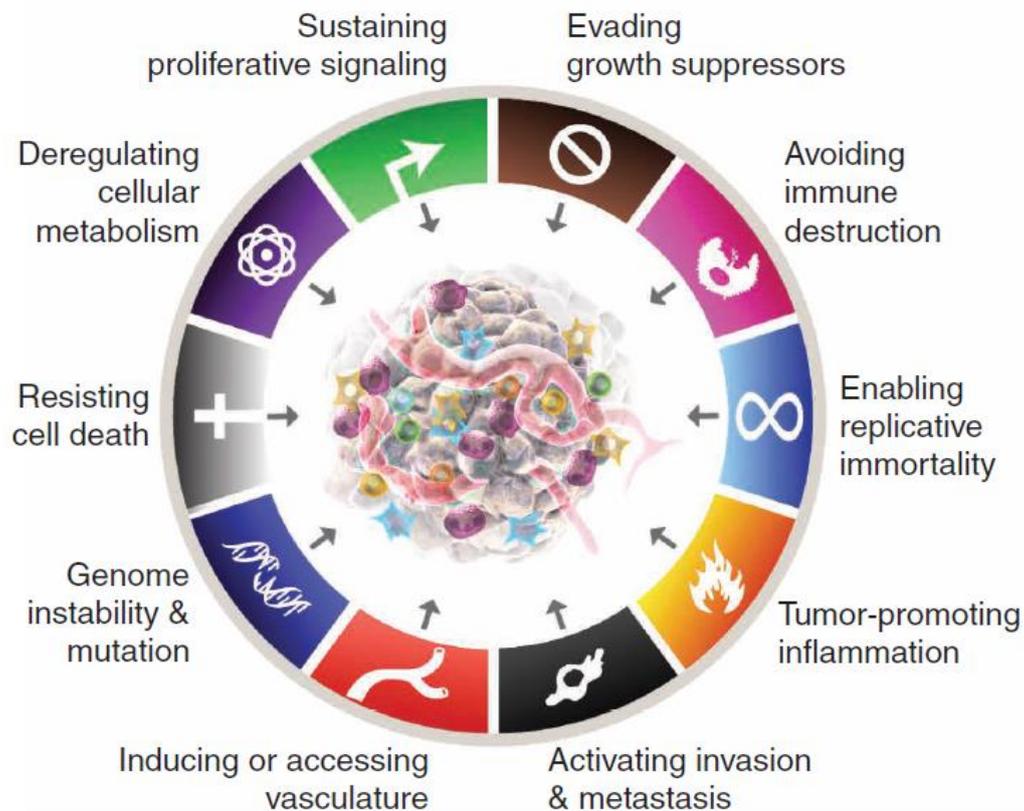
- Capacidad invasiva y metastásica. El término “cascada de invasión-metástasis” [107] se refiere a la secuencia completa en la que las células cancerosas se diseminan desde su tejido de origen a tejidos vecinos y tejidos distantes. Consta de varias etapas: invasión local, intravasación a vasos cercanos, tránsito vascular, extravasación en tejidos distantes, formación de micrometástasis (pequeños nódulos de células cancerosas) y colonización (el crecimiento de estos hasta metástasis macroscópicas). Esta cascada está orquestada por un programa de control llamado transición epitelial-mesenquimatosa, en el que intervienen células no cancerosas del estroma tumoral, y mediante el que las células epiteliales adquieren la habilidad de invadir localmente, resistir la muerte celular y diseminarse a distancia. La excepción es la fase de colonización, cuyos mecanismos no se han dilucidado por completo. En algunos cánceres, como el cáncer de mama, las metástasis macroscópicas pueden manifestarse años o décadas tras la eliminación del tumor primario, pudiendo reflejar que las micrometástasis se encuentran en una situación latente hasta que logran desarrollar la capacidad de colonizar [108]. En cambio, en otros tipos de cáncer, la diseminación a distancia y las metástasis macroscópicas pueden coincidir en el tiempo.
- Reprogramación del metabolismo celular. Las células cancerosas precisan modificaciones en el metabolismo energético para su crecimiento y división desmedidos. Estos ajustes pasan por la capacidad de obtener energía mediante glucólisis, incluso en condiciones aerobias. Este fenómeno –glucólisis aerobia– resulta paradójico, ya que supone una pérdida de eficiencia energética. A cambio, se ha hipotetizado que las células cancerosas pueden así formar subpoblaciones más heterogéneas, unas dependientes de glucosa que secretan lactato, y otras que producen energía a partir de dicho lactato, en un proceso simbiótico que recuerda al funcionamiento fisiológico del tejido muscular.
- Evasión de la destrucción inmunitaria. Entre las funciones del sistema inmunitario se encuentra eliminar la formación y progresión de neoplasias, así como sus micrometástasis. Por ello, la incidencia de cáncer es mayor en

## INTRODUCCIÓN

pacientes inmunodeprimidos. Además, diferentes estudios epidemiológicos han evidenciado los beneficios pronósticos de una adecuada respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes con cáncer [109].

- Plasticidad fenotípica. La gran mayoría de las células atraviesa un proceso paulatino de diferenciación, desde una progenitora pluripotencial hasta una célula altamente especializada para ejercer su función en un órgano o tejido concreto. Sin embargo, esta lógica no aplica necesariamente a las células cancerosas, que pueden sufrir desdiferenciación, interrupción de la diferenciación (ambos procesos suelen ir de la mano) y transdiferenciación hacia otro tipo de especialización (con o sin metaplasia a nivel tisular). El desbloqueo de estos fenómenos de plasticidad fenotípica está ampliamente aceptado como un componente crítico en el proceso de carcinogénesis.

**Figura 5.** Rasgos distintivos del cáncer.



Fuente: Hallmarks of Cancer: New Dimensions (Hanahan D) [106].

## INTRODUCCIÓN

Por otro lado, para poder adquirir estas capacidades biológicas, el cáncer presenta una serie de características facilitadoras:

- Inestabilidad genómica. La inestabilidad genómica hace que tengan lugar mutaciones aleatorias. Muchas de las mutaciones son irrelevantes en términos de cáncer, pero algunos genotipos mutantes confieren ventajas selectivas para el crecimiento celular. No obstante, la reprogramación genómica no solo se debe a mutaciones, sino que puede ser epigenética, fenómeno relacionado con el microambiente tumoral y que podría constituir otra característica facilitadora.
- Inflamación promotora de tumores. Las células inmunitarias (sobre todo, de la inmunidad innata) que infiltran el microambiente tumoral pueden paradójicamente facilitar la progresión de células cancerosas, estimulando su proliferación, favoreciendo su supervivencia y promoviendo su angiogénesis. Además, algunas de las sustancias liberadas en este contexto inflamatorio, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) causan mutaciones adicionales, que pueden acelerar la transformación maligna de células neoplásicas.
- Otras características. Recientemente se han propuesto otras, incluyendo la reprogramación epigenética y los microbiomas polimórficos (la variabilidad de la microbiota tiene un impacto sobre determinados fenotipos tumorales).

Lo anteriormente expuesto se refiere básicamente a las células cancerosas. Sin embargo, el cáncer es más que las células que lo componen. La concepción actual de los tumores los considera órganos complejos, compuestos tanto por células heterogéneas como por un microambiente tumoral, un estroma que contiene al menos células endoteliales, pericitos, células inmunitarias y fibroblastos. Las células que integran el microambiente tumoral pueden proceder de tejidos adyacentes o de la médula ósea. Mención aparte merece el fenómeno de senescencia celular (esto es, un arresto proliferativo generalmente irreversible) que pueden experimentar estas células. Aunque tradicionalmente se entendía como un mecanismo protector frente al cáncer, en ciertas situaciones se ha descrito un fenotipo secretor asociado a la senescencia que estimularía el desarrollo y la progresión tumoral [110].

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cáncer es indudablemente uno de los mayores problemas de salud pública. Atendiendo a los datos más recientes del Observatorio Global del Cáncer de la IARC, en 2022 se diagnosticaron 20,0 millones de casos incidentes de cáncer a nivel mundial [111]. Existen diferencias en las tasas de incidencia estandarizada en función del índice de desarrollo humano (una variable compuesta que resume dimensiones clave del desarrollo a nivel nacional, como la esperanza de vida, la educación y la renta) [112], con mayor incidencia en países con mayor grado de desarrollo [111].

Las localizaciones anatómicas más frecuentes son el pulmón, la tráquea y los bronquios considerados conjuntamente (12,4%), la mama en mujeres (11,6%), el colon-recto (9,6%), la próstata (7,3%) y el estómago (4,9%), como se ilustra en la Figura 6. Esta distribución muestra una gran diversidad geográfica, sobre todo en varones: según el país, el cáncer más frecuente puede ser el de pulmón, el de próstata, el de colon-recto o el de hígado [113].

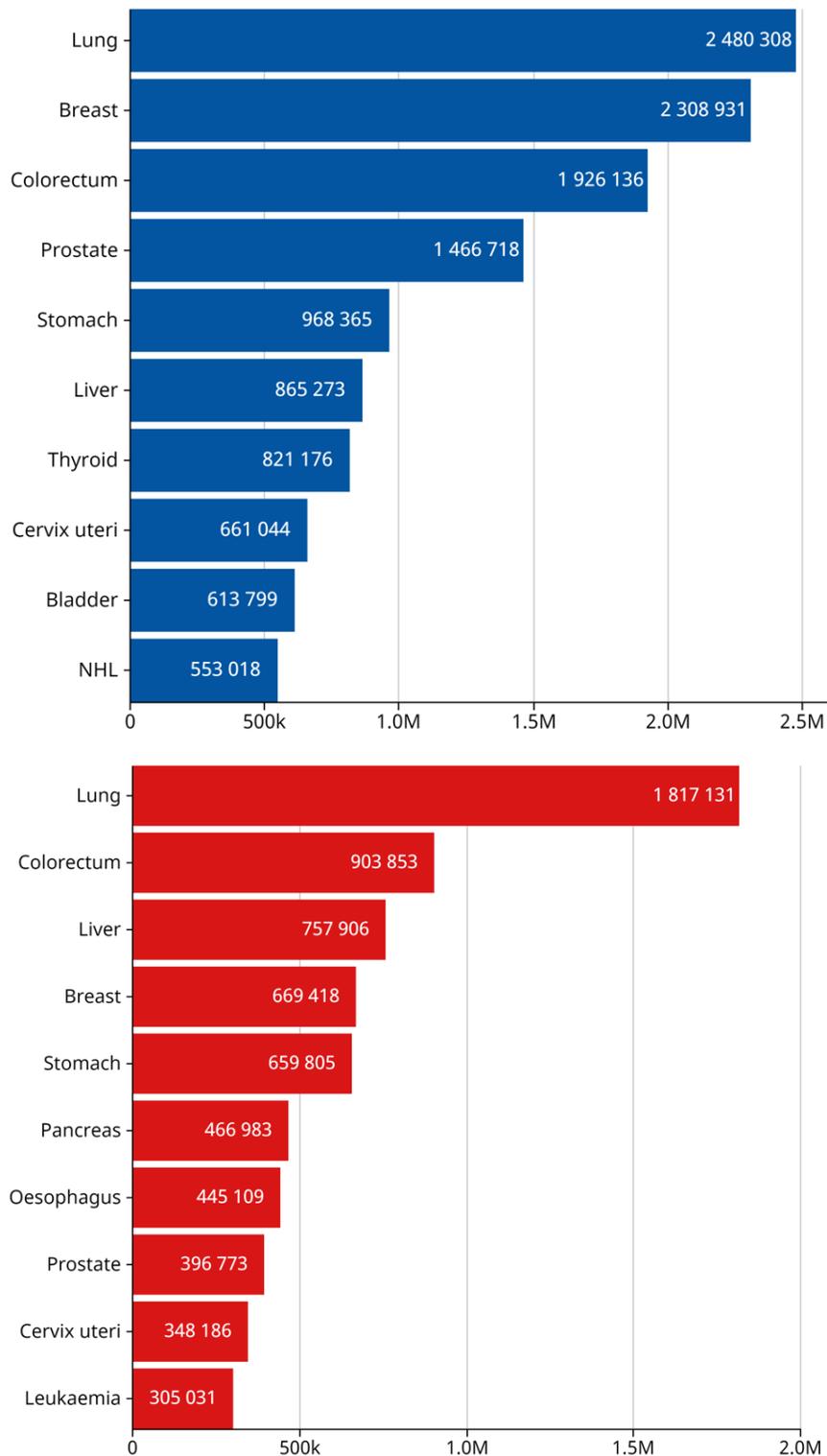
Desde el punto de vista de la mortalidad, en 2022 se produjeron 9,8 millones de defunciones por cáncer en todo el mundo [111], lo que sitúa al cáncer como la segunda causa de muerte, solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares [114]. De hecho, en algunos países ha pasado a ser la primera causa de muerte, dada la disminución relativa de la mortalidad de la enfermedad cerebrovascular y la cardiopatía isquémica en comparación con la del cáncer. En España, el cáncer causó el 25% de las muertes en 2022, mientras que las enfermedades cardiovasculares fueron responsables del 26% del total de defunciones [115]. La tendencia creciente del número de muertes contrasta con la reducción observada en las tasas de mortalidad estandarizadas [114]. Dichas tasas, al igual que las de incidencia, se asocian con el índice de desarrollo humano, de forma que los países con un índice muy alto duplican la tasa de los países menos desarrollados [111].

Las localizaciones anatómicas de cáncer con mayor mortalidad no coinciden exactamente con las de mayor incidencia, por las marcadas diferencias que presentan en su supervivencia. Globalmente, el tipo de cáncer que ocasiona más muertes es el cáncer de pulmón, tráquea y bronquios (18,7%), seguido del colorrectal (9,3%), el

## INTRODUCCIÓN

hepático (7,8%), el de mama en mujeres (6,9%) y el gástrico (6,8%), como se representa en la Figura 6 [111].

**Figura 6.** Distribución global de los casos incidentes (arriba) y las defunciones por cáncer (abajo) en ambos sexos, según localización anatómica, 2022.



Fuente: Global Cancer Observatory: Cancer Today (Ferlay J et al.) [111]. NHL: linfoma no Hodgkin.

## INTRODUCCIÓN

El impacto del cáncer no se limita a su incidencia y mortalidad. También se encuentra globalmente entre las primeras causas de discapacidad. Según datos del estudio *Global Burden of Disease*, en 2019 el cáncer provocó la pérdida de 250 millones de años de vida ajustados por discapacidad [114]. En la última década (2010-2019), el cáncer ha pasado de ser la tercera a la segunda causa de discapacidad, solamente por detrás de las enfermedades cardiovasculares; de hecho, en países con mayor nivel socioeconómico, el cáncer ya se ha convertido en la causa más frecuente de discapacidad [114].

Esta carga de discapacidad, consecuencia tanto del propio cáncer como de los tratamientos contra el cáncer, se traduce en que los adultos con cáncer con frecuencia tienen dificultad o directamente requieren ayuda para realizar actividades de la vida diaria. Esto afecta a las actividades básicas (37%), como caminar o cuidar la higiene personal, y especialmente a las actividades instrumentales (55%), como realizar tareas domésticas o utilizar medios de transporte [116].

Además, los costes económicos del cáncer son muy elevados, del orden de más de 125.000 millones de euros en la Unión Europea, según datos que probablemente ya no se correspondan con los costes actuales [117]. Un matiz importante es que los costes económicos del cáncer pueden estar seriamente infraestimados, porque su cálculo es muy complejo. Estos costes engloban, como mínimo: el gasto público en sanidad que se dedica específicamente al cáncer, los recursos que no se destinan al sistema sanitario, los cuidados informales, los costes indirectos por el impacto económico del cáncer en los afectados (relacionados con la pérdida de productividad, con la mortalidad prematura y con la morbilidad) y el coste equivalente a la pérdida de salud, que se suele medir a partir de los años de vida ajustados por discapacidad o por calidad de vida [118].

En los próximos años, las proyecciones no anticipan un escenario en el que el cáncer pierda magnitud como problema de salud pública. Por el contrario, se prevé que globalmente el número de casos incidentes aumente un 47% (de 19,3 a 28,4 millones) de 2020 a 2040, lo que podría acompañarse de un aumento similar en la mortalidad [113]. Los estudios macroeconómicos predicen un incremento global de los costes económicos entre 2020 y 2050, con los cánceres respiratorios (pulmón, tráquea y

## INTRODUCCIÓN

bronquios) a la cabeza [119]. En conjunto, el rápido crecimiento del cáncer refleja cambios demográficos (un ejemplo claro es el envejecimiento poblacional), y modificaciones en la frecuencia y distribución de los principales factores de riesgo.

Ante cifras así, surge inevitablemente una pregunta: ¿qué factores podrían explicar este preocupante incremento? Que el cáncer tenga una base genética no significa que sus causas sean necesariamente genéticas. La interacción entre genes y ambiente, entendido en el sentido más amplio del término, es de suma importancia en el desarrollo de cáncer. De hecho, la mayoría de causas de cáncer dependen del estilo de vida, como el consumo de tabaco, y de exposiciones medioambientales, como la contaminación del aire. Entre el 40% y el 50% de los casos diagnosticados y de las muertes por cáncer son atribuibles a los principales factores de riesgo no genéticos [120]. Los más importantes son el consumo de tabaco, el consumo de alcohol y un índice de masa corporal elevado, si bien la distribución de los factores de riesgo no es constante, sino que presenta diferencias según el contexto sociodemográfico y geográfico, además de variar en el tiempo [120]. No todos los factores de riesgo de cáncer conocidos influyen en la misma medida. Así, se ha estimado que uno de cada tres cánceres podría estar causado por 12 factores, incluyendo la radiación ultravioleta y la contaminación del aire [121].

De ello se deriva que el cáncer se puede prevenir, al menos en parte. La Organización Mundial de la Salud asevera que entre el 30% y el 50% de todos los casos de cáncer son potencialmente prevenibles, resaltando la importancia de factores como el tabaco, el alcohol, la actividad física y la dieta, las infecciones, la contaminación ambiental, los carcinógenos laborales y la radiación ionizante [122]. Conviene puntualizar que la contribución cuantitativa de estos factores es probablemente superior a la estimada, pues los estudios a escala poblacional no suelen recoger todos los factores de riesgo (generalmente, porque dicha información no está disponible).

A continuación, se van a comentar aspectos particulares del cáncer de mama, debido a que es el tipo de cáncer que se va a analizar en esta tesis doctoral.

## INTRODUCCIÓN

### 1.2.2. Cáncer de mama

#### *Desde el enfoque poblacional*

El cáncer de mama afecta con mucha mayor frecuencia a mujeres que a varones (en una proporción 100:1), especialmente en edades avanzadas. Se estima que un 80% de los casos de cáncer de mama se dan en mujeres a partir de los 50 años [123]. Por este motivo, este apartado se centra en el cáncer de mama en mujeres.

Globalmente, el cáncer de mama en mujeres es el segundo en incidencia al agrupar ambos sexos (11,6%), y en mujeres supone casi uno de cada cuatro nuevos diagnósticos de cáncer (23,8%) [111]. Estas cifras se reparten desigualmente a lo largo del mundo, de modo que en 2022 los países con un índice de desarrollo muy alto tuvieron una tasa de incidencia estandarizada más de un 100% mayor que las de los países menos desarrollados, con los valores más elevados en Australia/Nueva Zelanda, Norteamérica y Europa del Norte [111]. (Figura 7). En dichos países, la incidencia experimentó un rápido aumento en los años 80 y 90, estabilizándose en la siguiente década, para volver a crecer nuevamente desde aproximadamente 2010. Según las estimaciones del Sistema de Información Europeo del Cáncer (ECIS) para 2022, los países de la Unión Europea con mayor incidencia de cáncer de mama son Luxemburgo, Bélgica, Francia y Países Bajos [124].

En España, si se desagrega el cáncer colorrectal en colon y recto, el cáncer de mama es el más incidente al agrupar ambos sexos. La Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) ha estimado que se diagnosticaron 35.000 casos nuevos de cáncer de mama en 2023, representando las mujeres de 65 y más años el grupo etario con mayor incidencia. En España, la tasa anual estandarizada por la población europea es ligeramente inferior a la media de la Unión Europea (128,4 vs. 147,6 por 100.000 mujeres) [124,125].

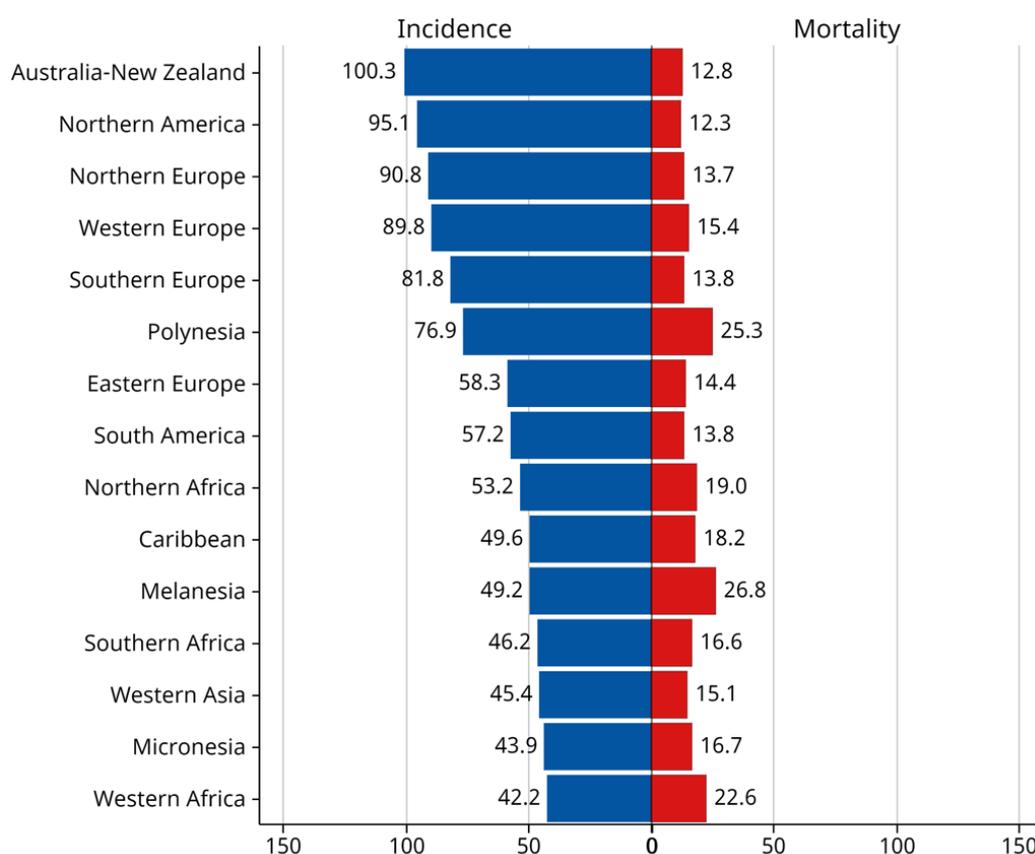
En países desarrollados, la supervivencia del cáncer de mama es elevada –entiéndase elevada en comparación con otros tipos de cáncer–, con cifras de supervivencia neta a 5 años que alcanzan el 90% en Estados Unidos y Australia [126]. Pese a ello, la mortalidad del cáncer de mama es relativamente alta. De hecho, globalmente se trata

## INTRODUCCIÓN

del cuarto cáncer con mayor mortalidad: 1 de cada 14 muertes por cáncer en el mundo es por cáncer de mama [111]. El motivo es su alta incidencia, al haber tal volumen de casos que la baja proporción que fallece a causa del cáncer se traduce en un gran número de defunciones en la población general.

La situación es muy distinta en otras regiones, con las mayores tasas de mortalidad en los países menos desarrollados, sobre todo en países de Oceanía y África Occidental (Figura 7). A pesar de los avances diagnóstico-terapéuticos en el cáncer de mama, que en las últimas décadas han logrado una reducción sostenida de las tasas de mortalidad estandarizadas, la baja supervivencia en países de África subsahariana resulta preocupante, con tasas de supervivencia neta a 5 años del 65%-70%, en parte por el diagnóstico en estadios avanzados, en los que las opciones de tratamiento son limitadas.

**Figura 7.** Tasas anuales de incidencia y mortalidad estandarizadas del cáncer de mama en mujeres por 100.000 mujeres, según regiones, 2022.



Fuente: Global Cancer Observatory: Cancer Today (Ferlay J et al.) [111]. El eje X representa las tasas anuales estandarizadas por edad, tomando como referencia la población estándar mundial.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la Unión Europea, Chipre, Eslovaquia, Polonia e Irlanda presentan las mayores tasas anuales de mortalidad estandarizadas por la población europea, mientras que España destaca como el país con menor mortalidad (147,6 defunciones por 100.000 mujeres), seguido de Croacia y Finlandia [124].

Al considerar la discapacidad, el cáncer de mama ocupa el cuarto lugar en la clasificación de grupos de cáncer que ocasionan la mayor pérdida de años de vida ajustados por discapacidad, por detrás del cáncer de pulmón, tráquea y bronquios (que también se analizan conjuntamente en el *Global Burden of Disease*), el cáncer colorrectal y el cáncer gástrico [114]. En este sentido, llama la atención el aumento absoluto de la carga de enfermedad del cáncer de mama de 2010 a 2019, como muestra la Tabla 3.

**Tabla 3.** Grupos de cáncer ordenados en función de la pérdida de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), 2010-2019.

Posición, 2010	Posición, 2019	Grupo de cáncer	AVAD, 2019	Cambio en AVAD absolutos, 2010-2019
1	1	Pulmón, tráquea y bronquios	45,9 M	+ 18,1%
3	2	Colon y recto	24,3 M	+ 23,2%
2	3	Estómago	22,2 M	- 0,5%
4	4	<b>Mama</b>	20,6 M	+ 21,3%
7	5	Hígado	12,5 M	+ 20,9%
6	6	Esófago	11,7 M	+ 6,1%
5	7	Hematológico (leucemias)	11,7 M	+ 0,8%
8	8	Páncreas	11,5 M	+ 32,9%
9	9	Cérvix uterino	9,0 M	+ 14,6%
10	10	Sistema nervioso central	8,7 M	+ 11,6%

Fuente: Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 (Kocarnik JM et al.) [114]. Se resalta el cáncer de mama. M: millones.

La importancia que reviste el cáncer de mama en salud pública, reflejada en los indicadores epidemiológicos descritos, ha servido de estímulo para la investigación encaminada a descubrir factores asociados al riesgo de presentar esta enfermedad. En las líneas que siguen, se expone una breve revisión de los factores de riesgo y protectores del cáncer de mama en mujeres mejor caracterizados hasta la fecha.

## INTRODUCCIÓN

Para empezar, se han identificado factores genéticos:

- Antecedentes familiares. La historia familiar de cáncer de mama se considera uno de los principales factores de riesgo. El riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta conforme lo hace el número de familiares de primer grado afectadas por cáncer de mama, en especial si estas son jóvenes [127]. El antecedente familiar de cáncer de ovario también puede aumentar el riesgo.
- Mutaciones genéticas. Los principales genes que determinan la susceptibilidad al cáncer de mama son *BRCA1* y *BRCA2*, implicados en la reparación del ADN. Las mutaciones en estos genes son responsables de aproximadamente el 2,5% de casos de cáncer de mama [128]. Otros genes de alta penetrancia, aunque menos frecuentes, incluyen *CDH1*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN* y *PALB2* [129]. Sin embargo, el foco en investigación se ha ido desplazando hacia otras mutaciones más frecuentes de menor penetrancia, habitualmente polimorfismos de nucleótido único, y la construcción de *scores* poligénicos de riesgo (PRS), pues su contribución conjunta podría llegar a explicar una mayor proporción de casos de cáncer [130]. No obstante, estas puntuaciones tienen una capacidad limitada de predecir el riesgo si no se acompañan de factores no genéticos, muchos de los cuales son además potencialmente modificables.

Existe asimismo un amplio número de factores no genéticos, a los que se atribuye hasta el 90% de los casos de cáncer de mama:

- Edad. El riesgo de desarrollar cáncer de mama presenta un claro gradiente en función de la edad, concentrándose la mayor incidencia en mujeres a partir de 70 años.
- Etnia. En Estados Unidos, se han observado diferencias por raza/etnia entre mujeres blancas y negras, con mayor riesgo para las primeras, aunque las segundas presentan menor supervivencia. Igualmente, el riesgo de desarrollar cáncer de mama es superior en mujeres maoríes con respecto a las no maoríes en Nueva Zelanda. Estas diferencias podrían deberse a factores

## INTRODUCCIÓN

socioeconómicos, estilos de vida y diferencias en el comportamiento biológico tumoral [131].

- Antecedentes personales de patología mamaria. El antecedente de cáncer de mama (invasivo o *in situ*) aumenta el riesgo de un segundo tumor primario en la mama contralateral. También se ha observado un aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres que han padecido enfermedades benignas, como la hiperplasia atípica [132].
- Factores hormonales y reproductivos. La importancia de las hormonas y sus receptores en el cáncer de mama explica que estos factores hayan despertado un mayor interés en estudios clínicos y epidemiológicos. El riesgo de desarrollar cáncer de mama es superior en mujeres con menarquia temprana y/o con menopausia tardía. En cuanto a la historia reproductiva, la nuliparidad aumenta el riesgo de cáncer de mama. Además del número de partos, un factor determinante es la cronología, evidenciándose un efecto protector si el primer parto ocurre antes de los 35 años. La lactancia materna, en especial con una duración  $\geq 12$  meses, constituye un factor protector adicional. Además, factores hormonales como los anticonceptivos orales y la terapia hormonal sustitutiva, consistentes en estrógenos en combinación con progestágenos, son factores de riesgo del cáncer de mama (en cambio, los estrógenos aislados no aumentan el riesgo) [129].
- Carga corporal estrogénica. Relacionada con el punto anterior, la carga corporal de estrógenos, endógenos y exógenos, se puede aproximar mediante el estudio de biomarcadores. El principal es la densidad mamaria, que depende de la proporción de tejido glandular y conjuntivo en relación con el tejido adiposo, y normalmente se evalúa mediante mamografía. El riesgo de tener cáncer de mama se incrementa en mujeres con mayor densidad mamaria [129]. Otro marcador es la densidad mineral ósea, que refleja la exposición crónica a estrógenos. En mujeres con mayor densidad mineral ósea, el riesgo de cáncer de mama aumenta un 60% [133].

## INTRODUCCIÓN

- Radiación ionizante. La radiación ionizante a altas dosis, fundamentalmente investigada en el contexto de la radioterapia, es un factor de riesgo del cáncer de mama [134]. Por el contrario, no parece que las dosis habitualmente empleadas en pruebas diagnósticas (como la tomografía computarizada) tengan relación con el cáncer de mama, salvo en mujeres genéticamente predispuestas, según ciertos estudios [132].
- Índice de masa corporal (IMC). En mujeres postmenopáusicas, valores mayores del IMC aumentan el riesgo de presentar cáncer de mama [135], si bien la relación es inexistente o incluso inversa antes de la menopausia.
- Actividad física. Múltiples estudios observacionales han encontrado una asociación moderada entre un mayor nivel actividad física y una disminución del riesgo de cáncer de mama [136]. Esta asociación no es motivada únicamente por la pérdida de peso, sino que también está mediada por otros procesos metabólicos, como la reducción en suero de estrógenos e insulina [132].
- Nutrición. Las dietas bajas en grasas se han asociado a un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas [137]. La evidencia para otros patrones dietéticos es limitada, con resultados por lo general inconsistentes.
- Alcohol y tabaco. El consumo de alcohol es un factor de riesgo establecido para el cáncer de mama. De hecho, en países desarrollados, el consumo de alcohol podría ser la principal causa modificable de la carga por cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas [138]. Por su parte, aunque el tabaco puede confundir la relación entre alcohol y cáncer de mama, el tabaquismo muestra además una asociación (débil) independiente con un mayor riesgo de cáncer de mama [139].
- Factores socioeconómicos. La posición o nivel socioeconómico es un constructo que engloba un número variable de determinantes sociales de la salud –como el empleo, la educación y la renta–, por lo que carece de una definición uniforme. En diversos países europeos, entre ellos España, se ha identificado una relación directa entre el nivel socioeconómico del lugar de residencia (a nivel de áreas pequeñas) y el riesgo de desarrollar cáncer de mama [140].

## INTRODUCCIÓN

- Contaminación ambiental. En los últimos años, la investigación sobre la etiopatogenia del cáncer de mama está poniendo un mayor énfasis en el papel que podrían desempeñar diferentes familias de contaminantes ambientales, persistentes y no persistentes [141]. Bajo la premisa de asociaciones positivas de modesta magnitud, algunos autores han defendido el valor de los estudios ambientales realizados en pacientes con especial susceptibilidad genética. La hipótesis es que, como fruto de la interacción entre factores genéticos y ambientales (que produciría un mayor tamaño del efecto), dichos estudios facilitan detectar la relación entre contaminantes y cáncer de mama [142].

Cabe aclarar que la distinción entre factores genéticos y no genéticos es orientativa, ya que muchos de los considerados no genéticos (por ejemplo, la densidad mamaria) tienen un componente genético.

### *Desde el enfoque clínico*

Para estudiar el comportamiento biológico del cáncer de mama es fundamental conocer la clasificación histológica, que estudia sus características celulares y tisulares. Más allá de los tumores *in situ*, en los que no se evidencia invasión a nivel local (y cuya malignidad es objeto de debate), esta clasificación divide el cáncer invasivo en dos grandes grupos. Por un lado, está el cáncer de mama invasivo sin tipo especial (también denominado carcinoma ductal infiltrante), el primero en frecuencia (40%-80%), que debe su nombre al hecho de no presentar rasgos histológicos típicos del resto de tipos. Se caracteriza por la presencia de cuerdas y nidos de células tumorales con formación glandular en grado variable y por la inducción de una respuesta fibrosa conforme las células infiltran el parénquima mamario [143].

Por otro lado, el resto de tipos histológicos, incluyendo el carcinoma lobular invasivo, el carcinoma tubular, el carcinoma mucinoso, el carcinoma medular, el carcinoma metaplásico, etc. De ellos, el más destacado es el carcinoma lobular invasivo, con una frecuencia de entre el 5% y el 10%, y que microscópicamente se observa como pequeñas células que infiltran progresivamente el estroma mamario y el tejido adiposo en un patrón monocelular, circundando los ductos mamarios en una disposición que semeja

## INTRODUCCIÓN

una diana. A diferencia del cáncer sin tipo especial, la reacción fibrosa es mínima [143]. El tipo lobular suele ser de crecimiento más indolente y tener un periodo más largo hasta la aparición de metástasis, por lo que su pronóstico suele ser más favorable que el del carcinoma sin tipo especial [144].

Junto con la clasificación histológica, la caracterización molecular del cáncer de mama basada en niveles de expresión génica ha adquirido una importancia creciente por su valor pronóstico y terapéutico. Algunos de los marcadores moleculares más importantes incluyen HER2 (receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), receptores hormonales de estrógenos (ER) y de progesterona (PR), y la proteína Ki-67, un marcador de proliferación celular. *Grosso modo*, la clasificación molecular contempla cuatro tipos [123], que se detallan en el siguiente párrafo.

El primero es el cáncer de mama luminal, el más frecuente en países occidentales. Este tipo presenta ER y suele corresponder histológicamente al cáncer sin tipo especial. Las principales diferencias entre subtipos son la ausencia de HER2 y la baja expresión de genes implicados en la proliferación celular en el subtipo luminal A, mientras que el luminal B puede presentar HER2 y su expresión de genes relacionados con la proliferación es mayor, confiriéndole generalmente peor pronóstico. El segundo es el HER2-enriquecido, definido por la combinación de alta expresión de HER2 en ausencia de ER y PR. El tercero es el cáncer de mama triple negativo, un conjunto heterogéneo de cánceres que no presentan ER ni PR, ni tampoco HER2. Su frecuencia es mayor en mujeres jóvenes y se asocian con mutaciones BRCA1 (en la línea germinal). Por su mayor agresividad y menor número de dianas terapéuticas, suelen tener peor pronóstico. El último tipo es el cáncer de mama bajo en claudina, que se caracteriza por baja expresión de genes involucrados en la adhesión celular, como las claudinas o la E-cadherina, la cual contrasta con la expresión elevada de genes implicados en la TEM. Su pronóstico es pobre, y equiparable al de otros tipos agresivos, como el luminal B o el triple negativo.

La manifestación clásica del cáncer de mama en mujeres es la presencia de una masa mamaria de consistencia dura, inmóvil, de bordes irregulares. En la enfermedad localmente avanzada, pueden sucederse síntomas y signos en la piel, como eritema,

## INTRODUCCIÓN

engrosamiento cutáneo, o la aparición de hoyuelos (la denominada “piel de naranja”). Posteriormente, cuando el cáncer metastatiza, la clínica depende del órgano afectado, típicamente los huesos (dolor lumbar o en miembros inferiores), el hígado (dolor abdominal, ictericia) o los pulmones (disnea, tos) [145].

Además de la exploración física, el diagnóstico se realiza mediante pruebas de imagen. La principal es la mamografía, empleada en el diagnóstico y en el cribado del cáncer de mama. El hallazgo típico es una masa de tejido blando con microcalcificaciones sospechosas, aunque la imagen más específica corresponde a una masa espiculada de alta densidad. También se utiliza la ecografía, que permite discriminar de manera razonable entre lesiones benignas y malignas. El cáncer de mama se describe como una masa hipoecoica, más alta que ancha, con calcificaciones internas y sombra acústica posterior. La ecografía es particularmente útil antes de los 30 años de edad, en gestantes, y durante la lactancia materna. Por último, en determinadas situaciones se indica la resonancia magnética. De todos modos, el diagnóstico de confirmación no lo dan las pruebas de imagen sino la anatomía patológica; la biopsia es la prueba indicada ante sospecha clínica y hallazgos mamográficos de riesgo (categorías 4 y 5 del sistema de clasificación BI-RADS) [146].

Un componente clave del diagnóstico, por sus implicaciones pronósticas y porque guía el tratamiento, es la estadificación del cáncer de mama. Para ello, se emplea el sistema de clasificación tumor-ganglios linfáticos-metástasis (TNM, por sus siglas en inglés), desarrollado por el Comité Conjunto del Cáncer de Estados Unidos (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). Cada uno de los tres integrantes del sistema TNM se puede evaluar e informar clínicamente, por medio de exploración física, pruebas de imagen y biopsia, en caso de estar disponible, o bien patológicamente, que además emplea información obtenida a partir de la resección quirúrgica. La evaluación clínica se indica mediante el prefijo “c” y la evaluación patológica mediante el prefijo “p”. En general, los estadios informados mediante anatomía patológica se consideran más precisos.

## INTRODUCCIÓN

La clasificación patológica de la 8ª edición del sistema TNM para el cáncer de mama invasivo se resume de la siguiente manera [147]:

- T (tumor primario). Engloba: TX si el tumor no puede evaluarse, T0 si no hay evidencia de tumor primario, T1 para tumores de hasta 20 mm en su eje mayor, T2 para tumores de >20 mm, hasta 50 mm en su eje mayor, T3 para tumores >50 mm en su eje mayor, y T4 para tumores de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o la piel.
- N (metástasis ganglionares). Incluye: NX si las metástasis ganglionares no pueden evaluarse, N0 si no hay evidencia de metástasis ganglionares, N1 para micrometástasis, para metástasis en 1 a 3 ganglios axilares, o para metástasis ganglionares mamarias no detectadas clínicamente pero sí mediante biopsia del ganglio centinela, N2 para metástasis en 4 a 9 ganglios axilares, o para metástasis ganglionares mamarias ipsilaterales detectadas por imagen en ausencia de metástasis en ganglios axilares, y N3 para metástasis en >9 ganglios axilares, para metástasis en ganglios subclaviculares, para metástasis ganglionares mamarias ipsilaterales detectadas por imagen asociadas a metástasis en ganglios axilares, o para metástasis supraclaviculares ipsilaterales.
- M (metástasis a distancia). Puede ser M0 si no hay evidencia de metástasis a distancia, o M1 si hay al menos una metástasis a distancia detectada clínicamente, radiológicamente, o mediante histología –en cuyo caso se requiere que la(s) metástasis sea(n) de un tamaño >0,2 mm–.

Los estadios tumorales (I, II, III y IV) que resultan de dicha clasificación se enumeran en la Tabla 4 [148].

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 4.** Estadios patológicos del cáncer de mama invasivo según la 8ª edición del sistema TNM.

T (Tumor)	N (Ganglios linfáticos)	M (Metástasis)	Estadio tumoral
T1	N0	M0	I (IA)
T0	N1mi	M0	I (IB)
T1	N1mi	M0	I (IB)
T0	N1	M0	II (IIA)
T1	N1	M0	II (IIA)
T2	N0	M0	II (IIA)
T2	N1	M0	II (IIB)
T3	N0	M0	II (IIB)
T0	N2	M0	III (IIIA)
T1	N2	M0	III (IIIA)
T2	N2	M0	III (IIIA)
T3	N1	M0	III (IIIA)
T3	N2	M0	III (IIIA)
T4	N0	M0	III (IIIB)
T4	N1	M0	III (IIIB)
T4	N2	M0	III (IIIB)
Cualquier T	N3	M0	III (IIIC)
Cualquier T	Cualquier N	M1	IV

Fuente: Tumor, node, metastasis (TNM) staging classification for breast cancer (Burststein HJ) [148]. N1mi: subgrupo del estadio (p)N1 con presencia de micro-metástasis, ninguna de las cuales supera los 2 mm de tamaño.

El tratamiento del cáncer de mama invasivo depende esencialmente de su objetivo: curativo en el cáncer no metastásico (estadios I-III) y paliativo en el cáncer metastásico (estadio IV). Si nos ceñimos al tratamiento curativo (el cáncer de mama suele diagnosticarse en estadios I o II), se divide en terapia local y terapia sistémica [149].

La terapia local incluye la resección quirúrgica, el estudio o el vaciamiento (extirpación) de los ganglios axilares y, en algunos casos, la radioterapia adyuvante (posterior a la cirugía). Las dos modalidades quirúrgicas principales son la mastectomía total y la cirugía conservadora. El abordaje de los ganglios axilares depende de la extensión tumoral y de la posibilidad de administrar radioterapia, de modo que en tumores de pequeño tamaño –como norma general, hasta 50 mm– en los que se detecten únicamente uno o dos ganglios centinela afectados, se puede optar por conservar la cadena linfática axilar sin reducir la supervivencia global ni la supervivencia libre de enfermedad [150]. La radioterapia suele administrarse en casos de alto riesgo de recurrencia local.

## INTRODUCCIÓN

La terapia sistémica, que puede ser neoadyuvante (previa a la cirugía), adyuvante, o ambas, incluye la quimioterapia y la terapia hormonal, que se administra para tumores que presentan receptores hormonales. Entre los principales agentes de quimioterapia se encuentran la doxorrubicina, la ciclofosfamida, el docetaxel, el paclitaxel y el carboplatino. Dentro de la terapia hormonal, los medicamentos más empleados son el tamoxifeno, el anastrozol, el letrozol y el exemestano para el cáncer de mama ER+ y los agentes dirigidos frente a HER2, como el trastuzumab y el pertuzumab. La elección del tratamiento depende de las características del tumor y de la paciente, siendo posible la combinación de quimioterapia y hormonoterapia en pacientes con cáncer de mama con subtipo molecular distinto del triple negativo. Si el tumor no presenta receptores hormonales ni HER2, el arsenal de terapia sistémica se limita a la quimioterapia, que puede asociarse a inmunoterapia en pacientes de alto riesgo.

## INTRODUCCIÓN

### 1.3. Metales pesados y semimetales en relación con el cáncer

La influencia de los MPS en la salud ha suscitado un especial interés en las últimas décadas, hasta el punto de que una de las revisiones sobre contaminación y salud más exhaustivas realizadas hasta la fecha dedicó un apartado específico a la contaminación del suelo por metales, centrándose en el Hg y el Pb. Los autores afirmaron que la población expuesta a estos elementos está infraestimada y que el único elemento del que se conocen suficientemente sus efectos perjudiciales es el Pb [151]. Por ello, incluso las publicaciones más recientes subrayan la brecha entre el gran número de estudios toxicológicos y la pobre interpretación de su carcinogenicidad y los mecanismos moleculares implicados [152]. Como se ha comentado anteriormente, muchos MPS no son carcinógenos establecidos, sino probablemente o posiblemente carcinógenos, por no mencionar aquellos que no son clasificables.

El riesgo de cáncer asociado a la exposición a MPS varía notablemente en función de la localización anatómica estudiada. En concreto, los estudios sobre cáncer de mama arrojan resultados inconsistentes según los elementos analizados y la población [153]. Los estudios basados en biomonitorización constituyen una de las mejores herramientas para aproximarnos a la relación entre los principales MPS y el cáncer – con especial énfasis en el cáncer de mama –, así como a su difícil interpretación.

El elemento con mayor evidencia es el Cd. La exposición a Cd se asocia con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, con mayor fuerza de asociación para la exposición por vía inhalatoria que para la ingesta oral [154]. No obstante, algunos estudios prospectivos no han logrado replicar dicha asociación [155]. Además, el exceso de Cd favorece el desarrollo de otros cánceres, en especial el cáncer de pulmón [46,156].

En el siguiente escalón se situarían el As, el Ni, el Cr y el Sb. La exposición al As incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama, aunque esta asociación no es constante en todas las poblaciones [157]. A ello se suma la evidencia de interacciones gen-As en las rutas moleculares que participan en la génesis del cáncer de mama [158]. Asimismo, el As es un factor de riesgo del cáncer de pulmón, de vejiga, de hígado y de

## INTRODUCCIÓN

piel [35,159]. Respecto al Ni, se ha observado una relación directa con el riesgo de cáncer de mama [160]. Sus efectos cancerígenos en el aparato respiratorio tras la exposición por vía inhalatoria están respaldados por un mayor número de estudios [96,161]. Por su parte, el Cr (hexavalente) aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, sobre todo al inhalar dosis elevadas (habituales en exposiciones laborales), pero no se ha podido demostrar su asociación con el cáncer en otras localizaciones anatómicas, como el estómago [162] o la mama [92]. Aunque el Sb (trivalente) cuenta con menor evidencia, la exposición en el ámbito laboral se asocia a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón [163,164]. En cambio, el Sb no parece estar relacionado con el riesgo de otros tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama [99].

Los resultados son contradictorios para ciertos MPS, de modo que su papel en el desarrollo de cáncer es una incógnita. Es el caso del Cu. Se ha documentado tanto una asociación significativa como la ausencia de asociación entre concentraciones séricas de Cu elevadas y un mayor riesgo de presentar cáncer de mama. Incluso entre revisiones sistemáticas con meta-análisis hay discrepancias sustantivas, salvo en un aspecto: la elevada heterogeneidad encontrada [165,166]. El panorama no difiere para otros tipos de cáncer, en los que no se puede concluir ni descartar el rol del Cu, lo que se ha atribuido primordialmente a las limitaciones metodológicas de la mayoría de estudios epidemiológicos [51].

Otros MPS están inversamente relacionados con el riesgo de determinados tipos de cáncer, es decir, podrían actuar como factores protectores. Las concentraciones séricas de Se son significativamente superiores en pacientes con cáncer de mama con respecto a controles sanos [167]. Se han observado resultados similares para el cáncer de cérvix, al comparar pacientes con cáncer frente a controles heterogéneos (combinando sujetos sanos y pacientes con enfermedad benigna) [168]. La evidencia limitada sobre los efectos del uso de suplementos de Se en la prevención y tratamiento del cáncer de pulmón indica que dependerían del nivel basal de Se: beneficiosos si es bajo, pero nulos o perjudiciales si es alto [169]. Otro ejemplo es el Zn, cuyas concentraciones séricas son mayores en pacientes con cáncer de mama que en personas sin cáncer [165,170].

## INTRODUCCIÓN

En el cáncer de pulmón se han obtenido hallazgos equivalentes [171], mientras que la relación entre Zn y cáncer colorrectal está más cuestionada [172].

No se ha podido demostrar la relación entre el elemento estudiado en mayor profundidad –el Pb– y el desarrollo de cáncer. Entre las localizaciones anatómicas donde se ha obtenido este resultado negativo se encuentran la mama, el pulmón, los testículos y el sistema nervioso central [155,173–175]. No obstante, sería precipitado concluir que no existe tal relación. La IARC clasifica al Pb y sus compuestos como agentes probablemente carcinógenos en humanos (2A). Además, la literatura al respecto (que incluye alguna asociación aislada con un riesgo aumentado de cáncer) no está libre de limitaciones, como el bajo tamaño muestral o el sesgo de confusión [65].

Desde una perspectiva epidemiológica, apenas se ha evaluado el grado en que el resto de elementos, como el V, contribuyen al desarrollo de cáncer. Esto implica que para la mayoría de MPS se desconoce si presentan una asociación positiva, negativa, o inexistente. A dicha mayoría pertenece el Hg, uno de los metales con mayor evidencia de toxicidad, que sin embargo cuenta con pocos estudios sobre cáncer, y los cuales raramente han cuantificado niveles de biomarcadores como medida de exposición [60]. Como excepción, se destaca un estudio de cohortes prospectivo realizado en residentes de un área industrializada de Corea del Sur, que identificó un aumento del riesgo de cáncer de tiroides en sujetos con mayores concentraciones de Hg en orina [176].

## INTRODUCCIÓN

### 1.4. Mezclas de metales pesados y semimetales: el efecto cóctel

A lo largo de esta introducción, se han expuesto problemas de salud relacionados con los MPS omitiendo la dosis a la que ejercen toxicidad. Esta decisión ha sido deliberada, lo que puede resultar sorprendente teniendo en cuenta que una de las principales aportaciones de la biomonitorización es la identificación de valores de referencia para contaminantes ambientales. El motivo es que la evidencia empírica no indica que valores bajo los de referencia carezcan de relación con el riesgo de cáncer, por lo que la visión generalizada de una dicotomía entre niveles seguros y niveles de riesgo no es del todo correcta. A pesar de que se conocen los niveles sin efectos adversos observables (NOAEL) de algunas sustancias, estos niveles no equivalen a la ausencia de riesgo [177].

Otra limitación de los NOAEL es que únicamente son válidos para agentes individuales. Aunque la mayor parte de la literatura se centra en los efectos de cada contaminante de manera aislada [153], la realidad es más compleja, porque estamos simultáneamente expuestos a multitud de ellos. Por tanto, el estudio de sus efectos en salud requiere una mirada distinta, que considere las mezclas de contaminantes. Las mezclas se definen como la combinación de varios contaminantes ambientales, sean o no de la misma familia. El fenómeno por el cual una mezcla de contaminantes a bajas dosis (que individualmente no producen toxicidad) es capaz de ejercer un efecto conjunto se denomina “efecto cóctel” [178].

Desde este enfoque de mezclas, Goodson et al. realizaron una amplia revisión sobre la carcinogenicidad de 85 tóxicos, incluyendo metales pesados [179]. Se logró identificar un umbral de riesgo en solo el 15%, mientras que la mayoría (59%) presentaban efectos incluso a dosis bajas, sin poder establecer una relación dosis-respuesta en los restantes. Los autores destacaron el potencial aditivo y sinérgico de los contaminantes, así como la necesidad de caracterizar el efecto conjunto de las mezclas para desarrollar estrategias de prevención del cáncer.

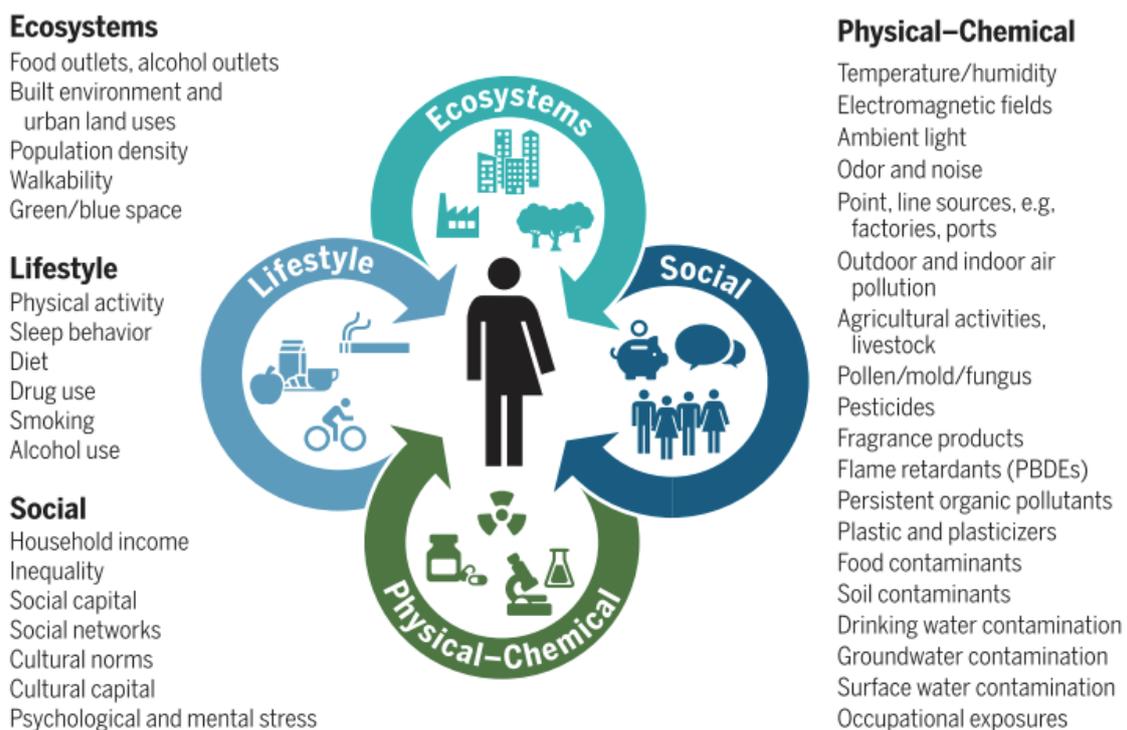
Los avances en los métodos estadísticos han vehiculado el estudio de exposiciones nocivas en salud ambiental a través de un abordaje de mezclas. Algunos ejemplos

## INTRODUCCIÓN

incluyen las aplicaciones del *machine learning* a la regresión bayesiana (BKMR) y la regresión de suma de cuantiles ponderada (WQSR) [180]. Uno de los métodos más recientes es la g-computación basada en cuantiles (QgC), que ofrece como principal ventaja la capacidad de producir estimaciones insesgadas del efecto de mezclas de exposiciones, teniendo en cuenta el grado de incertidumbre presente en estudios con bajo tamaño muestral. Mediante *bootstrapping* y simulaciones de Monte Carlo, la QgC permite identificar componentes clave de la mezcla, estimar su efecto conjunto, y explorar relaciones no lineales y no aditivas [181].

Probablemente, el hito más destacado de la transición hacia la perspectiva de mezclas fue el acuñamiento del término “exposoma” en 2005. Poco después de la secuenciación completa del genoma humano, Christopher P. Wild postuló la necesidad de caracterizar su contraparte ambiental, el exposoma, abarcando la totalidad de exposiciones humanas, así como su variabilidad desde el periodo prenatal hasta el final de la vida [182]. De este modo, se trata de un concepto amplio y dinámico constituido por múltiples componentes, como se representa en la Figura 8 [183]. De ellos, las mezclas de metales forman parte del componente químico del exposoma.

**Figura 8.** Representación esquemática del exposoma.



Fuente: The exposome and health: Where chemistry meets biology (Vermeulen R et al.) [183].

## INTRODUCCIÓN

De forma análoga al desafío que supone investigar el papel de nutrientes concretos estudiando patrones dietéticos para la epidemiología nutricional, la identificación de los componentes clave de las mezclas de contaminantes es todavía un enigma, para cuya resolución podría ser necesario el estudio del exposoma [184]. Lejos de estancarse en el plano teórico, el enfoque de exposoma se ha trasladado a la práctica, materializándose en un número creciente de iniciativas en los últimos años. Uno de los principales proyectos europeos en este campo es EXPOsOMICS, desarrollado con objeto de evaluar la exposición a los principales contaminantes ambientales en periodos críticos de la vida adulta [185]. Un rasgo característico de EXPOsOMICS es la aplicación de técnicas de análisis estadístico propias de las ciencias *ómicas* (genómica, transcriptómica, metabolómica...) al estudio de la diversidad de sustancias que configuran el exposoma. Otros proyectos más recientes en el marco de la Unión Europea incluyen ATHLETE, con énfasis en etapas tempranas de la vida, EPHOR, centrado en exposiciones del ámbito laboral, EXPANSE, cuyo objetivo es caracterizar exposiciones en el entorno urbano a lo largo del curso vital, y HEDIMED, que investiga el exposoma en relación con las enfermedades inmunomediadas.

No obstante, y sin menoscabo de las oportunidades que ofrece el estudio del exposoma, no está exento de limitaciones [186], incluyendo la menor interpretabilidad de los estudios no dirigidos (estudios de asociación de exposoma completo), la baja disponibilidad y calidad de muestras biológicas, la dificultad de medir adecuadamente los niveles de contaminantes no persistentes, el reto de integrar distintos métodos – sobre todo si se analizan conjuntamente diferentes componentes, como el químico y el psicosocial–, la problemática de analizar bases de datos de complejidad creciente y, recientemente, las implicaciones éticas que comporta esta área de investigación.

## INTRODUCCIÓN

### 1.5. Justificación

Los elementos que justifican iniciar una línea de investigación sobre la relación entre mezclas de MPS y el riesgo de desarrollar cáncer son la consideración del cáncer como problema de salud pública, las limitaciones de la evidencia científica disponible, la ausencia de datos nacionales y la factibilidad del estudio.

El cáncer es un problema importante de salud pública a nivel global por la incidencia, discapacidad y mortalidad que produce. En las próximas décadas, la situación puede agravarse, al menos atendiendo a las proyecciones del Observatorio Global de Cáncer y al contexto demográfico que ocupa a la mayoría de países desarrollados. Este panorama contrasta con la limitada traslación de la investigación en cáncer, de enfoque eminentemente clínico, a las medidas preventivas. En líneas generales, las medidas adoptadas no han logrado controlar la magnitud del problema (con algunas excepciones, como la reducción de la incidencia de cáncer de pulmón, especialmente en varones). Dado de que la etiología y los mecanismos patogénicos de muchos tipos de cáncer no se han dilucidado por completo, ampliar el enfoque a otro tipo de factores, como los contaminantes ambientales, puede ser un paso en la dirección adecuada.

La evidencia científica sobre MPS y cáncer es muy limitada, en términos cuantitativos y cualitativos. Por un lado, es cierto que algunos elementos como el Pb o el Hg han sido estudiados en relación con numerosos desenlaces. Lamentablemente, no es el caso de otros MPS, que han recibido mucha menor atención, unos por ser elementos esenciales y otros por presentar *a priori* menor toxicidad. Por otro lado, casi toda la literatura disponible ha evaluado el riesgo de cada elemento por separado, obviando el efecto de las mezclas. Además, en muchos estudios se han cuantificado los niveles de MPS después del diagnóstico de cáncer, lo que supone una debilidad metodológica, al no poder establecer la secuencia temporal correcta. Por lo tanto, hacen falta investigaciones que contribuyan a ahondar en el conocimiento al respecto, empleando diseños y métodos de análisis adecuados.

Si bien hay estudios que han analizado la relación entre MPS y riesgo de cáncer en España, en la actualidad ninguno lo ha hecho desde el enfoque de mezclas. Ante la

## INTRODUCCIÓN

falta de datos en general y de datos procedentes de nuestro país en particular, parece apropiada la realización de estudios adecuados a la realidad de contaminación ambiental presente en nuestro medio para evaluar los riesgos derivados de la exposición a MPS.

Por último, el estudio es factible, ya que disponemos de muestras prediagnósticas de las participantes de la cohorte EPIC-España, datos de MPS determinados en el laboratorio de Toxicología de la Universidad de Granada, datos fiables de incidencia de cáncer obtenidos de Registros de Cáncer de Base Poblacional, y métodos novedosos de análisis estadístico que permiten estudiar el efecto conjunto de las mezclas de contaminantes. Los pormenores del material y los métodos se abordan en detalle en el apartado 4.

# INTRODUCCIÓN

## **2. Hipótesis**

La hipótesis de trabajo de la presente tesis doctoral es que existe una relación directa entre la exposición a mezclas de metales pesados y semimetales (MPS) y el riesgo de desarrollar cáncer. Para testar dicha hipótesis, se escogieron los objetivos descritos a continuación.

## HIPÓTESIS

### **3. Objetivos**

#### 3.1. Objetivo general

Estimar la asociación entre la exposición a MPS y el riesgo de desarrollar cáncer en la cohorte EPIC-España, considerando tanto el efecto individual de los principales MPS como el efecto conjunto de estos elementos, y evaluando la existencia de relaciones no lineales y no aditivas.

## OBJETIVOS

### 3.2. Objetivos específicos

1. Determinar las concentraciones plasmáticas de 16 MPS en mujeres de la cohorte EPIC-España.
2. Calcular el efecto de la exposición a cada MPS de forma individual, así como el efecto conjunto de la mezcla de 16 MPS, sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres de dicha cohorte.
3. Cuantificar, para cada MPS incluido en la mezcla, su grado de contribución al efecto conjunto sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres de dicha cohorte.
4. Evaluar la presencia de no linealidad y de no aditividad en la relación entre la exposición a la mezcla de MPS y el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres de dicha cohorte.
5. Estudiar la asociación entre la exposición a mezclas de MPS y el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres de dicha cohorte, en función de si los componentes de la mezcla son esenciales o no esenciales.

### 4. Material y métodos

#### 4.1. Población y diseño del estudio

##### 4.1.1. El estudio EPIC

El estudio EPIC (Estudio Prospectivo Europeo sobre Nutrición y Cáncer) es un estudio de cohortes multicéntrico coordinado por la IARC que comenzó su andadura en la década de 1990 y que continúa activo en la actualidad. Su principal objetivo es analizar la influencia del estatus nutricional, el estilo de vida y los factores ambientales sobre la incidencia, mortalidad y supervivencia del cáncer y otras enfermedades crónicas. Cuenta con datos recogidos en 23 centros de investigación distribuidos en 10 países europeos (Alemania, Dinamarca, España, Francia, Grecia, Italia, Noruega, Países Bajos, Reino Unido y Suecia). La localización de los centros del estudio EPIC se muestra en la Figura 9.

La población del estudio EPIC [187] comprende a unos 520.000 participantes, la mayoría entre 35 y 70 años en el momento del reclutamiento, con un 70,5% de mujeres. El reclutamiento de la cohorte comenzó entre 1992 y 2000, dependiendo del centro. Se invitó a participar a adultos voluntarios de la población general por correo o en persona, si bien el esquema de reclutamiento difirió en función del país [187]. Se recogió información común de todos los individuos e información específica por sexo (por ejemplo, historia reproductiva en mujeres).

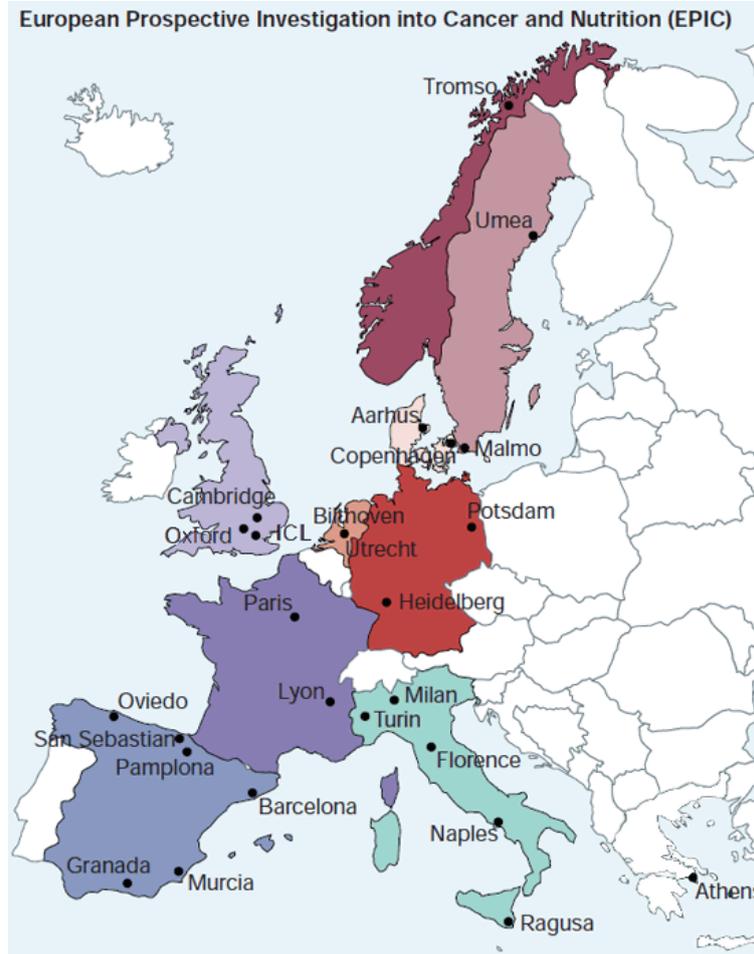
Los datos se obtuvieron a través de tres estrategias:

1. Por un lado, se emplearon cuestionarios sobre el estilo de vida (consumo de tabaco y alcohol, actividad física, dieta...) y otros factores relacionados con la salud, como el nivel educativo o los antecedentes médicos y quirúrgicos.
2. Por otro lado, se registraron datos antropométricos (por ejemplo, talla y peso).
3. Además, a la mayoría de participantes se le realizó una extracción sanguínea. Las muestras de sangre –plasma, suero, leucocitos y eritrocitos– se almacenaron

## MATERIAL Y MÉTODOS

en contenedores de nitrógeno líquido para su correcta preservación hasta que fuesen requeridas para su posterior análisis.

**Figura 9.** Localización de los centros del estudio EPIC.



Fuente: EPIC-Europe study. EPIC Centres (International Agency for Research on Cancer) [188].

El seguimiento de la cohorte EPIC, que en la actualidad acumula más de 25 años, se realiza activamente de manera periódica para identificar casos nuevos de cáncer en cualquier localización anatómica. En los centros de la mayoría de países, el diagnóstico de cáncer se obtiene a partir de Registros de Cáncer de Base Poblacional (RCBP); en el resto, se obtiene combinando varias fuentes de información, como los expedientes de seguros de salud y los datos de anatomía patológica [187]. Paralelamente, la mortalidad total y la mortalidad por causas específicas se obtienen a través de registros de mortalidad o de seguimiento activo y certificados de defunción [187].

## MATERIAL Y MÉTODOS

Por la riqueza de la información recogida, el gran tamaño muestral y el largo tiempo de seguimiento, el estudio EPIC constituye indudablemente un referente internacional para la investigación de factores asociados al desarrollo de cáncer.

### 4.1.2. La cohorte EPIC-España

La cohorte EPIC-España es parte del estudio EPIC. En el momento del reclutamiento, constaba de más de 41.400 sujetos (lo que supone casi un 8% de la muestra total del estudio EPIC) con edad comprendida entre 29 y 69 años, de los que el 62,3% eran mujeres. El reclutamiento tuvo lugar entre 1992 y 1996 en cinco áreas geográficas en España, a saber, Asturias, Gipuzkoa, Granada, Murcia y Navarra. La mayoría de participantes fueron reclutados a partir de donantes de sangre, aunque también se reclutó a afiliados a mutuas y empleados de ciertas empresas; en conjunto, la cohorte EPIC-España representa un amplio rango del espectro socioeconómico [189]. El método de contacto fue por correo o por teléfono, citando a los participantes a acudir personalmente a uno de los centros EPIC-España, donde se realizaron las entrevistas, las mediciones antropométricas y las extracciones de sangre. Se tomaron muestras de sangre de 39.578 participantes (95,5%), con cierta variación entre centros, encontrándose la mayor proporción de participantes con muestra disponible en Gipuzkoa (98,9%) y la menor en Granada (87,5%) [189].

La identificación de nuevos casos de la cohorte EPIC-España se basa en el enlace de los datos de la cohorte con los datos de los RCBP implantados en las cinco áreas correspondientes (Registro de Tumores del Principado de Asturias, Registro de Cáncer de Euskadi, Registro de Cáncer de Granada, Registro de Cáncer de Murcia y Registro de Cáncer de Navarra). El estado vital y la fecha de defunción se obtienen mediante los registros de mortalidad, gracias a un convenio firmado con el Instituto Nacional de Estadística (INE) [189].

### 4.1.3. Diseño del estudio

Se diseñó un estudio de casos y controles no emparejados extraídos de la cohorte EPIC-España. La muestra de estudio consistió en 600 sujetos procedentes de cuatro centros de la cohorte EPIC-España –Gipuzkoa, Granada, Murcia y Navarra–, divididos en 300

## MATERIAL Y MÉTODOS

casos y 300 controles. Los casos se definieron como mujeres con neoplasia maligna de mama, atendiendo al código de localización “C50” y al código de comportamiento “3” de la 3ª edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología (CIE-O-3) [190]. Los controles se definieron como mujeres sin cáncer de mama.

El tiempo de seguimiento comenzó en la fecha de reclutamiento y los casos incidentes se identificaron enlazando los datos de la cohorte EPIC-España con los de los RCBP del área donde los participantes residían en el momento de ser reclutados. La información sobre los casos, incluyendo la localización y sublocalización anatómica, la morfología tumoral, el comportamiento, el método diagnóstico, el estadio al diagnóstico (según la 7ª edición del sistema de clasificación TNM) y la fecha de diagnóstico se obtuvieron de dichos RCBP. La fecha de fin de seguimiento para la identificación de casos fue el 31/12/2012.

Las 300 participantes con un primer cáncer primario (incidente) de mama se seleccionaron aleatoriamente de un grupo de 643 casos identificados durante el seguimiento, muestreando un número igual por cada uno de los cuatro centros descritos (75). Previamente, se habían excluido de dicho grupo a los casos con múltiples tumores primarios y a los casos con carcinoma *in situ*. Con respecto a los 300 controles, se seleccionaron mediante muestro aleatorio estratificado por centro (de nuevo, 75) entre las mujeres que no habían desarrollado ningún tipo de cáncer a fecha 31/12/2012.

Las características de la muestra seleccionada en relación con el resto de la cohorte EPIC-España fueron por lo general similares, excepto en la distribución del centro y del sexo, a causa del tipo de muestreo, así como la del consumo de alcohol, que fue menor en la muestra de estudio (Tabla 5).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 5.** Comparación entre los participantes seleccionados y no seleccionados de la cohorte EPIC-España.

Característica	Seleccionados, N=600 (1,4%)	No seleccionados, N=40.837 (98,6%)
<b>Centro</b>		
Asturias	0 (0%)	8.542 (20,9%)
Gipuzkoa	150 (25,0%)	8.267 (20,2%)
Granada	150 (25,0%)	7.729 (18,9%)
Murcia	150 (25,0%)	8.365 (20,5%)
Navarra	150 (25,0%)	7.934 (19,4%)
<b>Sexo</b>		
Femenino	600 (100,0%)	25.208 (61,7%)
Masculino	0 (0,0%)	15.629 (38,3%)
<b>Edad, años</b>		
<40	69 (11,5%)	5.387 (13,2%)
40-49	222 (37,0%)	17.413 (42,6%)
50-59	216 (36,0%)	12.945 (31,7%)
≥60	93 (15,5%)	5.092 (12,5%)
<b>Nivel educativo</b>		
Ninguno	241 (40,6%)	14.060 (34,7%)
Educación primaria	226 (38,0%)	15.790 (38,9%)
Formación profesional	42 (7,1%)	3.359 (8,3%)
Educación secundaria o bachillerato	29 (4,9%)	2.647 (6,5%)
Titulación universitaria	56 (9,4%)	4.708 (11,6%)
Desconocido	6 (1,0%)	273 (0,7%)
<b>Nivel de actividad física, MET-h/semana</b>		
Inactiva	257 (42,8%)	15.376 (37,7%)
Moderadamente inactiva	189 (31,5%)	12.377 (30,3%)
Moderadamente activa	110 (18,3%)	8.100 (19,8%)
Activa	44 (7,3%)	4.984 (12,2%)
<b>Índice cintura-cadera</b>	0,83 (0,79–0,87)	0,87 (0,81–0,93)
<b>Índice de masa corporal, kg/m<sup>2</sup></b>		
Normopeso	166 (27,7%)	8.985 (22,0%)
Sobrepeso	261 (43,5%)	19.531 (47,8%)
Obesidad	173 (28,8%)	12.321 (30,2%)
<b>Consumo de alcohol</b>		
No bebedora	283 (47,2%)	15.417 (37,8%)
Bebedora ≤20 g/d	277 (46,2%)	15.981 (39,1%)
Bebedora >20 g/d	40 (6,7%)	9.439 (23,1%)

Los datos se presentan como frecuencia absoluta y porcentaje (v. cualitativas), y como mediana y rango intercuartílico (v. cuantitativas). MET: equivalentes metabólicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2. Evaluación de covariables

En el momento del reclutamiento, se administró un cuestionario estandarizado por personal debidamente entrenado para obtener información sobre estilos de vida y otros factores relacionados con la salud. El cuestionario contenía preguntas sobre el estatus menopáusico, la historia reproductiva, el uso de anticonceptivos orales, el tratamiento con terapia hormonal sustitutiva (THS), el nivel educativo, el consumo del alcohol y tabaco, y la actividad física [187]. El cuestionario original administrado a mujeres de la cohorte EPIC-España se puede consultar en el Anexo 1.

El nivel educativo, referido al máximo nivel alcanzado, se clasificó en ninguno, educación primaria, formación profesional, educación secundaria o bachillerato y titulación universitaria. El consumo de alcohol en gramos diarios se categorizó en no bebedora (0 g/d), bebedora  $\leq 20$  g/d y bebedora  $> 20$  g/d. El hábito tabáquico se agrupó en tres categorías: nunca fumadora, exfumadora y fumadora activa. El estatus menopáusico se dividió en pre, peri y postmenopáusica, distinguiendo en la última categoría si el motivo era quirúrgico (es decir, por la deprivación de estrógenos secundaria a ooforectomía).

La mayor complejidad de la actividad física requiere una explicación detallada. A partir de la actividad física realizada en los ámbitos doméstico, laboral y recreativo, y teniendo en cuenta la variación estacional, se crearon tres índices –de actividad total, de Cambridge y de actividad recreativa– [191]. Cada índice consta de cuatro niveles de actividad física. Los tres índices fueron validados analizando la correlación del nivel de actividad física reportado en el cuestionario con la frecuencia cardíaca y el movimiento detectado mediante sensores. En la cohorte EPIC-España, el índice que mostró una mayor correlación (0,33) con el tiempo invertido en actividades de intensidad moderada o vigorosa fue el de actividad física recreativa [191], por lo que fue el índice que se decidió emplear en la presente tesis doctoral. Los niveles en los que se categorizó la actividad física recreativa, en equivalentes metabólicos (MET) por hora semanales, son: inactiva ( $\leq 19,5$  MET-h/semana), moderadamente inactiva ( $> 19,5$  MET-h/semana y  $\leq 33,75$  MET-h/semana), moderadamente activa ( $> 33,75$  MET-h/semana y  $\leq 54,75$  MET-h/semana) y activa ( $> 54,75$  MET-h/semana).

## MATERIAL Y MÉTODOS

También en el reclutamiento, se midieron la talla, el peso, y las circunferencias de cadera y cintura, mediante procedimientos estandarizados [187]. El índice cintura-cadera es el cociente entre ambas circunferencias y se trató como variable continua. El IMC, definido como la razón entre el peso en kilogramos y el cuadrado de la talla en metros, se clasificó en normopeso ( $<25 \text{ kg/m}^2$ ), sobrepeso ( $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  y  $<30 \text{ kg/m}^2$ ) y obesidad ( $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).

En la cohorte EPIC-España, el ajuste por ropa de las mediciones antropométricas no fue necesario y el ajuste por la fuente de datos fue mínimo (solo el 0,6% de valores del peso y el 0,2% de valores de la talla fueron autorreportados). Además, fue necesario imputar los datos antropométricos faltantes (asignando el valor promedio para cada combinación de centro, edad y sexo), aunque la proporción de valores faltantes en la cohorte EPIC-España fue inferior al 1% para el peso, la talla, el perímetro de cintura y el perímetro de cadera. Dicha decisión se tomó en 2001, en el contexto más amplio del estudio EPIC, con el objetivo de evitar la presencia de datos faltantes en las variables antropométricas, considerando su importancia como posibles factores de confusión.

La lista de covariables basales incluidas en esta tesis doctoral es la siguiente:

- *Área de residencia*. Variable cualitativa nominal. Categorías: Gipuzkoa, Granada, Murcia, Navarra.
- *Edad*. Variable cuantitativa continua. Unidad: años.
- *Nivel educativo*. Variable cualitativa ordinal. Categorías: ninguno, educación primaria, formación profesional, educación secundaria o bachillerato, titulación universitaria.
- *Nivel de actividad física*. Variable cuantitativa continua. Unidad: MET por hora semanales.
- *Índice cintura-cadera*. Variable cuantitativa continua. Unidad: no tiene (por ser el cociente entre dos circunferencias medidas en centímetros).
- *IMC*. Variable cualitativa ordinal. Categorías: normopeso ( $<25 \text{ kg/m}^2$ ), sobrepeso ( $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  y  $<30 \text{ kg/m}^2$ ) y obesidad ( $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).
- *Consumo de alcohol*. Variable cuantitativa continua. Unidad: gramos diarios.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- *Consumo de tabaco*. Variable cualitativa ordinal. Categorías: nunca fumadora, exfumadora, fumadora activa.
- *Estatus menopáusico*. Variable cualitativa nominal. Categorías: premenopáusica, perimenopáusica, postmenopáusica, postmenopáusica quirúrgica.
- *Nuliparidad*. Variable cualitativa dicotómica. Categorías: ningún embarazo, uno o más embarazos.
- *Antecedente de lactancia materna*. Variable cualitativa dicotómica. Categorías: sí, no.
- *Duración de la lactancia materna*. Variable cuantitativa continua. Unidad: meses.
- *Uso de anticonceptivos orales*. Variable cualitativa dicotómica. Categorías: sí, no.
- *Duración del uso de anticonceptivos orales*. Variable cuantitativa continua. Unidad: años.
- *Tratamiento con THS*. Variable cualitativa dicotómica. Categorías: sí, no.
- *Duración del tratamiento con THS*. Variable cuantitativa continua. Unidad: años.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.3. Análisis químicos

Se tomaron muestras de sangre de cada participante en el reclutamiento, mayoritariamente en ayunas (77,7%). Dichas muestras se centrifugaron y se almacenaron alícuotas de plasma de 0,5 ml en nitrógeno líquido ( $-180^{\circ}\text{C}$ ). Las muestras se analizaron sin conocimiento del desenlace de estudio (caso vs. control).

Se cuantificaron las concentraciones de 16 MPS: As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V, W y Zn. Los MPS se analizaron mediante ICP-MS (espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente) empleando el sistema Agilent 8900 triple cuadrupolo (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos), ajustado y calibrado previamente al análisis. Esta técnica analítica usa plasma acoplado inductivamente para ionizar las muestras, lo que permite una cuantificación precisa de los elementos. Las ventajas de la ICP-MS sobre la espectrometría de masas tradicional incluyen la alta sensibilidad, la posibilidad de realizar análisis multi-elemental y el uso de límites de detección más bajos, por lo que es particularmente útil para realizar análisis ambientales y de elementos traza.

A las muestras de plasma se le añadieron 400 ng/ml de una solución estándar interna multi-elemento con contenido en escandio, germanio, iridio y rodio. Se emplearon materiales certificados de referencia, específicamente agua del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST Trace Elements in Natural Water Standard Reference Material SRM 1640a), así como el patrón certificado de metales en suero Seronorm Trace elements Serum L-2 (Sero, Billingstad, Noruega), los cuales se analizaron junto a un blanco y un patrón de calibración intermedio cada 12 muestras para maximizar la validez de los resultados. Además, se reanalizó 1 de cada 12 muestras (8,3%) al final de cada sesión de trabajo como control de calidad.

Los límites de detección (LD) estuvieron comprendidos entre 0,01 ng/ml (As, Co y W) y 18,43 ng/ml (Zn); a los valores por debajo del LD se les asignó el LD dividido entre la raíz cuadrada de 2. El rango de los límites de cuantificación (LC) abarcó desde 0,02 ng/ml (Co) hasta 55,29 ng/ml (Zn). El Anexo 2 recoge una lista con los LD y LC de todos los elementos estudiados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.4. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis univariante para describir las características de la muestra analizada, empleando medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, y frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas. Para resumir numéricamente las concentraciones de MPS, se usó la media geométrica –la raíz enésima del producto de un conjunto  $n$  de números positivos– con su intervalo de confianza (IC) al 95%. La decisión de utilizar la media geométrica se fundamenta en la naturaleza asimétrica de dichas variables, que aconseja el empleo de medidas de tendencia central robustas.

A continuación, se realizó un análisis bivariante para comparar las características individuales de los casos de cáncer con las de los controles. Como test de contraste de hipótesis, se empleó el test de chi-cuadrado para variables cualitativas categóricas (no se precisó el test exacto de Fisher para ninguna variable) y el test de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas continuas, puesto que no se cumplieron las condiciones de aplicación del test  $t$  de Student para ninguna variable). Igualmente, las comparaciones de los niveles de MPS entre casos y controles se realizaron empleando el test de la U de Mann-Whitney, dada su distribución asimétrica. Además, se creó una matriz de correlación de Spearman para examinar la dirección y magnitud de las relaciones monotónicas entre MPS.

Se construyeron modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos como abordaje inicial para explorar asociaciones entre MPS considerados individualmente y el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Los elementos con  $>25\%$  de valores por debajo del LD (Be y Cd) se excluyeron del análisis individual. Todos estos modelos se ajustaron por edad al reclutamiento, estatus menopáusico, nuliparidad, historia de lactancia materna, tratamiento con THS, IMC (incluyendo su interacción con el estatus menopáusico), nivel de actividad física, consumo de alcohol, tabaquismo, nivel educativo y área de residencia. Se modelizaron efectos fijos para todos los factores, salvo para el área de residencia, que constituyó el término aleatorio (intercepto). Para evaluar relaciones lineales y no lineales, se utilizaron tres estrategias de inclusión de

## MATERIAL Y MÉTODOS

cada MPS en los modelos: como variable continua, tras transformación logarítmica en base 2, y tras categorización en cuartiles.

Para evaluar las mezclas de MPS, los valores de los MPS se normalizaron para tener media aritmética=0 y desviación estándar=1, tras lo que se categorizaron en cuartiles. Entonces, se aplicaron modelos de QgC multivariante con distribución de probabilidad binomial, la apropiada para modelizar la variable dependiente (caso vs. control). Los elementos con >25% de valores bajo el LD (Be y Cd) también se excluyeron del análisis de mezclas. Todos estos modelos se ajustaron por las mismas variables de los modelos individuales (efectos fijos), junto con el área de residencia.

La QgC parte del siguiente modelo de regresión lineal (en aras de la simplicidad, no se incluyen covariables de ajuste):

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^d \beta_j X_{ji}^q + \varepsilon_i$$

En esta ecuación,  $Y_i$  representa el efecto conjunto, en cada individuo  $i$ , de incrementar en un cuantil la exposición a todas las exposiciones;  $\beta_0$  representa el término independiente o intercepto;  $\sum_{j=1}^d \beta_j X_{ji}^q$  representa la sumatoria de los coeficientes de regresión  $\beta_j$  de un número  $d$  de exposiciones categorizadas en cuantiles  $X^q$  ponderadas por su peso  $j$ , y  $\varepsilon_i$  representa el término de error aleatorio [181]. Nótese que, bajo el supuesto de homogeneidad direccional (es decir, si todas las exposiciones se asocian a un efecto positivo o a un efecto negativo), los pesos deben sumar  $|1|$ .

En primer lugar, se construyó un modelo condicional a las covariables de ajuste para identificar la influencia de cada elemento en el efecto de la mezcla. Dicho modelo asignó un peso positivo o negativo a cada componente, permitiendo evaluar el sentido de su asociación con el riesgo de cáncer, así como cuantificar su magnitud. A continuación, se estimó el efecto conjunto de la exposición a MPS. Tras multiplicar por  $(-1)$  las concentraciones normalizadas de los elementos con asociación negativa en el análisis individual y/o con peso negativo en el modelo condicional, se construyó un

## MATERIAL Y MÉTODOS

modelo marginal estructural de QgC para estimar el efecto medio poblacional, suponiendo linealidad y aditividad.

Para evaluar el posible efecto no lineal de la mezcla (en el escenario aditivo), se aplicaron modelos con *splines* cúbicos restringidos con 2 grados de libertad para todos los elementos; la elección de 2 grados de libertad se basó en la hipótesis de que el efecto de los MPS podría alcanzar un punto de saturación en concentraciones elevadas. Se construyó un modelo con *splines* cúbicos restringidos para todos los MPS y otros para los elementos de los que se identificasen potenciales relaciones no lineales en el análisis individual. Posteriormente, para la evaluación de efectos no aditivos, se añadieron interacciones plausibles entre MPS reportadas previamente en la literatura [192–194]. Únicamente se incluyeron las interacciones entre elementos considerados relevantes en la mezcla, según su peso en el modelo condicional. Por último, la mezcla de MPS se dividió en elementos esenciales, que se definen por tener una o más funciones biológicas (Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V y Zn) y no esenciales, que no las tienen (As, Hg, Pb, Sb y W). Se construyó un modelo bajo los supuestos de linealidad y aditividad para cada mezcla resultante de la división (esto es, para cada uno de los dos subconjuntos de elementos).

Todos los test estadísticos fueron bilaterales y se estableció un nivel de significación  $\alpha=0,05$ , considerándose significativos los valores  $p < 0,05$ . Los análisis se realizaron usando Stata v17 (Stata Statistical Software: Release 17. College Station, TX: StataCorp LP) y R versión 4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

El código utilizado para el análisis individual de MPS está disponible en el Anexo 3; el código utilizado para el análisis de mezclas de MPS está disponible en el Anexo 4.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.5. Aspectos éticos

En este trabajo se analizaron muestras biológicas humanas como parte de la investigación. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. A todos los participantes se les informó en el reclutamiento de los objetivos del proyecto EPIC, y otorgaron consentimiento informado para la recogida y almacenamiento de datos, así como un seguimiento individual.

El proyecto EPIC fue aprobado por los comités éticos de la IARC (Lyon, Francia). El proyecto de investigación “*Exposure to mixtures of heavy metals and breast cancer risk in Spain: a causal inference analysis within the EPIC prospective cohort*” (P11-2021) recibió el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Granada (Granada, España) el 29/04/2021, con el Código Portal de Ética 0852-N-21. El proyecto de investigación “Co-exposición a metales pesados y metaloides, susceptibilidad genética asociada y riesgo de cáncer en la cohorte prospectiva EPIC: el proyecto MixMET” (PI21/01295) recibió el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Granada (Granada, España) el 21/12/2021, con el Código Portal de Ética 2701-N-21.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 5. Resultados

#### 5.1. Descripción de la muestra

De los 600 sujetos (300 casos y 300 controles) inicialmente seleccionados para el estudio, se pudieron determinar las concentraciones de MPS en 286 casos y 292 controles con muestra de plasma disponible. Por tanto, la muestra de estudio finalmente empleada fue de 578 mujeres. Las participantes tenían una edad mediana en el reclutamiento de 50,3 años, con un rango intercuartílico (RIC) entre 44,4 y 57,1 años. Una proporción considerable no había alcanzado la educación primaria (39,6%), una de cada cuatro era físicamente activa o moderadamente activa (25,8%), y una amplia mayoría presentaba sobrepeso u obesidad (72,1%). Respecto al consumo de tóxicos, la mayoría de participantes consumía alcohol (53,6%) y nunca había fumado (75,4%). En cuanto a la historia reproductiva, únicamente 67 mujeres refirieron ser nulíparas (11,8%), mientras que la mayoría tenía antecedentes de lactancia materna (78,2%) y casi la mitad eran postmenopáusicas (45,3%). La Tabla 6 describe las características basales de la muestra.

Los porcentajes de detección de MPS en plasma mostraron una elevada variabilidad: mientras el Be (1,2%) y el Cd (9,0%) se detectaron raramente y, por tanto, fueron excluidos de los análisis estadísticos, los valores del resto de elementos superaron el LD en más del 75% de muestras analizadas. Las medias geométricas fueron superiores para el Cu (845,6 ng/ml), el Zn (604,8 ng/ml) y, en menor medida, el Se (74,1 ng/ml), mientras que fueron menores para el W (0,02 ng/ml) y el Pb (0,23 ng/ml). Estos valores se detallan en la Tabla 7 y se representan en la Figura 10.

Las principales correlaciones observadas entre MPS fueron positivas: entre Mn y W ( $\rho=0,48$ ), entre Hg y As ( $\rho=0,35$ ), entre Hg y Se ( $\rho=0,34$ ) y entre Ni y Sb ( $\rho=0,34$ ). La Figura 11 muestra la matriz de correlación de Spearman.

## RESULTADOS

**Tabla 6.** Características basales del total de la muestra.

Característica	Participantes, N=578 (100%)
Área de residencia	
Gipuzkoa	148 (25,6%)
Granada	132 (22,8%)
Murcia	150 (26,0%)
Navarra	148 (25,6%)
Edad, años	
<40	167 (11,6%)
40-49	217 (37,5%)
50-59	207 (35,8%)
≥60	87 (15,1%)
Nivel educativo	
Ninguno	227 (39,6%)
Educación primaria	222 (38,7%)
Formación profesional	42 (7,3%)
Educación secundaria o bachillerato	28 (4,9%)
Titulación universitaria	54 (9,4%)
Desconocido	5 (0,9%)
Nivel de actividad física, MET-h/semana	
Inactiva	246 (42,6%)
Moderadamente inactiva	183 (31,7%)
Moderadamente activa	106 (18,3%)
Activa	43 (7,4%)
Índice cintura-cadera	0,83 (0,79–0,87)
Índice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>	
Normopeso	161 (27,9%)
Sobrepeso	251 (43,4%)
Obesidad	166 (28,7%)
Consumo de alcohol	
No bebedora	268 (46,4%)
Bebedora ≤20 g/d	271 (46,9%)
Bebedora >20 g/d	39 (6,7%)
Consumo de tabaco	
Nunca	436 (75,4%)
Exfumadora	57 (9,9%)
Fumadora activa	85 (14,7%)
Estatus menopáusico	
Premenopáusica	266 (46,0%)
Perimenopáusica	50 (8,7%)
Postmenopáusica	240 (41,5%)
Postmenopáusica (quirúrgica)	22 (3,8%)
Nuliparidad	67 (11,8%)
Desconocido	8 (1,4%)
Historia de lactancia materna	445 (78,2%)
Desconocido	9 (1,6%)
Duración de lactancia materna, meses	10 (5–18)
Desconocido	9 (1,6%)
Uso de anticonceptivos orales	219 (37,9%)
Duración del uso de anticonceptivos orales, años	2 (1–5)
Tratamiento con THS	63 (11,3%)
Desconocido	22 (3,8%)
Duración del tratamiento con THS, años	2 (1–2)
Desconocido	25 (4,3%)

Los datos se presentan como frecuencia absoluta y porcentaje (v. cualitativas), y como mediana y rango intercuartílico (v. cuantitativas). MET: equivalentes metabólicos. THS: terapia hormonal sustitutiva.

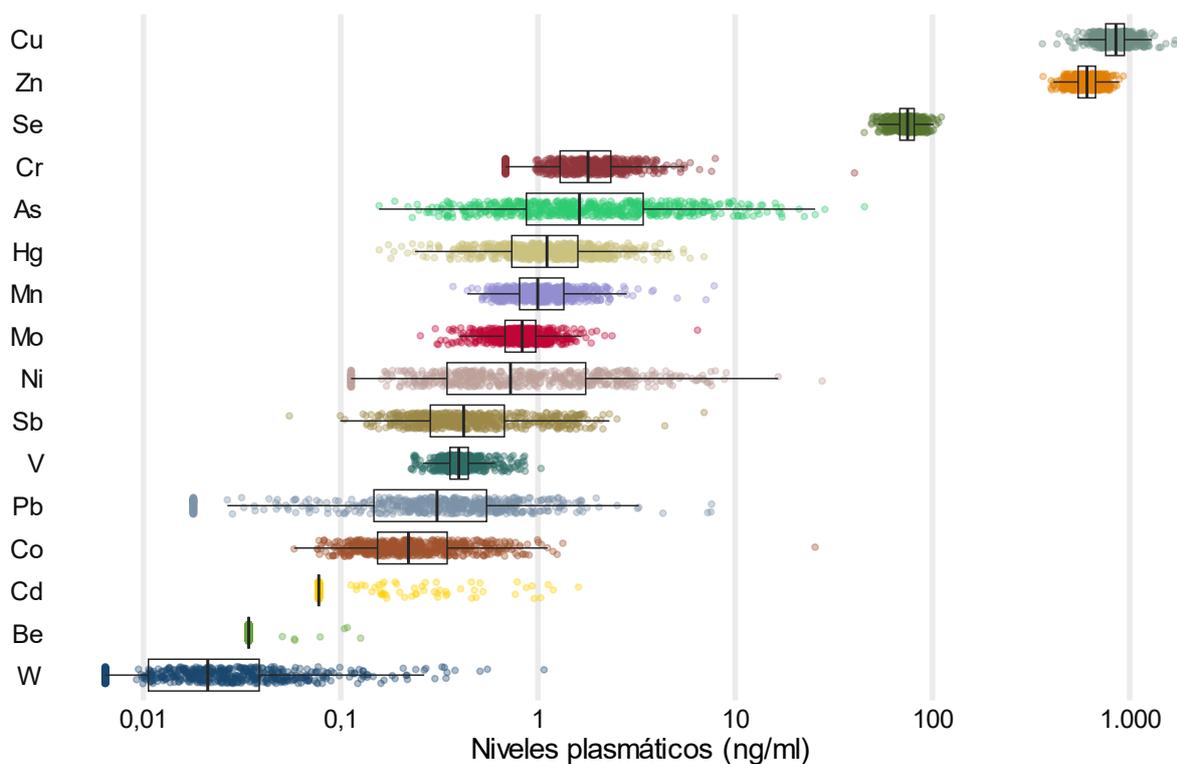
## RESULTADOS

**Tabla 7.** Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en el total de la muestra, en ng/ml.

MPS	>LD (%)	p10	p25	p50	p75	p90	Máximo	MG	IC 95%
As	100,0	0,51	0,87	1,62	3,42	6,40	45,25	1,78	1,64–1,92
Be	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Co	100,0	0,12	0,15	0,22	0,35	0,54	25,43	0,24	0,22–0,25
Cr	87,4	0,69	1,29	1,79	2,34	3,04	40,27	1,72	1,65–1,79
Cu	100,0	688,24	756,50	852,01	940,11	1.051,45	1.702,97	845,55	833,00–858,30
Hg	100,0	0,50	0,74	1,11	1,59	2,26	6,95	1,09	1,04–1,14
Mn	100,0	0,66	0,81	1,00	1,35	1,74	7,82	1,05	1,02–1,09
Mo	100,0	0,55	0,68	0,83	0,97	1,16	6,44	0,81	0,79–0,84
Ni	90,1	0,17	0,35	0,73	1,75	2,95	27,60	0,75	0,68–0,82
Pb	84,8	0,02	0,15	0,31	0,55	0,83	7,59	0,23	0,20–0,25
Sb	100,0	0,21	0,28	0,42	0,68	1,28	6,96	0,46	0,44–0,49
Se	100,0	62,22	68,37	74,83	80,87	87,61	111,01	74,08	73,27–74,91
V	100,0	0,32	0,36	0,40	0,44	0,53	1,04	0,41	0,40–0,41
W	77,0	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	1,07	0,02	0,02–0,02
Zn	100,0	497,39	548,22	607,86	671,79	724,91	929,06	604,81	597,59–612,11

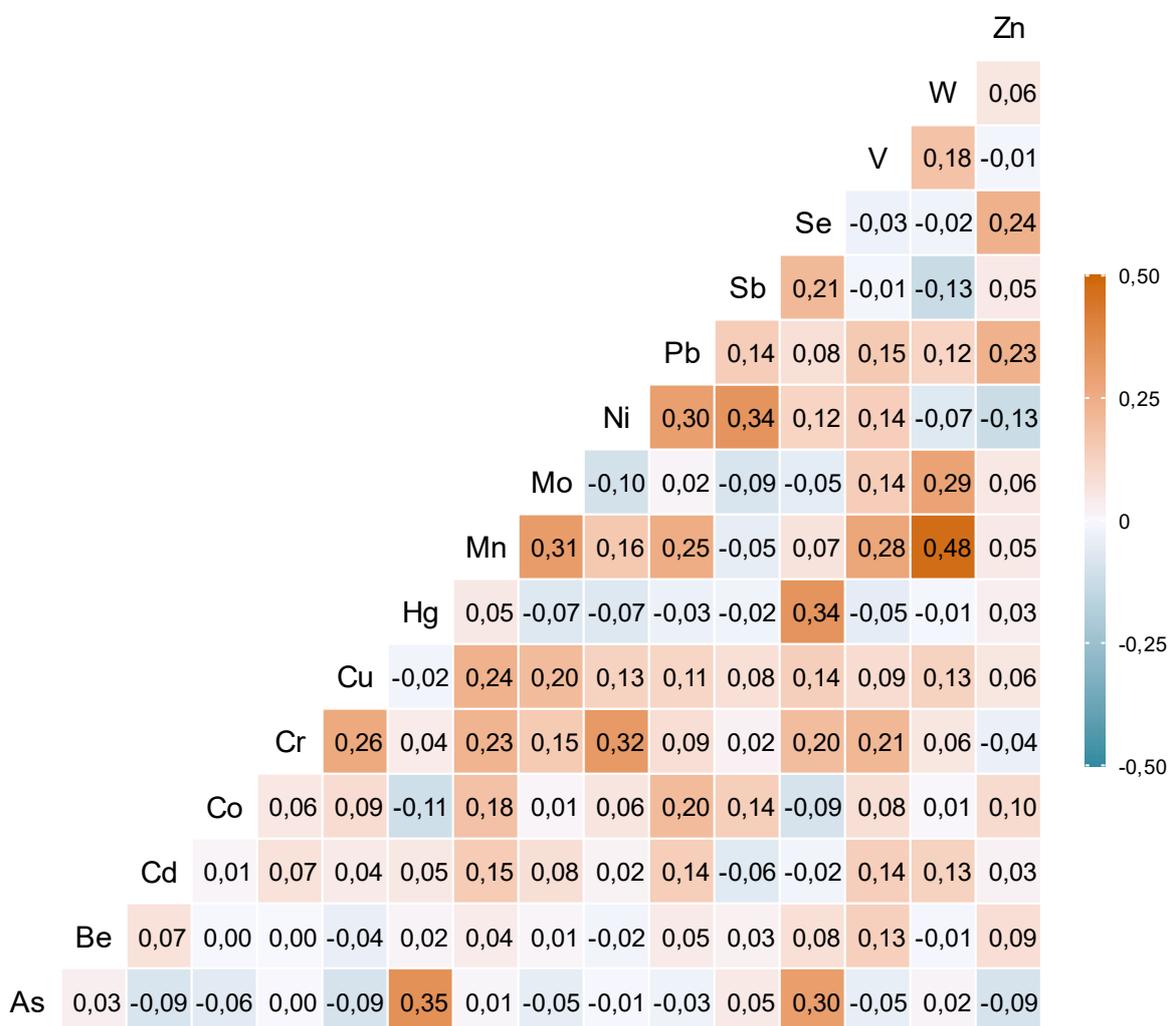
IC: intervalo de confianza. LD: límite de detección. MG: media geométrica.

**Figura 10.** Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en el total de la muestra, en ng/ml.



## RESULTADOS

**Figura 11.** Matriz de correlación de Spearman de metales pesados y semimetales (MPS).



Los números indican el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) para cada par de MPS.

## RESULTADOS

### 5.2. Análisis bivariante

En comparación con los controles, los casos eran más jóvenes ( $p < 0,001$ ), teniendo consiguientemente una frecuencia mayor de estatus premenopáusico (54,5% vs. 37,7%,  $p < 0,001$ ). Además, consumían alcohol y tabaco con mayor frecuencia, aunque solo se encontraron diferencias significativas para el tabaquismo ( $p = 0,085$  y  $p = 0,041$ , respectivamente). En cuanto a factores hormonales y reproductivos, ambos grupos mostraron una frecuencia similar de historia de lactancia materna, pero su duración fue algo superior en los controles; en cambio, la frecuencia de uso de anticonceptivos orales ( $p = 0,009$ ) y su duración ( $p = 0,041$ ) fueron significativamente mayores en los casos. Atendiendo al cáncer de mama, casi cuatro de cada cinco casos (77,3%) se diagnosticaron en estadios tempranos, es decir, estadio I o II de la clasificación TNM. Las diferencias basales entre casos y controles se exponen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Características sociodemográficas y clínicas basales de los casos de cáncer en comparación con los controles.

Característica	Casos, N=286 (49,5%)	Controles, N=292 (50,5%)	Valor p <sup>1</sup>
Área de residencia			-
Gipuzkoa	74 (25,9%)	74 (25,3%)	
Granada	62 (21,7%)	70 (24,0%)	
Murcia	75 (26,2%)	75 (25,7%)	
Navarra	75 (26,2%)	73 (25,0%)	
Edad, años			<b>&lt;0,001</b>
<40	48 (16,8%)	19 (6,5%)	
40-49	117 (40,9%)	100 (34,2%)	
50-59	91 (31,8%)	116 (39,7%)	
≥60	30 (10,5%)	57 (19,5%)	
Nivel educativo			0,838
Ninguno	111 (39,1%)	116 (40,1%)	
Educación primaria	113 (39,8%)	109 (37,7%)	
Formación profesional	18 (6,3%)	24 (8,3%)	
Educación secundaria o bachillerato	13 (4,6%)	15 (5,2%)	
Titulación universitaria	29 (10,2%)	25 (8,7%)	
Desconocido	2 (0,3%)	3 (0,5%)	
Nivel de actividad física, MET-h/semana			0,438
Inactiva	121 (42,3%)	125 (42,8%)	
Moderadamente inactiva	84 (29,4%)	99 (33,9%)	
Moderadamente activa	56 (19,6%)	50 (17,1%)	
Activa	25 (8,7%)	18 (6,2%)	
Índice cintura-cadera	0,83 (0,79–0,87)	0,82 (0,79–0,87)	0,999
Índice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>			0,512
Normopeso	85 (29,7%)	76 (26,0%)	
Sobrepeso	118 (41,3%)	133 (45,5%)	
Obesidad	83 (29,0%)	83 (28,4%)	

## RESULTADOS

**Tabla 8** (continuación)

Característica	Casos, N=286 (49,5%)	Controles, N=292 (50,5%)	Valor p <sup>1</sup>
Consumo de alcohol			0,085
No bebedora	123 (43,0%)	145 (49,7%)	
Bebedora ≤20 g/d	138 (48,3%)	133 (45,5%)	
Bebedora >20 g/d	25 (8,7%)	14 (4,8%)	
Consumo de tabaco			<b>0,041</b>
Nunca	203 (71,0%)	233 (79,8%)	
Exfumadora	35 (12,2%)	22 (7,5%)	
Fumadora activa	48 (16,8%)	37 (12,7%)	
Estatus menopáusico			<b>0,001</b>
Premenopáusica	156 (54,5%)	110 (37,7%)	
Perimenopáusica	20 (7,0%)	30 (10,3%)	
Postmenopáusica	101 (35,5%)	139 (47,6%)	
Postmenopáusica (quirúrgica)	9 (3,1%)	13 (4,5%)	
Nuliparidad	33 (11,8%)	34 (11,7%)	0,999
Desconocido	6 (1,0%)	2 (0,3%)	
Antecedente de lactancia materna	218 (77,9%)	227 (78,5%)	0,922
Desconocido	6 (1,0%)	3 (0,5%)	
Duración de lactancia materna, meses	9 (5–18)	11 (6–17)	0,188
Desconocido	6 (1,0%)	3 (0,5%)	
Uso de anticonceptivos orales	124 (43,4%)	95 (32,5%)	<b>0,009</b>
Duración del uso de anticonceptivos orales, años	2 (1–5)	1 (1–4)	<b>0,041</b>
Tratamiento con THS	33 (11,7%)	30 (10,9%)	0,860
Desconocido	5 (0,9%)	17 (2,9%)	
Duración del tratamiento con THS, años	1 (1–2)	2 (1–3)	0,397
Desconocido	7 (1,2%)	18 (3,1%)	
Estadio tumoral al diagnóstico			-
I	188 (65,7%)	-	
II	20 (7,0%)	-	
III	55 (19,2%)	-	
IV	6 (2,1%)	-	
Desconocido	17 (5,9%)	-	
Localización tumoral (códigos CIE-O-3)			-
Lesión solapada (C50.8)	85 (29,7%)	-	
Cuadrante superior externo (C50.4)	83 (29,0%)	-	
Lesión no especificada (C50.9)	43 (15,0%)	-	
Cuadrante superior interno (C50.2)	24 (8,4%)	-	
Cuadrante inferior externo (C50.5)	18 (6,3%)	-	
Otras	33 (11,5%)	-	
Morfología tumoral (códigos CIE-O-3)			-
Carcinoma ductal infiltrante (8500/3)	211 (73,8%)	-	
Carcinoma lobulillar no especificado (8520/3)	23 (8,0%)	-	
Carcinoma ductal y lobulillar infiltrante (8522/3)	12 (4,2%)	-	
Carcinoma ductal infiltrante mezclado con otros tipos de carcinoma (8523/3)	7 (2,4%)	-	
Comedocarcinoma no especificado (8501/3)	5 (1,7%)	-	
Otras	28 (9,8%)	-	

Los datos se presentan como frecuencia absoluta y porcentaje (v. cualitativas), y como mediana y rango intercuartílico (v. cuantitativas). <sup>1</sup>Valor p del test de chi-cuadrado o de la U de Mann-Whitney, según corresponda. Se resaltan en negrita los valores p <0,05. CIE-O-3: 3ª ed. de la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología. MET: equivalentes metabólicos. THS: terapia hormonal sustitutiva.

## RESULTADOS

Al analizar las concentraciones plasmáticas de MPS en función del desenlace de estudio, se observó que las concentraciones de Cu fueron mayores en los casos de cáncer de mama ( $p=0,010$ ), mientras que los controles presentaron mayores concentraciones de Zn ( $p<0,001$ ) y Mo ( $p=0,130$ ). Para el resto de elementos, los valores fueron similares.

La Tabla 9 ofrece una comparación detallada de los valores plasmáticos de MPS entre casos y controles. Además, los valores de MPS en ambos grupos se representan en la Figura 12.

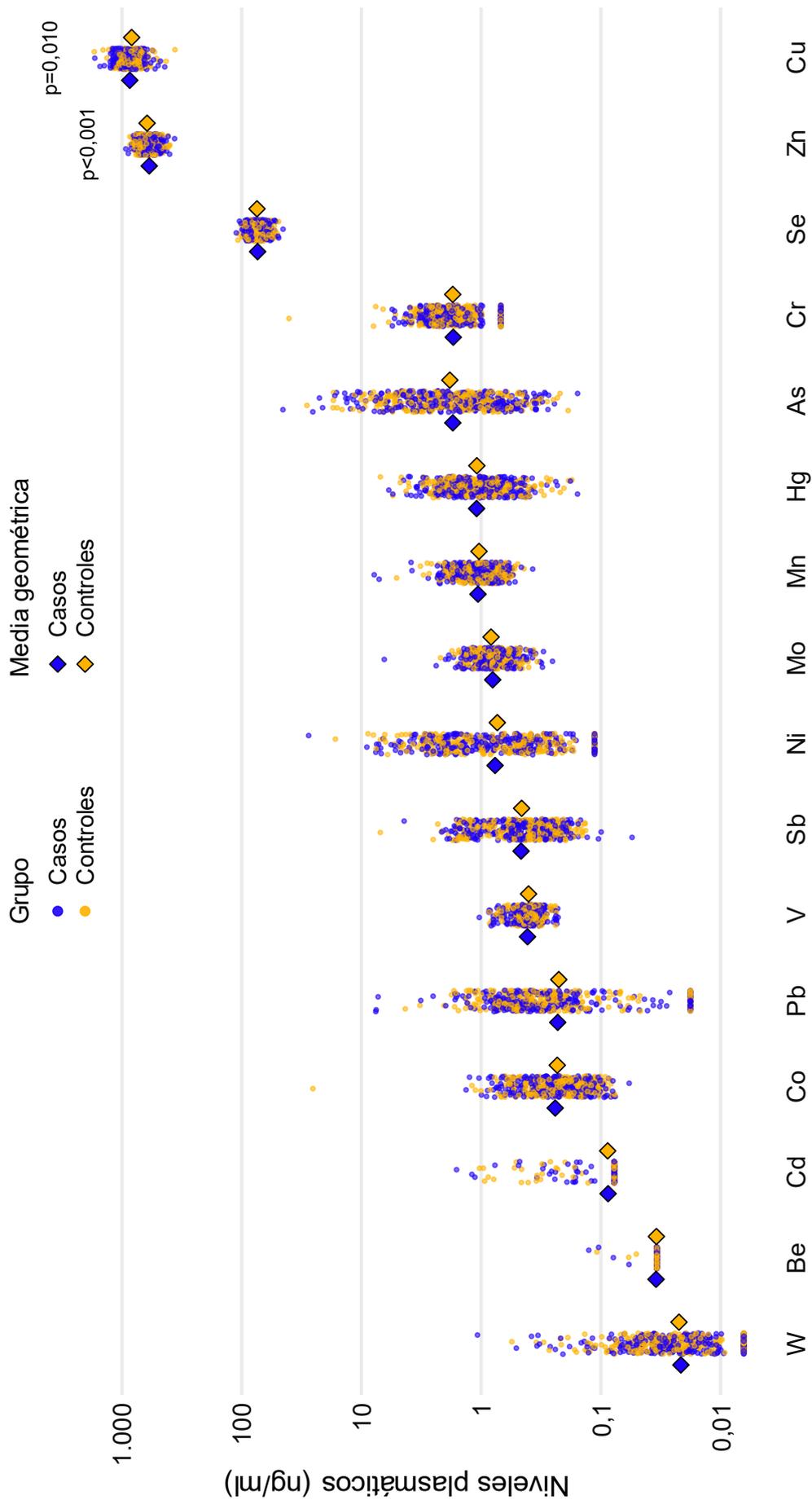
**Tabla 9.** Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en los casos de cáncer en comparación con los controles, en ng/ml.

MPS	Casos, N=286 (49,5%)				Controles, N=292 (50,5%)				Valor p <sup>1</sup>
	>LD (%)	p50	MG	IC 95%	>LD (%)	p50	MG	IC 95%	
As	100,0	1,61	1,72	1,53–1,94	100,0	1,63	1,83	1,64–2,04	0,348
Be	1,4	-	-	-	1,0	-	-	-	-
Cd	9,8	-	-	-	8,2	-	-	-	-
Co	100,0	0,23	0,24	0,22–0,26	100,0	0,22	0,23	0,22–0,25	0,397
Cr	85,7	1,86	1,71	1,61–1,81	89,0	1,74	1,73	1,63–1,83	0,542
Cu	89,5	868,10	861,24	842,65–880,25	100,0	834,15	830,47	813,69–847,59	<b>0,010</b>
Hg	100,0	1,10	1,09	1,02–1,17	100,0	1,12	1,09	1,01–1,16	0,793
Mn	100,0	0,99	1,06	1,01–1,11	100,0	1,01	1,04	1,00–1,09	0,774
Mo	100,0	0,82	0,80	0,77–0,84	100,0	0,85	0,83	0,80–0,85	0,130
Ni	100,0	0,80	0,77	0,67–0,87	90,8	0,65	0,73	0,65–0,83	0,610
Pb	85,3	0,32	0,23	0,20–0,27	84,2	0,30	0,22	0,19–0,26	0,844
Sb	100,0	0,43	0,46	0,43–0,50	100,0	0,40	0,46	0,42–0,50	0,580
Se	100,0	74,40	73,65	72,42–74,90	100,0	74,90	74,51	73,43–75,61	0,434
V	100,0	0,40	0,41	0,40–0,42	100,0	0,39	0,40	0,39–0,41	0,297
W	75,5	0,02	0,02	0,02–0,02	78,4	0,02	0,02	0,02–0,02	0,447
Zn	100,0	594,43	592,33	582,18–602,66	100,0	623,81	617,28	607,21–627,51	<b>&lt;0,001</b>

<sup>1</sup>Valor p del test de la U de Mann-Whitney. Se resaltan en negrita los valores  $p < 0,05$ . IC: intervalo de confianza. LD: límite de detección. MG: media geométrica.

# RESULTADOS

**Figura 12.** Concentraciones plasmáticas basales de metales pesados y semimetales (MPS) en los casos de cáncer en comparación con los controles, en ng/ml.



Se indican los valores  $p < 0,05$  del test de la U de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

### 5.3. Análisis multivariante

#### 5.3.1. Metales pesados y semimetales considerados individualmente

Todos los análisis que se presentan en este apartado corresponden a los modelos de regresión logística de efectos mixtos, ajustados por edad al reclutamiento, estatus menopáusico, nuliparidad, historia de lactancia materna, tratamiento con THS, IMC (incluyendo su interacción con el estatus menopáusico), nivel de actividad física, consumo de alcohol, tabaquismo, nivel educativo y área de residencia. Se modelizaron efectos fijos para todos los factores, salvo para el área de residencia, que constituyó el término aleatorio (intercepto).

#### *Modelos lineales*

En los modelos lineales, los elementos significativamente asociados a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama fueron el V (OR=4,87; IC 95%=3,06–7,76), el Pb (OR=1,21; IC 95%=1,08–1,35) y el Cu (OR=1,19; IC 95%=1,09–1,29). El único elemento asociado a menor riesgo fue el Co (OR=0,94; IC 95%=0,90–0,98). Los resultados de estos modelos se muestran en la Tabla 10 y la Figura 13.

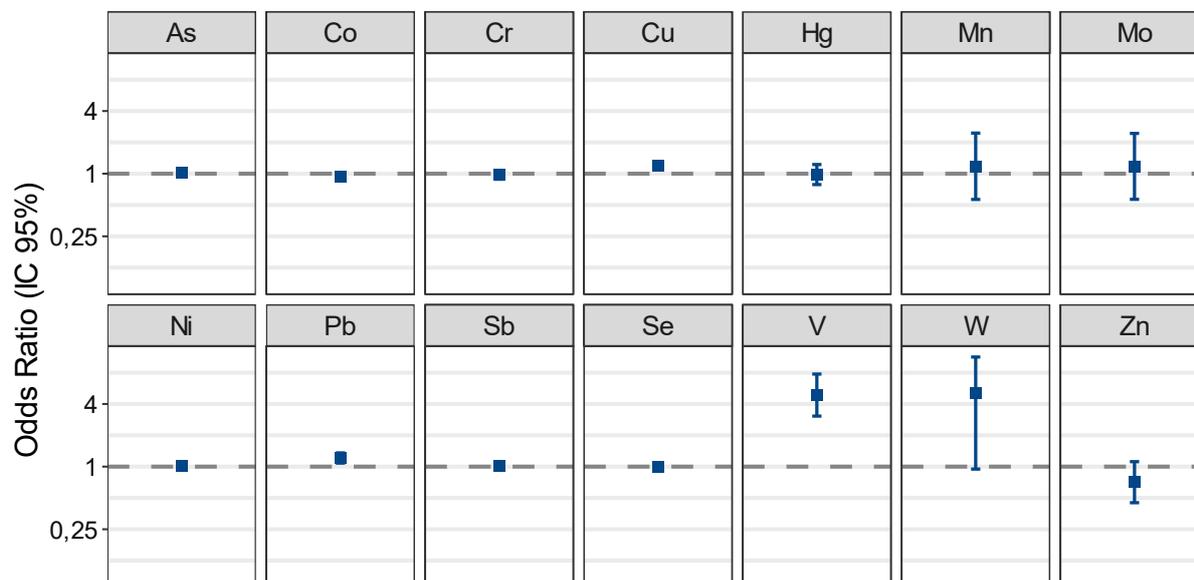
**Tabla 10.** Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), como variables continuas.

MPS	OR	IC 95%	Valor p
As	1,02	0,97–1,07	0,431
Co	0,94	0,90–0,98	<b>0,002</b>
Cr	0,98	0,88–1,08	0,625
Cu	1,19*	1,09–1,29	<b>&lt;0,001</b>
Hg	0,98	0,79–1,22	0,866
Mn	1,18	0,57–2,46	0,662
Mo	1,18	0,57–2,44	0,664
Ni	1,02	0,09–1,14	0,436
Pb	1,21	1,08–1,35	<b>0,001</b>
Sb	1,03	0,94–1,12	0,548
Se	0,99	0,99–1,00	0,111
V	4,87	3,06–7,76	<b>&lt;0,001</b>
W	5,06	0,95–26,98	0,058
Zn	0,71*	0,45–1,12	0,137

\*Odds ratio del incremento en la exposición a cobre y zinc en 100 ng/ml (en lugar de 1 ng/ml). Se resaltan en negrita los valores p <0,05. IC: intervalo de confianza. OR: odds ratio.

## RESULTADOS

**Figura 13.** Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), como variables continuas.



En los modelos del cobre y el zinc, la odds ratio representa el incremento en la exposición a en 100 ng/ml (en lugar de 1 ng/ml). IC: intervalo de confianza.

### *Modelos logarítmicos*

En los modelos logarítmicos (introduciendo los valores de MPS tras transformación logarítmica en base 2), los elementos significativamente asociados a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama fueron el Cu (OR=2,74; IC 95%=1,32–5,69), el V (OR=1,57; IC 95%=1,38–1,77) y el Pb (OR=1,04; IC 95%=1,03–1,06). Únicamente un elemento se asoció a menor riesgo: el Se (OR=0,66; IC 95%=0,43–0,99). Los resultados de estos modelos se muestran en la Tabla 11 y la Figura 14.

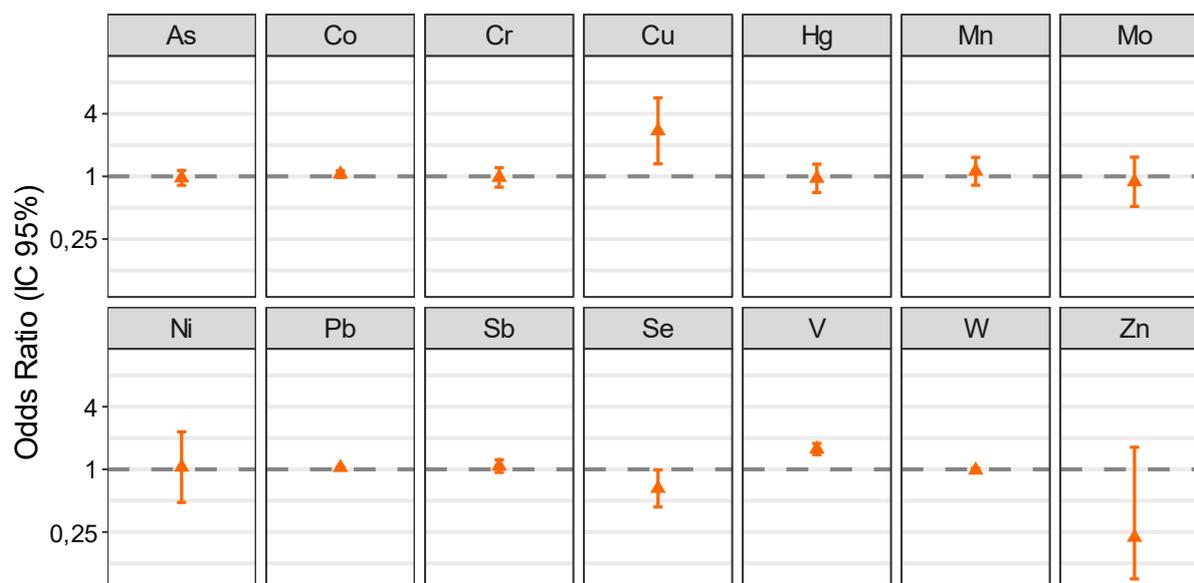
## RESULTADOS

**Tabla 11.** Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), tras transformación logarítmica.

MPS	OR	IC 95%	Valor p
As	0,97	0,82–1,14	0,691
Co	1,05	0,98–1,13	0,188
Cr	0,98	0,79–1,21	0,842
Cu	2,74	1,32–5,69	<b>0,007</b>
Hg	0,96	0,70–1,31	0,788
Mn	1,12	0,82–1,52	0,469
Mo	0,89	0,51–1,53	0,668
Ni	1,05	0,48–2,29	0,902
Pb	1,04	1,03–1,06	<b>&lt;0,001</b>
Sb	1,07	0,93–1,24	0,313
Se	0,66	0,43–0,99	<b>0,043</b>
V	1,57	1,38–1,77	<b>&lt;0,001</b>
W	0,98	0,94–1,03	0,446
Zn	0,22	0,03–1,63	0,139

Se resaltan en negrita los valores p <0,05. IC: intervalo de confianza. OR: odds ratio.

**Figura 14.** Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), tras transformación logarítmica.



IC: intervalo de confianza.

## RESULTADOS

### *Modelos categóricos (cuartiles)*

En los modelos categóricos (introduciendo los valores de MPS tras dividirlos en cuartiles de exposición), los elementos que se asociaron a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama fueron el Cu, para el que se observó un gradiente ( $OR_{C4vs.C1}=2,17$ ;  $OR_{C3vs.C1}=1,58$ ;  $OR_{C2vs.C1}=1,04$ ;  $p_{tendencia}<0,001$ ), el V ( $p_{tendencia}<0,001$ ), el Sb ( $p_{tendencia}=0,042$ ) y el Pb, aunque este último no alcanzó la significación estadística ( $p_{tendencia}=0,051$ ). El único elemento asociado a menor riesgo fue el W ( $p_{tendencia}=0,045$ ). Los resultados de estos modelos se muestran en la Tabla 12 y la Figura 15.

Integrando los análisis individuales de MPS, los elementos que se asociaron significativamente con el riesgo de cáncer de mama en al menos dos de las tres estrategias fueron el Cu, el Pb y el V. En los tres casos, la asociación fue positiva. Además, se identificaron potenciales relaciones no lineales para el efecto individual del Sb (categorizado en cuartiles), del Se (tras transformación logarítmica) y del W (categorizado en cuartiles).

## RESULTADOS

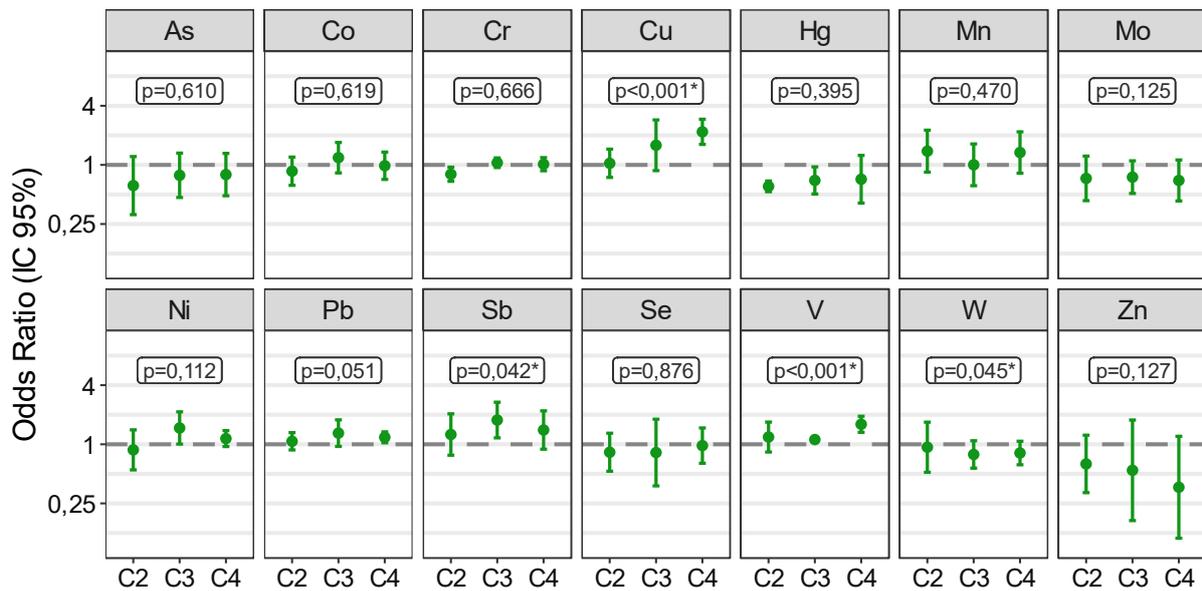
**Tabla 12.** Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), categorizados en cuartiles.

MPS	Cuartil	Rango, ng/ml	OR	IC 95%	Valor p	Valor p (tendencia)
As	C2	0,9-1,6	0,62	0,31-1,22	0,163	0,610
	C3	1,6-3,4	0,78	0,47-1,32	0,358	
	C4	3,4-45,3	0,80	0,48-1,31	0,370	
Co	C2	0,2-0,2	0,86	0,62-1,20	0,381	0,619
	C3	0,2-0,3	1,18	0,83-1,69	0,352	
	C4	0,3-25,4	0,98	0,71-1,35	0,904	
Cr	C2	1,2-1,8	0,80	0,68-0,95	<b>0,010</b>	0,666
	C3	1,8-2,3	1,05	0,94-1,18	0,376	
	C4	2,3-40,3	1,02	0,87-1,19	0,833	
Cu	C2	757,0-852,3	1,04	0,75-1,45	0,824	<b>&lt;0,001</b>
	C3	852,3-940,1	1,58	0,87-2,87	0,129	
	C4	940,1-1702,0	2,17	1,62-2,92	<b>&lt;0,001</b>	
Hg	C2	0,7-1,1	0,60	0,53-0,69	<b>&lt;0,001</b>	0,395
	C3	1,1-1,6	0,70	0,18-0,96	<b>0,025</b>	
	C4	1,6-6,9	0,71	0,41-1,25	0,238	
Mn	C2	0,8-1,0	1,38	0,84-2,26	0,200	0,470
	C3	1,0-1,4	1,00	0,61-1,63	0,995	
	C4	1,4-7,8	1,34	0,82-2,17	0,240	
Mo	C2	0,7-0,8	0,73	0,43-1,23	0,235	0,125
	C3	0,8-1,0	0,65	0,51-1,10	0,142	
	C4	1,0-6,4	0,69	0,43-1,12	0,137	
Ni	C2	0,3-0,7	0,88	0,55-1,40	0,585	0,112
	C3	0,7-1,7	1,47	1,00-2,14	<b>0,047</b>	
	C4	1,7-27,6	1,14	0,95-1,38	0,160	
Pb	C2	0,1-0,3	1,07	0,88-1,31	0,497	0,051
	C3	0,3-0,5	1,30	0,95-1,77	0,100	
	C4	0,5-7,6	1,18	1,04-1,34	<b>0,013</b>	
Sb	C2	0,3-0,4	1,03	0,94-1,12	0,548	<b>0,042</b>
	C3	0,4-0,7	1,07	0,93-1,24	0,313	
	C4	0,7-7,0	1,26	0,77-2,04	0,354	
Se	C2	68,4-74,8	0,83	0,53-1,30	0,414	0,876
	C3	74,8-80,9	0,82	0,38-1,80	0,627	
	C4	80,9-111,0	0,97	0,64-1,47	0,884	
V	C2	0,4-0,4	1,19	0,83-1,68	0,343	<b>&lt;0,001</b>
	C3	0,4-0,4	1,12	1,07-1,16	<b>&lt;0,001</b>	
	C4	0,4-1,0	1,60	1,32-1,93	<b>&lt;0,001</b>	
W	C2	0,0-0,0	0,93	0,52-1,68	0,818	<b>0,045</b>
	C3	0,0-0,0	0,79	0,57-1,09	0,147	
	C4	0,0-1,1	0,82	0,62-1,07	0,147	
Zn	C2	548,5-608,4	0,63	0,32-1,24	0,180	0,127
	C3	608,4-672,0	0,54	0,17-1,77	0,311	
	C4	672,0-929,1	0,37	0,11-1,21	0,098	

El cuartil 1 se estableció como categoría de referencia en todos los modelos. Se resaltan en negrita los valores  $p < 0,05$ . IC: intervalo de confianza. OR: odds ratio.

## RESULTADOS

**Figura 15.** Modelos de regresión logística multivariante de efectos mixtos para el análisis individual de metales pesados y semimetales (MPS), categorizados en cuartiles.



El cuartil 1 se estableció como referencia en todos los modelos. El valor p incluido en la figura representa el de la tendencia. Se resaltan con un asterisco los valores  $p < 0,05$ . IC: intervalo de confianza.

### 5.3.2. Mezclas de metales pesados y semimetales

Todos los análisis que se presentan en este apartado corresponden a los modelos de QgC, ajustados por edad al reclutamiento, estatus menopáusico, nuliparidad, historia de lactancia materna, tratamiento con THS, IMC (incluyendo su interacción con el estatus menopáusico), nivel de actividad física, consumo de alcohol, tabaquismo, nivel educativo y área de residencia.

#### *Efecto conjunto*

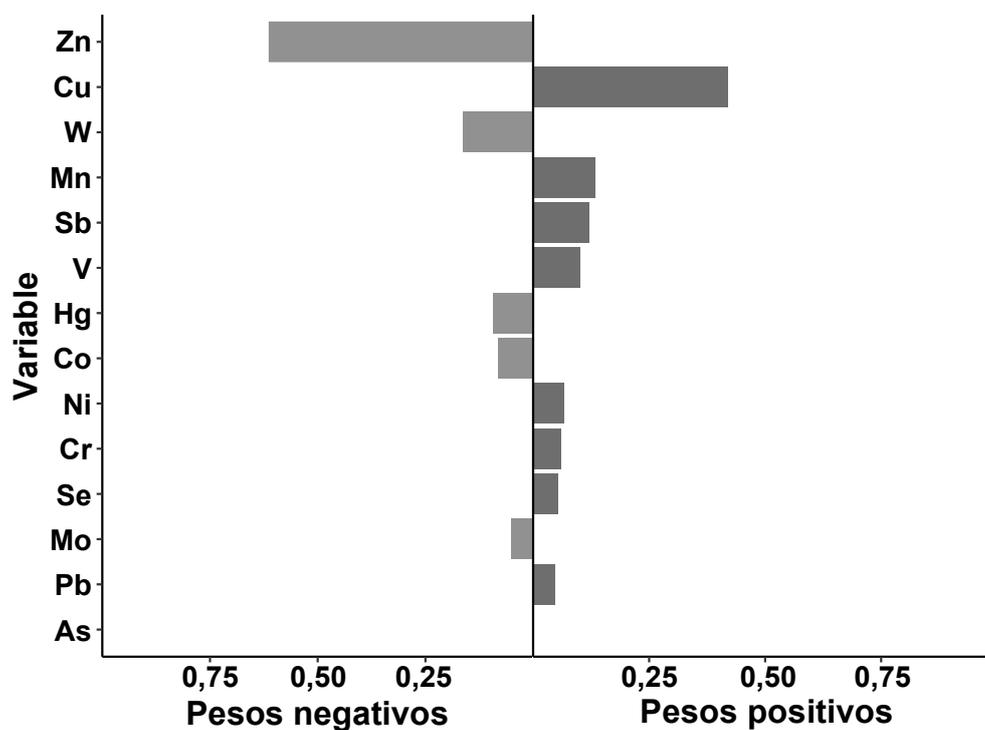
El modelo condicional evidenció que los componentes con mayor peso en la mezcla de MPS fueron los siguientes: 1) con signo positivo, el Cu (+0,42), el Mn (+0,13), el Sb (+0,12) y el V (+0,10); 2) con signo negativo, el Zn (-0,61) y el W (-0,16). El peso de cada elemento se muestra en la Figura 16.

El efecto conjunto de la mezcla de MPS se estimó en una OR=4,51, con un IC 95%=2,32–8,79 ( $p < 0,001$ ), según se representa en la Figura 17. Este resultado se obtuvo mediante un modelo marginal estructural, que permite obtener el efecto promedio en la

## RESULTADOS

población de estudio. En la representación gráfica del modelo, el segundo cuartil se estableció como la categoría de referencia.

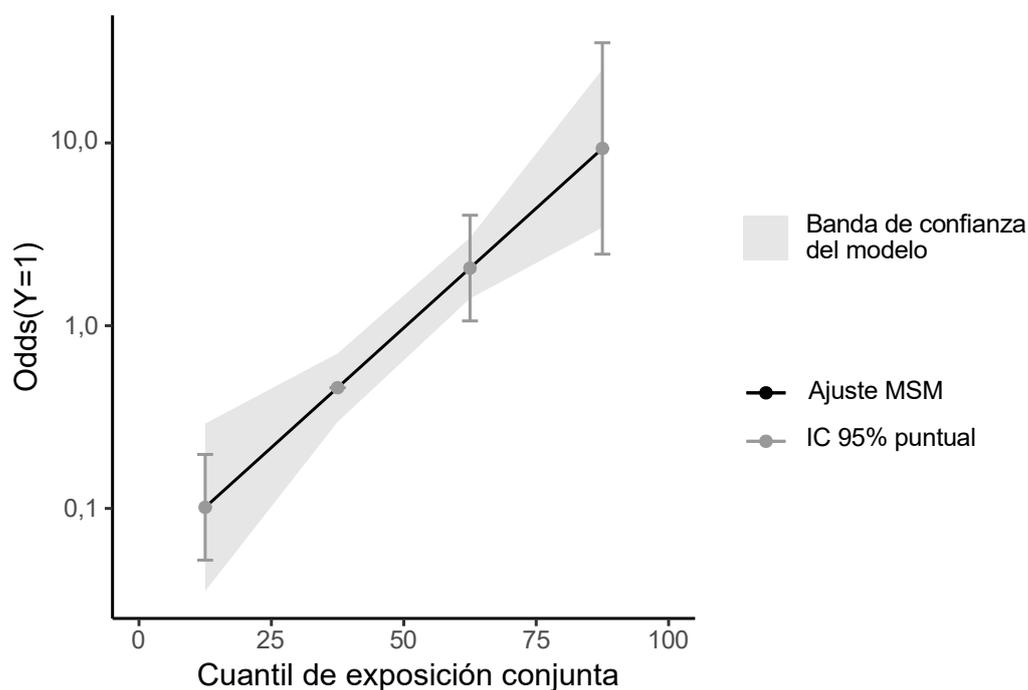
**Figura 16.** Pesos de los componentes de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenidos del modelo condicional de g-computación basada en cuantiles.



La magnitud de los pesos permite establecer comparaciones con el resto de pesos del mismo signo, pero no con los pesos de distinto signo. El motivo es que la magnitud del total de pesos positivos (suma de coeficientes positivos del modelo=0,97) es mayor que la magnitud del total de pesos negativos (suma de coeficientes negativos=-0,74).

## RESULTADOS

**Figura 17.** Efecto conjunto de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenidos del modelo marginal estructural de g-computación basada en cuantiles.



La odds ratio (eje Y) representa el efecto promedio poblacional de que, simultáneamente, la exposición a MPS con pesos positivos aumente en un cuartil, mientras que la exposición a MPS con pesos negativos disminuya en un cuartil. Como categoría de referencia, se estableció el cuartil 2. IC: intervalo de confianza. MSM: modelo marginal estructural.

### *No linealidad*

La Tabla 13 expone los resultados de los modelos no lineales, que son consistentes con los del modelo lineal, si bien el modelo aplicado para evaluar no linealidad de manera simultánea en todos los MPS estudiados perdió la significación estadística (IC 95%=0,41–56,80). Ninguna de las asociaciones no lineales observadas para el Sb, el Se y el W en el análisis individual de MPS se replicaron en el análisis de mezclas que incluía *splines* cúbicos restringidos (Tabla 13).

## RESULTADOS

**Tabla 13.** Efecto conjunto de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenido de modelos marginales estructurales de g-computación basada en cuantiles para evaluar efectos no lineales.

Modelo	Parámetro	OR	IC 95%	Valor p
SCR para todos los MPS	$\varphi 1$	4,85	0,41–56,80	0,209
	$\varphi 2$	0,99	0,47–2,06	0,972
SCR para el Sb	$\varphi 1$	6,06	2,23–16,50	<b>&lt;0,001</b>
	$\varphi 2$	0,92	0,74–1,15	0,474
SCR para el Se	$\varphi 1$	3,40	1,54–7,53	<b>0,002</b>
	$\varphi 2$	1,10	0,92–1,32	0,283
SCR para el W	$\varphi 1$	4,41	1,83–10,60	<b>&lt;0,001</b>
	$\varphi 2$	1,01	0,83–1,22	0,923

Se resaltan en negrita los valores  $p < 0,05$ .  $\varphi 1$ : efecto lineal.  $\varphi 2$ : efecto no lineal (*splines*). IC: intervalo de confianza. OR: odds ratio. SCR: *splines* cúbicos restringidos con 2 grados de libertad.

### *No aditividad*

En los modelos para evaluar efectos no aditivos no se pudo demostrar ninguna de las interacciones entre MPS previamente reportadas en la literatura, a saber, Zn-Pb, Zn-As, Sb-Cr y Sb-Pb. Tampoco se observó la existencia de interacción entre Cu y Zn. Al incluir dichas interacciones, la asociación se mantuvo positiva y estadísticamente significativa, aunque su magnitud varió ligeramente. Estos resultados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Efecto conjunto de la mezcla de metales pesados y semimetales (MPS), obtenido de modelos marginales estructurales de g-computación basada en cuantiles para evaluar efectos no aditivos.

Modelo	Parámetro	OR	IC 95%	Valor p
Interacción Zn-Pb	$\varphi 1$	3,38	1,47–7,75	<b>0,004</b>
	$\varphi 2$	1,09	0,93–1,29	0,299
Interacción Zn-As	$\varphi 1$	3,76	1,78–7,93	<b>&lt;0,001</b>
	$\varphi 2$	1,06	0,93–1,22	0,378
Interacción Sb-Cr	$\varphi 1$	4,32	2,05–9,10	<b>&lt;0,001</b>
	$\varphi 2$	1,02	0,87–1,19	0,830
Interacción Sb-Pb	$\varphi 1$	4,53	2,11–9,70	<b>&lt;0,001</b>
	$\varphi 2$	1,00	0,86–1,16	0,984
Interacción Cu-Zn	$\varphi 1$	5,58	2,54–12,28	<b>&lt;0,001</b>
	$\varphi 2$	0,93	0,80–1,09	0,384

Se resaltan en negrita los valores  $p < 0,05$ .  $\varphi 1$ : efecto lineal.  $\varphi 2$ : efecto no lineal (interacciones entre MPS). IC: intervalo de confianza. OR: odds ratio.

## RESULTADOS

### *Elementos esenciales y no esenciales*

Al dividir los MPS analizados en elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V y Zn) y no esenciales (As, Hg, Pb, Sb y W), el riesgo de desarrollar cáncer de mama se asoció significativamente a la mezcla de elementos esenciales (OR=3,19; IC 95%=1,98–5,13) pero no a la de elementos no esenciales (OR=1,34; IC 95%=0,93–1,92). La Tabla 15 recoge los resultados de la exposición a ambas mezclas.

**Tabla 15.** Efecto conjunto de las mezclas de metales pesados y semimetales (MPS) esenciales y no esenciales, obtenido de modelos marginales estructurales de g-computación basada en cuantiles.

Mezcla	Componentes	OR	IC 95%	Valor p
MPS esenciales	Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V, Zn	3,19	1,98–5,13	<b>&lt;0,001</b>
MPS no esenciales	As, Hg, Pb, Sb, W	1,34	0,93–1,92	0,117

Se resaltan en negrita los valores  $p < 0,05$ . IC: intervalo de confianza. OR: odds ratio.

### 6. Discusión

#### 6.1. Resultados principales

Este trabajo es uno de los primeros en explorar la asociación entre la exposición a MPS y el riesgo de desarrollar cáncer desde el enfoque de mezclas. Los pares de elementos que mostraron una correlación más fuerte fueron Mn-W, Hg-As, Hg-Se y Ni-Sb. En función del desenlace de estudio, se encontraron diferencias significativas para dos MPS: Cu, con mayores concentraciones en los casos de cáncer de mama, y Zn, con mayores concentraciones en los controles.

Los resultados del análisis multivariante discreparon en función del abordaje. El análisis individual de MPS indicó que el Cu, el Mn, el Ni, el Pb y el V podrían aumentar el riesgo de cáncer de mama, mientras que el Zn y el W actuarían como factores protectores. Por el contrario, el estudio de la mezcla de MPS reveló que un hipotético perfil de exposición con niveles elevados de Cu, Mn, Sb, V, Ni, Cr, Se, Pb y As, combinado con niveles bajos de Zn, W, Hg, Co y Mo incrementaría hasta 4,5 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Los dos elementos que individualmente tuvieron una mayor contribución al efecto conjunto de la mezcla fueron el Cu, con una relación directa, y el Zn, con una relación inversa.

En términos de la naturaleza de la asociación observada, el efecto conjunto de la mezcla de MPS seguiría una relación dosis-respuesta, ya que no se obtuvo evidencia de no linealidad. Tampoco se encontraron efectos no aditivos por interacciones entre MPS. Nuestros hallazgos no respaldan la hipótesis de que los principales responsables sean elementos no esenciales; de hecho, al dividir la mezcla original en dos mezclas según el carácter esencial o no de sus componentes, fue precisamente la mezcla de MPS esenciales la que se asoció significativamente al riesgo de desarrollar cáncer de mama. Esto se explica por el hecho de que el Cu y el Zn, ambos elementos esenciales, fueron los elementos para los que se observó una mayor influencia en el efecto global de la mezcla.

Dado que el cáncer se caracteriza por un largo periodo de latencia, los factores que influyen en su desarrollo ejercerían un efecto a largo plazo [195]. En este estudio, el

## DISCUSIÓN

tiempo que transcurrió entre la exposición y el desenlace tuvo una mediana de 10 años y 8 meses, con un RIC de 5 años y 7 meses a 13 años y 6 meses. Por lo tanto, el efecto observado podría reflejar de manera plausible el resultado de una exposición prolongada a MPS.

Para evaluar el efecto de la coexposición a MPS, se aplicó QgC, un método reciente adecuado para la investigación del efecto conjunto de mezclas de exposiciones (como los contaminantes ambientales o la dieta). El desarrollo matemático del método implica estimar el efecto de incrementar en un cuantil todos los componentes de la mezcla sobre la variable dependiente [181]. No obstante, esta aproximación puede incluir de manera implícita un supuesto: que todos los componentes actúan potencialmente como factores de riesgo, por lo que incrementar la exposición a cada uno de ellos podría asociarse a un mayor riesgo. Esta estrategia es válida para estudios de contaminación del aire, por ejemplo, en los que todos los contaminantes analizados se consideran perjudiciales para la salud. Sin embargo, las estrategias de análisis deberían adaptarse a cada estudio concreto, atendiendo a las características de los componentes de la mezcla.

En el caso de los MPS, se ha demostrado que muchos elementos desempeñan funciones fisiológicas importantes, de modo que –de existir asociación– en lugar de constituir factores de riesgo, podrían actuar como factores protectores para el desenlace de interés. Los estudios previos sobre MPS y cáncer de mama indican el efecto protector del Zn [165,196]. En el análisis individual de MPS, otros elementos, como el W o el Mo, se asociaron negativamente con el riesgo de cáncer de mama (aunque no en todos los modelos). La inclusión de MPS que aumentan el riesgo junto con MPS que lo reducen podría conducir a una compensación de riesgos, que dificultaría encontrar el efecto real de estos elementos. De hecho, pese a la clara asociación individual observada para el Cu y el Zn (en sentidos opuestos) un modelo de QgC analizando únicamente estos dos elementos arrojó un riesgo nulo (OR=0,99; IC 95%=0,80–1,23) para el aumento conjunto de la exposición a ambos en un cuartil.

Por esta razón, se introdujo una adaptación en el estudio para abordar la exposición a aquellos elementos que mostrasen un efecto protector en los modelos de MPS

## DISCUSIÓN

considerados individualmente, así como pesos negativos en el modelo condicional de QgC. La adaptación consistió en multiplicar los valores de dichos elementos por (-1), para que, en los modelos marginales estructurales, el incremento de la exposición en un cuartil se pudiera interpretar como una disminución en el grado de exposición. En consecuencia, la combinación resultante refleja una exposición en la que coexisten MPS potencialmente nocivos a concentraciones elevadas con MPS potencialmente protectores a concentraciones bajas. En definitiva, la medida de asociación obtenida (OR=4,5) representa el riesgo asociado con el perfil de exposición menos favorable, lo que explica, al menos en parte, su considerable magnitud.

## DISCUSIÓN

### 6.2. Comparación con otros estudios

Las participantes en este estudio presentaron concentraciones plasmáticas de MPS relativamente bajas. En estudios previos de diferentes países se han cuantificado niveles superiores de Cu, Zn y otros elementos esenciales [196–200], así como no esenciales, incluyendo el As [197,198], el Cd [201], el Hg [200], el Sb [197] y el Pb [198]. Solamente los valores de Co y Se fueron similares a los que se suelen reportar [197–199]. En conjunto, estos hallazgos podrían conllevar que el riesgo de desarrollar cáncer de mama sería mayor en poblaciones con una exposición más intensa y/o prolongada (asumiendo una relación dosis-respuesta). En cualquier caso, solo podemos hipotetizar sobre las potenciales implicaciones que tendrían tales escenarios de exposición.

Se puede argumentar que las concentraciones de MPS en este estudio deberían compararse no con las de otros estudios, sino con valores de referencia, pero esto no es una tarea fácil. Dichos valores corresponden frecuentemente a niveles determinados en el medioambiente (por ejemplo, el agua de consumo), en productos específicos (por ejemplo, cosméticos), o a límites diarios de exposición mediante una única vía, sobre todo la ingesta oral o la inhalación. Además, los niveles de mínimo riesgo que se han derivado para algunos elementos se han definido generalmente en orina, al ser la matriz biológica más estudiada. No obstante, hay algunas excepciones, como el As, cuya media geométrica en plasma superó el valor de referencia de <1 ng/ml en sangre, el Cu, cuyas concentraciones no alcanzaron el valor de referencia de 1.146 ng/ml en suero, y el Zn, cuyas concentraciones fueron también inferiores al valor de referencia de 1.000 ng/ml en suero. Los valores de referencia mencionados son los de Estados Unidos, según constan en los respectivos perfiles toxicológicos de la ATSDR [35,51,83]. Más allá de estas consideraciones, creemos que estudios epidemiológicos como el que se presenta en esta tesis doctoral pueden contribuir doblemente: estimando la carga corporal total de MPS a partir de matrices distintas de la orina, y ayudando a las instituciones a establecer niveles de mínimo riesgo para aquellos MPS de los que aún no se han podido dilucidar.

Entre 2019 y 2020, realizamos una revisión sistemática para sintetizar la evidencia científica sobre la relación entre la exposición a mezclas de contaminantes persistentes

## DISCUSIÓN

(cuantificadas en matrices biológicas) y el riesgo de desarrollar cáncer. Uno de los resultados obtenidos fue que los MPS constituían el grupo de contaminantes con menos información, hasta el punto de no encontrar ningún estudio que cumpliera los criterios de selección [202]<sup>1</sup>. Afortunadamente, se han publicado varios artículos desde entonces, aunque ninguno de ellos incluyó el plasma sanguíneo como matriz para la cuantificación de MPS.

Niehoff et al. realizaron un estudio con diseño caso-cohorte con un gran tamaño muestral (aproximadamente 3.000 sujetos) para evaluar la relación entre la exposición a una mezcla de 15 MPS medidos en uñas de los pies y el riesgo de desarrollar cáncer de mama en una cohorte –Sister Study– de mujeres de Estados Unidos y Puerto Rico [203]. Los autores no encontraron asociación entre la exposición conjunta a los MPS y el riesgo de cáncer de mama, al considerar el incremento en un tercil de la exposición a todos los elementos en modelos de QgC. Igualmente, al dividir la mezcla original en elementos esenciales y no esenciales, ninguna de las dos se asoció al desarrollo de cáncer de mama. En cambio, en el análisis individual de MPS, hallaron una asociación inversa inesperada para el Mo.

Existen muchas razones que podrían explicar la discrepancia con nuestros resultados, entre ellas: 1) la composición de la mezcla, que incluía Fe, pero no Cu, Hg, V ni W, 2) la matriz biológica empleada, 3) la estrategia de análisis (al definir el efecto como el incremento conjunto de la exposición a todos los MPS), 4) las características basales de las participantes en la cohorte Sister Study (que solo eran elegibles si tenían una hermana con antecedente personal de cáncer de mama), y 5) los potenciales factores de confusión considerados (aunque en este sentido podría no haber grandes diferencias, ya que en ambos estudios se ajustó por nivel educativo, IMC, tabaquismo, nuliparidad y lactancia materna).

Por otro lado, Mérida-Ortega et al. realizaron un estudio de casos y controles para evaluar el riesgo de cáncer de mama en relación con una mezcla de 10 MPS en orina

---

<sup>1</sup> Al doctorando que escribe estas líneas no le entusiasma promover la autocitación. Sin embargo, la única revisión sistemática sobre mezclas de contaminantes persistentes realizada desde 2020 analizó un desenlace distinto del cáncer (en concreto, resultados obstétricos y neonatales) [238].

## DISCUSIÓN

de mujeres del norte de México [194]. En el análisis bivariante, las concentraciones urinarias de Sn fueron significativamente mayores en los casos, mientras que las de V, Co y Mo lo fueron en los controles. Se empleó análisis de componentes principales para caracterizar los MPS más importantes de la mezcla, identificando que estos eran: Cr, Ni, Sb, aluminio (Al), Pb y estaño (Sn). Este componente principal se asoció positivamente con el riesgo de cáncer de mama, pese a que, de ellos, solo el Sn se asoció a un mayor riesgo en el análisis individual. En general, estos resultados no son consistentes con los nuestros, salvo la asociación obtenida para el Sb en los modelos de QgC. Probablemente, esto se deba a la marcada heterogeneidad entre ambas mezclas, pues dicho estudio no incluyó Cu ni Zn, elementos clave para explicar nuestros resultados. Otro aspecto a tener en cuenta es que las muestras de orina en los casos se tomaron tras la confirmación histológica del cáncer, por lo que no se pudo asegurar la secuencia temporal correcta (la exposición debe preceder al desenlace).

Una alternativa a la biomonitorización humana es el uso de mediciones ambientales como *proxy* de la exposición. Desde este abordaje, también en la cohorte Sister Study, se examinó si las concentraciones en aire de una mezcla de 10 MPS (agregadas a nivel de distrito censal) influían en el riesgo (individual) de desarrollar cáncer de mama [204]. Mediante regresión de suma de cuantiles ponderada encontraron que el incremento en un quintil de la exposición conjunta a todos los elementos se asoció a un riesgo 10% superior de desarrollar cáncer de mama, aunque únicamente en mujeres postmenopáusicas. Los componentes de la mezcla con mayor peso fueron el Pb, el Cd y el Hg, que también mostraron dicha asociación en el análisis individual, basado en la comparación del Q5 frente al Q1. Otro estudio similar realizado en Estados Unidos analizó la relación entre 11 MPS en aire y el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres [205]. Valores mayores de Sb, Cd y Co considerados individualmente se asociaron a un aumento del riesgo de cáncer. Pese a que el punto de partida no fue el enfoque de mezclas, los autores emplearon adicionalmente análisis de componentes principales. Si bien no lograron identificar los elementos clave de la mezcla, porque el primer componente principal comprendió a casi todos los MPS por igual (exceptuando As y Cd), dicho componente se asoció positivamente al cáncer de mama ER- y PR-.

## DISCUSIÓN

Más allá de medir MPS en una fuente ambiental, la falta de consistencia con nuestros resultados puede deberse a diferencias cualitativas (al no incluir Cu ni Zn) y cuantitativas (los elementos con mayores concentraciones en aire fueron el Pb y el Mn) en las mezclas analizadas, a los métodos estadísticos empleados y a la elección de la estrategia de análisis. Sin menoscabo de las fortalezas de ambos estudios, debe precisarse que la evaluación aislada de MPS en aire solo puede proporcionar evidencia limitada. El motivo es que, en la población general, la principal vía de exposición a la práctica totalidad de estos contaminantes es la ingesta oral.

Los efectos de la exposición a mezclas de MPS también se han estudiado en otros tipos de cáncer. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, los pioneros en estudiar mezclas de MPS cuantificados en muestras humanas en relación con el cáncer fueron Lim et al. en 2019, que analizaron la exposición conjunta a 10 elementos en suero y el riesgo de cáncer de próstata en Singapur [206]. Aplicando modelos de regresión bayesianos (BKMR), obtuvieron los siguientes resultados: el As y el Zn fueron los componentes fundamentales de la mezcla, la exposición a MPS se asoció con un mayor riesgo de cáncer de próstata, y se evidenciaron efectos no lineales y no aditivos. Cabe señalar que el primer hallazgo no fue inesperado, ya que hay indicios de que el Zn sérico podría ser un factor de riesgo del cáncer de próstata en determinadas poblaciones [207] (aun así, la evidencia es débil y la literatura muestra resultados contradictorios). La principal limitación de este estudio es el uso de muestras posteriores al diagnóstico, vulnerando el supuesto de secuencia temporal correcta desde la exposición hasta el desenlace.

Más adelante, otro estudio analizó la influencia de un amplio número de elementos traza medidos en suero, incluyendo MPS, sobre el riesgo de cáncer oral en China [208]. Para los análisis estadísticos, se emplearon modelos condicionales de QgC para identificar los componentes clave de la mezcla y modelos de regresión bayesianos (BKMR) para estimar su efecto conjunto. De los MPS, los componentes con mayor peso de la mezcla fueron el Zn y el Ni, ambos con pesos positivos (curiosamente, el peso del Cu fue negativo). En el análisis de mezclas, el efecto conjunto de MPS esenciales fue protector, destacando el antagonismo de Zn y V, asociados al aumento del riesgo, con

## DISCUSIÓN

respecto a Cu y Se, asociados a menos riesgo. Este estudio presentó como principal limitación la toma de muestras posteriores al diagnóstico en los casos.

Más recientemente, se ha publicado un estudio de casos y controles acerca de la relación entre una mezcla de 8 MPS determinados en suero y el riesgo de cáncer de pulmón en China [209]. Resulta interesante el empleo de hasta tres métodos para analizar la coexposición a MPS: QgC y regresión de suma de cuantiles ponderada para identificar los elementos más importantes de la mezcla, así como modelos de regresión bayesianos (BKMR) para estimar su efecto conjunto. El principal elemento de la mezcla, que no incluía Cu ni Zn, fue el Se, con peso negativo. No se observó que la exposición conjunta influyese en el riesgo de cáncer de pulmón, si bien se identificó que el Mn y Cd se asociaron a mayor riesgo, mientras que el Se y el Cr se asociaron a menor riesgo. Algunas debilidades de dicho estudio fueron la toma de muestras posteriores al diagnóstico, el posible sesgo de confusión (los modelos se ajustaron únicamente por edad, sexo y tabaquismo) y el bajo tamaño muestral (86 casos y 105 controles).

A pesar de que comparar los resultados obtenidos con los de trabajos que carecen de un enfoque de mezclas no es lo ideal, merece la pena detenerse en algunos de ellos, teniendo en cuenta la escasez de evidencia disponible para responder a nuestra pregunta de investigación. Para empezar, el efecto individual de MPS sobre el desarrollo de cáncer de mama se ha estudiado previamente en la cohorte EPIC. En concreto, se empleó un diseño de casos y controles anidado en la cohorte EPIC-Florenia evaluando la exposición a seis elementos (Cd, Co, Cr, Mn, Pb y talio (Tl)) medidos en suero de mujeres que nunca habían fumado [210]. Al comparar el T3 frente al T1, los niveles de Co se asociaron inversamente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, mientras que no se observó asociación alguna para los elementos restantes. Más allá de que este hallazgo no se replicó en nuestro estudio, un resultado relevante es, lamentablemente, la ausencia de Cu y Zn entre los elementos analizados.

No obstante, sí que se ha investigado el papel del Cu y el Zn, incluyendo la razón Cu/Zn, un marcador de estrés oxidativo que se ha relacionado con el desarrollo de cáncer [211]. Ambos elementos son necesarios para el mantenimiento de funciones

## DISCUSIÓN

fisiológicas, el primero como componente de diversas enzimas, y el segundo por su importancia para la señalización, proliferación y supervivencia celular, entre otros procesos [212]. Nuestro hallazgo en lo que respecta a la asociación significativa obtenida para los elementos esenciales, en especial Cu y Zn –tanto en el análisis individual como en el de la mezcla de MPS– concuerda con los de otros estudios, como el de Pala et al. [196]. Se trata de un estudio de casos y controles basado en la cohorte ORDET, para examinar la influencia de niveles prediagnósticos de Cu y Zn en plasma y orina sobre el riesgo de cáncer de mama en mujeres en Italia. Los autores encontraron que la razón Cu/Zn en cualquiera de las dos matrices biológicas estudiadas se asoció significativamente con un riesgo un 75% superior de desarrollar cáncer de mama. No se observaron diferencias según subtipos, al menos atendiendo a HER2, ER y PR.

Además, un metaanálisis integró 36 estudios sobre la relación entre niveles séricos de Cu y Zn y el cáncer de mama. Tras combinar sus resultados, se observó que las mujeres con cáncer de mama presentaban en suero concentraciones mayores de Cu, concentraciones menores de Zn y una mayor razón Cu/Zn en comparación con mujeres sin cáncer [165]. Por tanto, los estudios con análisis individual de MPS apuntan al Cu como factor de riesgo y al Zn como factor protector. De todos modos, para poder extraer conclusiones válidas es imprescindible un mayor cuerpo de evidencia que aborde adecuadamente la exposición conjunta a estos elementos.

En este sentido, la escasez de literatura es desconcertante, en vista de que la evaluación del riesgo atribuible a MPS se basa en valores de referencia u orientativos que no se ajustan demasiado bien a la realidad. Esto ha llevado a algunos autores a recomendar que la máxima concentración permisible de ciertos MPS (como el Cd) en alimentos debería ser la menor posible [213].

## DISCUSIÓN

### 6.3. Mecanismos de acción

La plausibilidad biológica de la asociación entre la exposición a mezclas de MPS y el riesgo de cáncer se basa en una serie de mecanismos moleculares. Este apartado está especialmente dedicado a los mecanismos carcinogénicos mediante los que el exceso de MPS podría llevar al desarrollo de cáncer, aunque se comentará brevemente la fracción de la asociación debida a la deficiencia de elementos esenciales.

La lista de mecanismos mediante los que la exposición a contaminantes ambientales puede producir cáncer es extensa, por lo que se suelen agrupar en bloques similares [214]. Un ejemplo es la genotoxicidad, que engloba un conjunto de mecanismos por los que se daña el material genético, pudiendo dar lugar a mutaciones, inflamación e inhibición de la respuesta inmunitaria. Otro es la disrupción endocrina, un fenómeno de interferencia con el sistema endocrino, tanto en la edad adulta como especialmente en períodos críticos del desarrollo, que acontecen en etapas tempranas de la vida [215]. En el caso de los MPS, se van a presentar cinco grupos de mecanismos carcinogénicos compartidos, puntualizando aquellos que sean propios de algún elemento específico por su importancia para la salud.

*Generación de estrés oxidativo.* El principal mecanismo de acción es la producción de estrés oxidativo, caracterizado por un desequilibrio entre la producción y acumulación de ROS y la capacidad biológica de detoxificación de las mismas [216]. El estrés oxidativo puede resultar tóxico para los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos [152]. La carcinogénesis mediada por estrés oxidativo es un proceso dinámico: inicialmente, el aumento de niveles de ROS origina alteraciones genéticas y epigenéticas, junto con reprogramación metabólica, mientras que en fases avanzadas, niveles reducidos de ROS promueven la resistencia a la apoptosis, lo que conduce a inflamación y angiogénesis [217,218].

El estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos tóxicos del As inorgánico, al inducir roturas de doble cadena en el ADN. La respuesta de las células es aumentar la expresión de enzimas antioxidantes, lo que se ha relacionado con la desensibilización a la muerte por apoptosis [219]. El Cu es capaz de producir ROS en células normales y

## DISCUSIÓN

de promover la resistencia al estrés oxidativo en células tumorales [220]. El Cd no induce la producción de ROS, pero ocasiona estrés oxidativo indirectamente, mediante la pérdida de glutatión y la inhibición en enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa o la catalasa [219,221]. Este mecanismo también se ha observado tras la exposición a formas orgánicas e inorgánicas de Hg [152]. Los mecanismos de detoxificación del Cr hexavalente generan radicales libres, como el radical hidroxilo, en un proceso que conduce a la acumulación de ROS [219,221]. El Pb genera estrés oxidativo mediante la producción de ROS y la depleción de enzimas antioxidantes [152].

*Inhibición de la reparación del ADN.* Algunos MPS impiden la adecuada reparación del daño producido en el ADN, lo que favorece la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones cruciales. El As y el Cd inhiben varios mecanismos de reparación del ADN, como la reparación de discordancias o *mismatch* (debidas a mutaciones como inserciones o deleciones), la escisión de bases y de nucleótidos [219,221,222]. El Cr inhibe la reparación del ADN alterando la función de las polimerasas [152]. El Ni y el Pb también parecen interferir en la reparación del daño en el ADN [152,223,224]. Aunque este mecanismo de acción también podría ser empleado por otros elementos, como el Hg, con base en su afinidad por los grupos sulfhidrilo [152], la evidencia es muy limitada.

La genotoxicidad de la práctica totalidad de MPS está mediada por estrés oxidativo y/o inhibición de los mecanismos de reparación del ADN. Sin embargo, algunos elementos también presentan actividad mutagénica, como es el caso del Cr [221].

*Mecanismos epigenéticos.* En los últimos años ha avanzado mucho el conocimiento sobre la influencia de los MPS a nivel epigenético, es decir, no sobre la secuencia genética, sino sobre su expresión. Los principales mecanismos epigenéticos son: 1) la metilación del ADN (unión de grupos metilo en el carbono 5 del anillo de la citosina), sobre todo en regiones de genes promotores, 2) las modificaciones postraduccionales de histonas, básicamente mediante metilación y acetilación, y 3) la regulación del ARN no codificante, del que se han estudiado especialmente los micro-ARN. Mientras que el aumento de metilación suele disminuir la expresión génica, los efectos de la

## DISCUSIÓN

acetilación y de la regulación del ARN no codificante son muy variables según los genes afectados.

Algunos MPS actúan a través de los tres tipos de mecanismos epigenéticos. El As se ha vinculado a la hipermetilación de genes supresores de tumores (por ejemplo, *TP53*), modificaciones de histonas y cambios en la regulación de micro-ARN que podrían aumentar la resistencia a la apoptosis [219,222,223]. La carcinogenicidad del Ni depende fundamentalmente de sus efectos epigenéticos, mediante hipermetilación del ADN en genes supresores de tumores, lo que puede favorecer la transición epitelial-mesenquimatosa, modificaciones en la acetilación de histonas –con hipoacetilación global e hiperacetilación en regiones concretas–, y alteraciones en la regulación de micro-ARN (como miR-222 y miR-4417) [219,223,225].

En otros MPS solo se ha esclarecido la influencia de algunos de estos mecanismos. Uno de las formas por las que el Cu produce toxicidad celular es mediante la disminución de la expresión del gen *SOD3*, fruto de la hipermetilación del ADN [220]. También se ha descrito que provoca modificaciones en la acetilación de histonas. La exposición crónica a Cd puede producir hipermetilación del ADN, sobre todo en genes supresores de tumores (como *TP16*) y la expresión aberrante de micro-ARN (como miR-124-3p) [223,225], cambios implicados en la transición epitelial-mesenquimatosa y en la resistencia a la apoptosis [222]. Estos mecanismos podrían guardar relación con la toxicidad del Cd a nivel mitocondrial [225]. El Cr hexavalente se ha relacionado con cambios en la metilación del ADN y modificaciones en la metilación y acetilación de histonas, mientras que se desconocen sus efectos sobre la expresión del ARN no codificante [221,225].

*Disrupción endocrina.* La disrupción endocrina consiste en el agonismo o antagonismo de hormonas, sus receptores, o la transducción de señal derivada de la unión hormona-receptor. Los MPS que actúan a través de este mecanismo por norma general son capaces de activar el receptor de estrógenos alfa ( $ER-\alpha$ ) en ausencia de estradiol, por lo que se conocen como metaloestrógenos.

El Cu presenta una alta afinidad por  $ER-\alpha$  e induce la proliferación celular en la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7 [226]. El As altera la transducción de la

## DISCUSIÓN

señal tras la unión de estrógenos a sus receptores y reduce la expresión de ER- $\alpha$ , mientras que el Cd agoniza la acción de los estrógenos replicando la función del estradiol, además de reducir la expresión de receptores de progesterona [222]. Otros metaloestrógenos incluyen el Ni, el Cr, el Pb, el Hg y el Co [227].

*Alteraciones inmunitarias.* Se han descrito efectos inmunotóxicos de la exposición a MPS, que abarcan desde la estimulación de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, promoviendo la inflamación) hasta la inhibición de la misma (por ejemplo, reduciendo la capacidad de defensa frente a células tumorales).

La exposición a Pb en el ámbito laboral se asocia a efectos inmunomoduladores como la disminución de inmunoglobulinas, pudiendo comprometer la respuesta humoral [65]. El Hg se ha relacionado con la reducción de los niveles de linfocitos T colaboradores CD4+ [228]. El Ni induce respuestas inmunitarias con activación de células presentadoras de antígenos y linfocitos T [228]. La exposición aguda a W conduce a la apoptosis de linfocitos B inmaduros, aunque se precisan estudios sobre sus efectos a largo plazo [229]. El As también ocasiona apoptosis selectiva, en su caso de linfocitos T, además de frenar la proliferación de macrófagos [230].

La Tabla 16 esquematiza los mecanismos carcinogénicos de los MPS más estudiados. Por supuesto, existen otros. Algunos MPS favorecen la progresión tumoral: por ejemplo, el Cu estimula la migración celular y puede facilitar la metástasis de células tumorales [220,226]. Determinados elementos no esenciales, como el Cd y el Pb, son capaces de sustituir a elementos esenciales, por su similitud estructural. El Ni posee un mecanismo específico por el que induce un estado similar a la hipoxia, promoviendo la selección de células resistentes a la apoptosis [221].

Por último, el desarrollo de cáncer también puede deberse a la insuficiente acción protectora de MPS esenciales, de los que destacan el Zn y el Se. El Zn tiene efectos antioxidantes directos, al reducir la concentración de agentes oxidantes, e indirectos, al proteger a proteínas y otras macromoléculas del daño oxidativo. También interviene en la inmunidad, en la reparación del daño producido en el ADN y en varios puntos de control del ciclo celular. Por ello, la deficiencia de Zn se ha asociado a producción de estrés oxidativo e inflamación crónica, inmunodepresión, genotoxicidad y

## DISCUSIÓN

proliferación celular descontrolada [172,231]. El Se participa en la inmunidad, así como en la regulación del estrés oxidativo, por lo que niveles reducidos de Se pueden favorecer la aparición de cáncer mediante alteraciones inmunitarias y aumento de ROS [76,232].

**Tabla 16.** Principales mecanismos de acción de metales pesados y semimetales (MPS) seleccionados.

MPS	Estrés oxidativo	Inhibición de la reparación del ADN	Alteraciones epigenéticas	Disrupción endocrina	Inmunotoxicidad
As	✓	✓	✓	✓	
Be					✓
Cd	✓	✓	✓	✓	
Cr	✓	✓	✓	✓	
Cu	✓		✓	✓	
Hg	✓				✓
Ni			✓		
Pb	✓	✓	✓		✓

Fuente: Elaboración propia. Se indican aquellos mecanismos que cuentan con mayor evidencia.

Por muy informativos que puedan ser estos mecanismos, se han identificado para los efectos de MPS considerados de manera individual. Desde la toxicología, se ha señalado que suelen aceptarse las premisas de adición de concentraciones y acción independiente, es decir, que las interacciones entre tóxicos son mínimas. En las mezclas de MPS, la existencia de interacciones entre elementos –tanto sinérgicas como antagonistas– ha cuestionado estos supuestos [233]. Por tanto, sería deseable complementar el estudio de los mecanismos carcinogénicos mediante otros abordajes, como la toxicogenómica, que estudia la respuesta del genoma a la exposición a mezclas químicas [234].

## DISCUSIÓN

### 6.4. Fortalezas y limitaciones

La principal fortaleza de este trabajo es su diseño, por la eficiencia que aportan los estudios de casos y controles, junto con casi todas las ventajas de la cohorte prospectiva multicéntrica de largo recorrido en la que se basa (estudio EPIC), incluyendo la calidad de los datos y la protección frente al sesgo de clasificación diferencial. Además, este diseño ha permitido disponer del grado de exposición previo al desenlace, evitando el sesgo de causalidad inversa. En otros estudios de casos y controles, las concentraciones de MPS pueden estar influidas por procesos fisiológicos atribuibles a la propia enfermedad, a los tratamientos recibidos o a modificaciones en los hábitos de vida tras el diagnóstico. Otro gran punto fuerte es el estudio del efecto de las mezclas de MPS, por investigar un tema emergente con escasa evidencia disponible, sobre todo en nuestro medio, y por permitir la aproximación al concepto de exposoma. Para este fin, los modelos de QgC han supuesto una herramienta fundamental, que ha dotado de robustez metodológica al apartado de análisis estadístico.

No obstante, esta tesis doctoral presenta varias limitaciones. En primer lugar, aunque el estudio se basa en una cohorte multicéntrica, el modesto tamaño muestral ( $N=578$ ) puede haber limitado la potencia estadística y afectado a la precisión de la estimación de los pesos en el modelo condicional de QgC. No obstante, permitió obtener evidencia sobre la existencia de la asociación con el riesgo de desarrollar cáncer.

En segundo lugar, la exposición a MPS se midió en una única determinación en el reclutamiento de la cohorte. El riesgo derivado es que la exposición puede no haber sido constante, sobre todo, por modificaciones en el patrón dietético a lo largo del seguimiento. Sin embargo, las concentraciones de MPS son relativamente estables a lo largo del tiempo, al ser elementos persistentes y que tienden a la bioacumulación [235].

En tercer lugar, todos los MPS estudiados se cuantificaron en plasma sanguíneo, que no es la matriz biológica óptima para ciertos elementos. Por citar algunos ejemplos, la mejor matriz para evaluar la exposición al Pb suele ser la sangre total (incluyendo elementos formes), con base en su transporte eritrocitario [236], mientras que para

## DISCUSIÓN

determinar la exposición al Cd se prefiere el empleo de orina [36]. Esto podría explicar por qué las concentraciones de Pb fueron inferiores a las habitualmente reportadas en otros estudios y por qué las de Cd se detectaron en una proporción tan baja de las muestras analizadas, condicionando su exclusión de los análisis estadísticos.

En cuarto lugar, a pesar de haber aplicado un método válido para estimar el efecto conjunto de mezclas de MPS, la exposición ambiental es bastante más compleja, pues los elementos metálicos pueden interactuar con otros contaminantes (persistentes y no persistentes), como los microplásticos, que no fueron incluidos en esta tesis doctoral [237]. Sin embargo, el hecho de considerar en este estudio la exposición conjunta de hasta 16 MPS ha permitido una aproximación más realista de la exposición, al menos en lo que a esta familia de elementos químicos se refiere.

En quinto lugar, dado que el estatus menopáusico se recogió en exclusiva durante el reclutamiento, los modelos se ajustaron por factores hormonales relacionados con la exposición, pero no necesariamente con el desenlace (de modo que pudo haber mujeres clasificadas como premenopáusicas que sin embargo desarrollasen cáncer de mama durante la menopausia). No obstante, es plausible que esto afectase por igual a casos y controles, por lo que el sesgo de clasificación resultante sería no diferencial. Además, en los modelos de regresión multivariante se ajustó por variables asociadas al estatus menopáusico en el momento del diagnóstico, como la edad y el propio estatus menopáusico en el reclutamiento.

### 6.5. Estrategias futuras de investigación

Para superar las limitaciones discutidas en el apartado anterior, los estudios que se realicen en este campo podrían emplear las siguientes estrategias. Por un lado, utilizar un mayor tamaño muestral, especialmente para estudiar cánceres poco frecuentes. Esto no es particularmente sencillo en cohortes prospectivas y requeriría de esfuerzos colaborativos en el marco de grandes estudios multicéntricos. Seguidamente, aportaría una información muy valiosa mejorar la medición de la exposición, comenzando por determinar las concentraciones de MPS mediante múltiples matrices biológicas, como la orina, la sangre, el cabello, las uñas y el tejido adiposo. Otro aspecto relevante sería el empleo de medidas repetidas, que haría posible controlar la potencial variabilidad temporal de la exposición (sobre todo motivada por la dieta, pero también por el hábito tabáquico y la contaminación del aire en ambientes urbanos e industrializados). También enriquecería el análisis de mezclas la inclusión de otras familias de contaminantes ambientales, sobre todo aquellas que interaccionen con MPS y/o que compartan mecanismos de exposición, de cara a abarcar un rango más amplio del componente químico del exposoma [186]. Por último, pensamos que los estudios en este campo deberían abordar de manera interdisciplinar la complejidad de los determinantes ambientales de la salud, incluyendo la visión de profesionales de ámbitos como las ciencias ambientales, la toxicología y la bioestadística. Esta decisión facilitaría poner en valor los escasos datos disponibles sobre la relación entre exposición a MPS y riesgo de desarrollar cáncer mediante una adecuada interpretación de los mismos.

## DISCUSIÓN

### 7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y en respuesta a los objetivos propuestos en esta tesis doctoral, se extraen las siguientes conclusiones:

1. Las concentraciones plasmáticas de MPS mostraron una gran variabilidad, siendo mayores para el Cu (MG=845,6 ng/ml) y el Zn (MG=604,8 ng/ml) y menores para el W (MG=0,02 ng/ml) y el Pb (MG=0,23 ng/ml). Los porcentajes de detección del Be y el Cd no alcanzaron el 10%, por lo que fueron excluidos de los análisis.
2. En el análisis de MPS considerados individualmente, el Cu, el Pb y el V se asociaron a un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, siendo mayor la fuerza de la asociación para el V (OR=4,9) en el modelo lineal. Por su parte, la exposición a la mezcla de MPS, en concreto, un perfil desfavorable caracterizado principalmente por concentraciones elevadas de Cu y bajas de Zn, se asoció significativamente a un riesgo más de 4 veces mayor (OR=4,5) de desarrollar cáncer de mama en mujeres de la cohorte EPIC-España.
3. Atendiendo a su peso, los elementos con mayor contribución al efecto de la mezcla fueron: el Cu (+0,42), el Mn (+0,13), el Sb (+0,12) y el V (+0,10), asociados a un mayor riesgo, y el Zn (-0,61) y el W (-0,16), asociados a un menor riesgo.
4. Pese a la identificación de relaciones potencialmente no lineales para tres elementos (Sb, Se, W) en el análisis individual, el análisis de mezclas no evidenció la presencia de no linealidad. Tampoco se pudo demostrar la existencia de efectos no aditivos en la exposición conjunta a MPS.
5. El riesgo de desarrollar cáncer de mama se asoció significativamente a la exposición conjunta a elementos esenciales, mientras que la asociación no fue significativa para los elementos no esenciales.

## CONCLUSIONES

## Bibliografía

- [1] World Health Organization. Determinants of health 2017. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/determinants-of-health> (accessed November 17, 2023).
- [2] Vineis P, Fecht D. Environment, cancer and inequalities—The urgent need for prevention. *Eur J Cancer* 2018;103:317–26. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2018.04.018>.
- [3] Dahlgren G, Whitehead M. Policies and strategies to promote social equity in health. Stockholm, Sweden: 1991.
- [4] Prüss-Ustün A, Wolf J, Corvalán C, Bos R, Neira M. Preventing disease through healthy environments. A global assessment of the burden of disease from environmental risks. Geneva, Switzerland: 2016.
- [5] Magliano DJ, Loh VHY, Harding JL, Botton J, Shaw JE. Persistent organic pollutants and diabetes: A review of the epidemiological evidence. *Diabetes Metab* 2014;40:1–14. <https://doi.org/10.1016/J.DIABET.2013.09.006>.
- [6] Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Heal* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2020.00014>.
- [7] UN Environment Assembly. Towards a Pollution-Free Planet. Report of the Executive Director United Nations Environment Programme. 2017.
- [8] Cousins IT, Ng CA, Wang Z, Scheringer M. Why is high persistence alone a major cause of concern? *Environ Sci Process Impacts* 2019;21:781–92. <https://doi.org/10.1039/C8EM00515J>.
- [9] Matthies M, Solomon K, Vighi M, Gilman A, Tarazona J V. The origin and evolution of assessment criteria for persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals and persistent organic pollutants (POPs). *Environ Sci Process Impacts* 2016;18:1114–28. <https://doi.org/10.1039/C6EM00311G>.
- [10] Kaiser J, Enserink M. Treaty takes a pop at the dirty dozen. *Science* (80- ) 2000;290:2053. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.290.5499.2053/ASSET/1EBF1E8B-43E5-4964-8091-719496ED9451/ASSETS/GRAPHIC/2053-1.GIF>.
- [11] Guo W, Pan B, Sakkiah S, Yavas G, Ge W, Zou W, et al. Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16. <https://doi.org/10.3390/IJERPH16224361>.
- [12] Ruzzin J. Public health concern behind the exposure to persistent organic pollutants and the risk of metabolic diseases. *BMC Public Health* 2012;12:298. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-298>.
- [13] Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, et al. Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA J* 2018;16:e05333. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2018.5333>.
- [14] Sexton K, Needham L, Pirkle J. Human Biomonitoring of Environmental Chemicals. *Am Sci* 2004;92:38. <https://doi.org/10.1511/2004.45.921>.

- [15] Louro H, Heinälä M, Bessems J, Buekers J, Vermeire T, Woutersen M, et al. Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. *Int J Hyg Environ Health* 2019;222:727–37. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2019.05.009>.
- [16] Polachova A, Gramblicka T, Bechynska K, Parizek O, Parizkova D, Dvorakova D, et al. Biomonitoring of 89 POPs in blood serum samples of Czech city policemen. *Environ Pollut* 2021;291. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118140>.
- [17] Lermen D, Bartel-Steinbach M, Gwinner F, Conrad A, Weber T, von Briesen H, et al. Trends in characteristics of 24-h urine samples and their relevance for human biomonitoring studies - 20 years of experience in the German Environmental Specimen Bank. *Int J Hyg Environ Health* 2019;222:831–9. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2019.04.009>.
- [18] Peng FJ, Emond C, Hardy EM, Sauvageot N, Alkerwi A, Lair ML, et al. Population-based biomonitoring of exposure to persistent and non-persistent organic pollutants in the Grand Duchy of Luxembourg: Results from hair analysis. *Environ Int* 2021;153. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2021.106526>.
- [19] Ma S, Zeng Z, Lin M, Tang J, Yang Y, Yu Y, et al. PAHs and their hydroxylated metabolites in the human fingernails from e-waste dismantlers: Implications for human non-invasive biomonitoring and exposure. *Environ Pollut* 2021;283. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117059>.
- [20] Sousa S, Maia ML, Delerue-Matos C, Calhau C, Domingues VF. The role of adipose tissue analysis on Environmental Pollutants Biomonitoring in women: The European scenario. *Sci Total Environ* 2022;806. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150922>.
- [21] Contini T, Béranger R, Multigner L, Klánová J, Price EJ, David A. A Critical Review on the Opportunity to Use Placenta and Innovative Biomonitoring Methods to Characterize the Prenatal Chemical Exposome. *Environ Sci Technol* 2023;57:15301–13. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.3C04845>.
- [22] Hernández CS, Pardo O, Corpas-Burgos F, Fernández SF, López A, Coscollà C, et al. Biomonitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in human milk: Exposure and risk assessment for lactating mothers and breastfed children from Spain. *Sci Total Environ* 2020;744. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140710>.
- [23] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Health Statistics (NCHS). National Health and Nutrition Examination Survey 2023. [https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about\\_nhanes.htm](https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about_nhanes.htm) (accessed November 21, 2023).
- [24] Oh K, Kim Y, Kweon S, Kim S, Yun S, Park S, et al. Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 20th anniversary: accomplishments and future directions. *Epidemiol Health* 2021;43. <https://doi.org/10.4178/EPIH.E2021025>.
- [25] Schulz C, Kolossa-Gehring M, Gies A. German Environmental Survey for Children and Adolescents 2014-2017 (GerES V) - the environmental module of KiGGS Wave 2. *J Heal Monit* 2017;2:45–51. <https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-108>.
- [26] Vorkamp K, Esteban López M, Gilles L, Göen T, Govarts E, Hajeb P, et al. Coordination of chemical analyses under the European Human Biomonitoring

- Initiative (HBM4EU): Concepts, procedures and lessons learnt. *Int J Hyg Environ Health* 2023;251:114183. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2023.114183>.
- [27] Castaño A, López ME, Díaz SP, Ibarluzea J, Estecha MG, Portilla AIC, et al. El nodo español de biomonitorización humana: una herramienta transversal en el Plan Estratégico de Salud y Medioambiente (PESMA). *Rev Salud Ambient* 2022;22:79–79.
- [28] Arrebola JP, Ramos JJ, Bartolomé M, Esteban M, Huetos O, Cañas AI, et al. Associations of multiple exposures to persistent toxic substances with the risk of hyperuricemia and subclinical uric acid levels in BIOAMBIENT.ES study. *Environ Int* 2019;123:512–21. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.12.030>.
- [29] Jannetto PJ, Cowl CT. Elementary Overview of Heavy Metals. *Clin Chem* 2023;69:336–49. <https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/HVAD022>.
- [30] Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *Exp Suppl* 2012;101:133–64. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6).
- [31] Ulniković VP, Kurilić SM. Heavy metal and metalloid contamination and health risk assessment in spring water on the territory of Belgrade City, Serbia. *Environ Geochem Health* 2020;42:3731–51. <https://doi.org/10.1007/S10653-020-00617-Z>.
- [32] Goutam Mukherjee A, Ramesh Wanjari U, Renu K, Vellingiri B, Valsala Gopalakrishnan A. Heavy metal and metalloid - induced reproductive toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2022;92. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2022.103859>.
- [33] Zhou H, Yue X, Chen Y, Liu Y. Source-specific probabilistic contamination risk and health risk assessment of soil heavy metals in a typical ancient mining area. *Sci Total Environ* 2024;906. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.167772>.
- [34] Sall ML, Diaw AKD, Gningue-Sall D, Efremova Aaron S, Aaron JJ. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environ Sci Pollut Res* 2020;27:29927–42. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-09354-3/METRICS>.
- [35] Chou S, Harper C, Ingerman L, Lladós F, Colman J, Chappell L, et al. Toxicological Profile for Arsenic. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2007.
- [36] Martínez-Morata I, Sobel M, Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Howe CG, Sanchez TR. A State-of-the-Science Review on Metal Biomarkers. *Curr Environ Heal Reports* 2023;10:215–49. <https://doi.org/10.1007/S40572-023-00402-X>.
- [37] Xue J, Zartarian V, Wang SW, Liu S V., Georgopoulos P. Probabilistic modeling of dietary arsenic exposure and dose and evaluation with 2003-2004 NHANES data. *Environ Health Perspect* 2010;118:345–50. [https://doi.org/10.1289/EHP.0901205/SUPPL\\_FILE/0901205ART\\_SUPPL.PDF](https://doi.org/10.1289/EHP.0901205/SUPPL_FILE/0901205ART_SUPPL.PDF).
- [38] Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem* 2018;119:157–84. <https://doi.org/10.1002/JCB.26234>.
- [39] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. ATSDR’s Substance Priority List 2022. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html> (accessed November 24, 2023).

- [40] Tchounwou PB, Yedjou CG, Udensi UK, Pacurari M, Stevens JJ, Patlolla AK, et al. State of the science review of the health effects of inorganic arsenic: Perspectives for future research. *Environ Toxicol* 2019;34:188–202. <https://doi.org/10.1002/TOX.22673>.
- [41] International Agency for Research on Cancer (IARC). *Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts*. vol. 100. 2012.
- [42] Pla Martínez A, Hernández Jerez A, Gil Hernández F. *Manual de Toxicología*. 2nd ed. Granada, Spain: Editorial técnica Avicam; 2019.
- [43] Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 2014;7:60–72. <https://doi.org/10.2478/INTOX-2014-0009>.
- [44] World Health Organization. *Exposure to cadmium: a major public health concern*. Geneva, Switzerland: 2019.
- [45] Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;23:8244–59. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6333-X>.
- [46] Faroon O, Ashizawa A, Wright S, Tucker P, Jenkins K. *Toxicological Profile for Cadmium*. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2012.
- [47] Mezynska M, Brzóska MM. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environ Sci Pollut Res* 2017 254 2017;25:3211–32. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-0827-Z>.
- [48] Rodríguez-Barranco M, Lacasaña M, Gil F, Lorca A, Alguacil J, Rohlman DS, et al. Cadmium exposure and neuropsychological development in school children in southwestern Spain. *Environ Res* 2014;134:66–73. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.06.026>.
- [49] International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cadmium and Cadmium compounds*. vol. 100. 2012.
- [50] National Research Council. *Copper in Drinking Water*. Washington, DC, United States: The National Academies Press; 2000. <https://doi.org/10.17226/9782>.
- [51] Alman B, Fay M, Antezana A, Derrick H, Chiger A, Hall S, et al. *Toxicological Profile for Copper*. Atlanta, United States: 2022.
- [52] Collins JF. Copper nutrition and biochemistry and human (patho)physiology. *Adv Food Nutr Res* 2021;96:311–64. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2021.01.005>.
- [53] Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol* 2016;35:107–15. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2016.02.006>.
- [54] Rehman M, Liu L, Wang Q, Saleem MH, Bashir S, Ullah S, et al. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. *Environ Sci Pollut Res* 2019;26:18003–16. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-05073-6/METRICS>.
- [55] Roberts EA, Schilsky ML. Current and Emerging Issues in Wilson’s Disease. *N Engl J Med* 2023;389:922–38. [https://doi.org/10.1056/NEJMRA1903585/SUPPL\\_FILE/NEJMRA1903585\\_DISCLOSUR](https://doi.org/10.1056/NEJMRA1903585/SUPPL_FILE/NEJMRA1903585_DISCLOSUR)

ES.PDF.

- [56] Muñoz-Bravo C, Soler-Iborte E, Lozano-Lorca M, Kouiti M, González-Palacios Torres C, Barrios-Rodríguez R, et al. Serum copper levels and risk of major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med* 2023;10:1217748. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2023.1217748/BIBTEX>.
- [57] Zhao H, Mei K, Hu Q, Wu Y, Xu Y, Qinling, et al. Circulating copper levels and the risk of cardio-cerebrovascular diseases and cardiovascular and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Environ Pollut* 2024;340. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.122711>.
- [58] International Agency for Research on Cancer (IARC). Some Fumigants, the Herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, Chlorinated Dibenzodioxins and Miscellaneous Industrial Chemicals. vol. 15. IARC; 1977.
- [59] Bionerd. Element mercury (Hg), liquid form. 2008. [https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Pouring\\_liquid\\_mercury\\_bionerd.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Pouring_liquid_mercury_bionerd.jpg) (accessed November 24, 2023).
- [60] Benedict R, Alman B, Scinicariello F, Klotzbach J, Citra M, Diamond G, et al. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2022.
- [61] Raj D, Maiti SK. Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review. *Environ Monit Assess* 2019;191. <https://doi.org/10.1007/S10661-019-7743-2>.
- [62] Decharat S, Phethuayluk P, Maneelok S, Thepaksorn P. Determination of Mercury Exposure among Dental Health Workers in Nakhon Si Thammarat Province, Thailand. *J Toxicol* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/401012>.
- [63] Kim KH, Kabir E, Jahan SA. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *J Hazard Mater* 2016;306:376–85. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.11.031>.
- [64] International Agency for Research on Cancer (IARC). Mercury and Mercury Compounds. vol. 58. International Agency for Research on Cancer; 1993.
- [65] Abadin H, Taylor J, Buser M, Scinicariello F, Przybyla J, Klotzbach JM, et al. Toxicological Profile for Lead. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2020.
- [66] Kwong WT, Friello P, Semba RD. Interactions between iron deficiency and lead poisoning: epidemiology and pathogenesis. *Sci Total Environ* 2004;330:21–37. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2004.03.017>.
- [67] Aufderheide AC, Wittmers LE. Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone. *Neurotoxicology* 1992;13:809–19.
- [68] Rebelo FM, Caldas ED. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. *Environ Res* 2016;151:671–88. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2016.08.027>.
- [69] Yu YL, Yang WY, Hara A, Asayama K, Roels HA, Nawrot TS, et al. Public and

- occupational health risks related to lead exposure updated according to present-day blood lead levels. *Hypertens Res* 2023;46:395. <https://doi.org/10.1038/S41440-022-01069-X>.
- [70] Shiek SS, Mani MS, Kabekkodu SP, Dsouza HS. Health repercussions of environmental exposure to lead: Methylation perspective. *Toxicology* 2021;461:152927. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2021.152927>.
- [71] International Agency for Research on Cancer (IARC). Inorganic and Organic Lead Compounds. vol. 87. 2006.
- [72] Risher J, McDonald A, Citra M, Bosch S, Amata R. Toxicological Profile for Selenium. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2003.
- [73] Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. *Curr Protein Pept Sci* 2014;15:598–607. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140608151134>.
- [74] Hadrup N, Ravn-Haren G. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of oral selenium from organic and inorganic sources: A review. *J Trace Elem Med Biol* 2021;67. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2021.126801>.
- [75] Olza J, Aranceta-Bartrina J, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G, et al. Reported Dietary Intake and Food Sources of Zinc, Selenium, and Vitamins A, E and C in the Spanish Population: Findings from the ANIBES Study. *Nutr* 2017, Vol 9, Page 697 2017;9:697. <https://doi.org/10.3390/NU9070697>.
- [76] Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/NU10091203>.
- [77] Zwolak I. The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: an Updated Review of Scientific Literature. *Biol Trace Elem Res* 2020;193:44–63. <https://doi.org/10.1007/S12011-019-01691-W>.
- [78] Barchielli G, Capperucci A, Tanini D. The Role of Selenium in Pathologies: An Updated Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11020251>.
- [79] Vinceti M, Filippini T, Cilloni S, Bargellini A, Vergoni AV, Tsatsakis A, et al. Health risk assessment of environmental selenium: Emerging evidence and challenges (Review). *Mol Med Rep* 2017;15:3323–35. <https://doi.org/10.3892/MMR.2017.6377>.
- [80] Sun Y, Wang Z, Gong P, Yao W, Ba Q, Wang H. Review on the health-promoting effect of adequate selenium status. *Front Nutr* 2023;10. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2023.1136458>.
- [81] International Agency for Research on Cancer (IARC). Selenium and selenium compounds. vol. 9. 1987.
- [82] Royal Society of Chemistry. Zinc - Element information, properties and uses. Periodic Table 2023. <https://www.rsc.org/periodic-table/element/30/zinc> (accessed December 8, 2023).
- [83] Roney N, Smith C, Williams M, Osier M, Paikoff S. Toxicological Profile for Zinc. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service,

Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2005.

- [84] Lombardi-Boccia G, Aguzzi A, Cappelloni M, Di Lullo G, Lucarini M. Total-diet study: dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy. *Br J Nutr* 2003;90:1117–21. <https://doi.org/10.1079/BJN2003997>.
- [85] Gerhardsson L, Englyst V, Lundström NG, Sandberg S, Nordberg G. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J Trace Elem Med Biol* 2002;16:261–6. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80055-4](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80055-4).
- [86] Chasapis CT, Spiliopoulou CA, Loutsidou AC, Stefanidou ME. Zinc and human health: An update. *Arch Toxicol* 2012;86:521–34. <https://doi.org/10.1007/S00204-011-0775-1/METRICS>.
- [87] Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2005 66 2005;6:449–62. <https://doi.org/10.1038/nrn1671>.
- [88] Joo YS, Kim HW, Lee S, Nam KH, Yun HR, Jhee JH, et al. Dietary zinc intake and incident chronic kidney disease. *Clin Nutr* 2021;40:1039–45. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2020.07.005>.
- [89] Li J, Cao D, Huang Y, Chen B, Chen Z, Wang R, et al. Zinc Intakes and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Front Nutr* 2022;9:798078. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.798078/BIBTEX>.
- [90] Chasapis CT, Ntoupa PSA, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Arch Toxicol* 2020 945 2020;94:1443–60. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02702-9>.
- [91] Léonard A, Gerber GB, Léonard F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat Res* 1986;168:343–53. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0165-1110(86)90026-6).
- [92] Wilbur S, Abadin H, Fay M, Yu D, Tencza B, Ingerman L, et al. Toxicological Profile for Chromium. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2012.
- [93] Williams M, Todd G, Roney N, Crawford J, Coles C, McClure P, et al. Toxicological Profile for Manganese. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2012.
- [94] Rodríguez-Barranco M, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Alguacil J, Gil F, González-Alzaga B, et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ* 2013;454–455:562–77. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.03.047>.
- [95] Begum W, Rai S, Banerjee S, Bhattacharjee S, Mondal MH, Bhattarai A, et al. A comprehensive review on the sources, essentiality and toxicological profile of nickel. *RSC Adv* 2022;12:9139–53. <https://doi.org/10.1039/D2RA00378C>.
- [96] Muianga C, Scinicariello F, Casillas G, Shoeb M, Antezana A, Balachandran R, et al. Toxicological Profile for Nickel. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2023.

- [97] Buser M, Ingber S, Ingerman L, Johnson H, Kawa M, Citra M. Toxicological Profile for Antimony and Compounds. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2019.
- [98] Boreiko CJ, Rossman TG. Antimony and its compounds: Health impacts related to pulmonary toxicity, cancer, and genotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2020;403:115156. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2020.115156>.
- [99] International Agency for Research on Cancer (IARC). Cobalt, Antimony Compounds, and Weapons-grade Tungsten Alloy. vol. 131. 2023.
- [100] Benedict R, Scinicariello F, Alman B, Lynch M, Juergens M, Derrick H, et al. Toxicological Profile for Beryllium. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2023.
- [101] Keith S, Faroon O, Balachandran R, Antezana A, Derrick H, Diskin K, et al. Toxicological Profile for Cobalt. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2023.
- [102] Todd G, Keith S, Faroon O, Buser M, Ingerman L, Citra M, et al. Toxicological Profile for Molybdenum. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2020.
- [103] Taylor J, Keith S, Cseh L, Ingerman L, Chappell L, Rhoades J, et al. Toxicological Profile for Vanadium. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2012.
- [104] Keith S, Moffett D, Rosemond Z, Wohlers D, Amata R, Diamond G, et al. Toxicological Profile for Tungsten. Atlanta, United States: U.S. Dept. of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2005.
- [105] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF>.
- [106] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [107] Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Res* 2010;70:5649–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040/656390/P/AACR-CENTENNIAL-SERIES-THE-BIOLOGY-OF-CANCER>.
- [108] Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer* 2010;46:1181–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.027>.
- [109] Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010 298 2009;29:1093–102. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.416>.

- [110] Kowald A, Passos JF, Kirkwood TBL. On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell* 2020;19:e13270. <https://doi.org/10.1111/ACEL.13270>.
- [111] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today 2024. <https://gco.iarc.fr/today/en> (accessed February 2, 2024).
- [112] United Nations Development Program. Human Development Index (HDI). *Hum Dev Reports* 2021. <https://hdr.undp.org/data-center/human-development-index#/indicies/HDI> (accessed December 16, 2023).
- [113] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- [114] Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, Fu W, Gaw BL, Harvey JD, et al. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol* 2022;8:420–44. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2021.6987>.
- [115] Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la Causa de Muerte. Nota de prensa. Madrid, Spain: 2023.
- [116] Neo J, Fettes L, Gao W, Higginson IJ, Maddocks M. Disability in activities of daily living among adults with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2017;61:94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.10.006>.
- [117] Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: A population-based cost analysis. *Lancet Oncol* 2013;14:1165–74. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70442-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70442-X).
- [118] Jönsson B. Cost of cancer: Healthcare expenditures and economic impact. In: Walter E, editor. *Regul. Econ. Asp. Oncol.*, vol. 213, Springer New York LLC; 2019, p. 7–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-01207-6\\_2/COVER](https://doi.org/10.1007/978-3-030-01207-6_2/COVER).
- [119] Chen S, Cao Z, Prettner K, Kuhn M, Yang J, Jiao L, et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. *JAMA Oncol* 2023;9:465–72. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2022.7826>.
- [120] Tran KB, Lang JJ, Compton K, Xu R, Acheson AR, Henrikson HJ, et al. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)* 2022;400:563–91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01438-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01438-6).
- [121] Tybjerg AJ, Friis S, Brown K, Nilbert MC, Morch L, Køster B. Updated fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in Denmark in 2018. *Sci Reports* 2022 121 2022;12:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04564-2>.
- [122] World Health Organization. Preventing cancer 2022. <https://www.who.int/activities/preventing-cancer> (accessed December 15, 2023).
- [123] Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 4287

- 2021;13:4287. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13174287>.
- [124] European Cancer Information System (ECIS). Data explorer. Incidence and mortality 2022 2023. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php> (accessed December 19, 2023).
- [125] Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Estimaciones de la incidencia de cáncer en España. 2023.
- [126] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 2018;391:1023–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3).
- [127] Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 2017;165:193–200. <https://doi.org/10.1007/S10549-017-4325-2/TABLES/4>.
- [128] Ligtenberg MJL, Hogervorst FBL, Willems HW, Arts PJW, Brink G, Hageman S, et al. Characteristics of small breast and/or ovarian cancer families with germline mutations in BRCA1 and BRCA2. *Br J Cancer* 1999 799 1999;79:1475–8. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690235>.
- [129] Britt KL, Cuzick J, Phillips KA. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2020 208 2020;20:417–36. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>.
- [130] Michailidou K, Beesley J, Lindstrom S, Canisius S, Dennis J, Lush MJ, et al. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer. *Nat Genet* 2015 474 2015;47:373–80. <https://doi.org/10.1038/ng.3242>.
- [131] Ban KA, Godellas C V. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2014;23:409–22. <https://doi.org/10.1016/J.SOC.2014.03.011>.
- [132] Chlebowski RT. Factors that modify breast cancer risk in women. UpToDate 2023. <https://www.uptodate-com.bvsspa.idm.oclc.org/contents/factors-that-modify-breast-cancer-risk-in-women> (accessed December 20, 2023).
- [133] Qu X, Zhang X, Qin A, Liu G, Zhai Z, Hao Y, et al. Bone mineral density and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138:261–71. <https://doi.org/10.1007/S10549-013-2431-3/METRICS>.
- [134] Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, Hudson MM, Meadows AT, Neglia JP, et al. Systematic review: Surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med* 2010;152:444–55. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-7-201004060-00009>.
- [135] Suzuki R, Orsini N, Saji S, Key TJ, Wolk A. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status—A meta-analysis. *Int J Cancer* 2009;124:698–712. <https://doi.org/10.1002/IJC.23943>.
- [136] Hardefeldt PJ, Penninkilampi R, Edirimanne S, Eslick GD. Physical Activity and Weight Loss Reduce the Risk of Breast Cancer: A Meta-analysis of 139 Prospective and Retrospective Studies. *Clin Breast Cancer* 2018;18:e601–12. <https://doi.org/10.1016/J.CLBC.2017.10.010>.

- [137] Van Horn L, Aragaki AK, Howard B V., Allison MA, Isasi CR, Manson JAE, et al. Eating Pattern Response to a Low-Fat Diet Intervention and Cardiovascular Outcomes in Normotensive Women: The Women’s Health Initiative. *Curr Dev Nutr* 2020;4. <https://doi.org/10.1093/CDN/NZAA021>.
- [138] Arriaga ME, Vajdic CM, Canfell K, MacInnis RJ, Banks E, Byles JE, et al. The preventable burden of breast cancers for premenopausal and postmenopausal women in Australia: A pooled cohort study. *Int J Cancer* 2019;145:2383–94. <https://doi.org/10.1002/IJC.32231>.
- [139] Gram IT, Park SY, Kolonel LN, Maskarinec G, Wilkens LR, Henderson BE, et al. Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol: The MEC Study. *Am J Epidemiol* 2015;182:917–25. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWV092>.
- [140] Redondo-Sánchez D, Marcos-Gragera R, Carulla M, de Munain AL, Gregori CS, Chillarón RJ, et al. Lung, breast and colorectal cancer incidence by socioeconomic status in Spain: A population-based multilevel study. *Cancers (Basel)* 2021;13:2820. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13112820/S1>.
- [141] Gray JM, Rasanayagam S, Engel C, Rizzo J. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ Heal* 2017 161 2017;16:1–61. <https://doi.org/10.1186/S12940-017-0287-4>.
- [142] Zeinomar N, Oskar S, Kehm RD, Sahebzada S, Terry MB. Environmental exposures and breast cancer risk in the context of underlying susceptibility: A systematic review of the epidemiological literature. *Environ Res* 2020;187:109346. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109346>.
- [143] Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. UpToDate 2022. <https://www-uptodate-com.bvsspa.idm.oclc.org/contents/pathology-of-breast-cancer> (accessed December 18, 2023).
- [144] Li CI, Moe RE, Daling JR. Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. *Arch Intern Med* 2003;163:2149–53. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.163.18.2149>.
- [145] Joe BN. Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer. UpToDate 2023. <https://www-uptodate-com.bvsspa.idm.oclc.org/contents/clinical-features-diagnosis-and-staging-of-newly-diagnosed-breast-cancer> (accessed December 18, 2023).
- [146] Swain M, Jeudy M. Breast Masses in Biological Females. *JAMA* 2022;328:294–5. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2022.9554>.
- [147] Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Wiley-Blackwell; 2017.
- [148] Burstein HJ. Tumor, node, metastasis (TNM) staging classification for breast cancer. UpToDate 2022. <https://www-uptodate-com.bvsspa.idm.oclc.org/contents/tumor-node-metastasis-tnm-staging-classification-for-breast-cancer> (accessed December 18, 2023).
- [149] Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* 2019;321:288–300. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2018.19323>.

- [150] Bartels SAL, Donker M, Poncet C, Sauvé N, Straver ME, Van De Velde CJH, et al. Radiotherapy or Surgery of the Axilla After a Positive Sentinel Node in Breast Cancer: 10-Year Results of the Randomized Controlled EORTC 10981-22023 AMAROS Trial. *J Clin Oncol* 2023;41:2159–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01565>.
- [151] Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu N (Nil), et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 2018;391:462–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0).
- [152] Parida L, Patel TN. Systemic impact of heavy metals and their role in cancer development: a review. *Environ Monit Assess* 2023 1956 2023;195:1–27. <https://doi.org/10.1007/S10661-023-11399-Z>.
- [153] Liu L, Chen J, Liu C, Luo Y, Chen J, Fu Y, et al. Relationships Between Biological Heavy Metals and Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Nutr* 2022;9:838762. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.838762>.
- [154] Florez-Garcia VA, Guevara-Romero EC, Hawkins MM, Bautista LE, Jenson TE, Yu J, et al. Cadmium exposure and risk of breast cancer: A meta-analysis. *Environ Res* 2023;219. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.115109>.
- [155] Gaudet MM, Deubler EL, Kelly RS, Ryan Diver W, Teras LR, Hodge JM, et al. Blood levels of cadmium and lead in relation to breast cancer risk in three prospective cohorts. *Int J Cancer* 2019;144:1010–6. <https://doi.org/10.1002/IJC.31805>.
- [156] Nawrot TS, Martens DS, Hara A, Plusquin M, Vangronsveld J, Roels HA, et al. Association of total cancer and lung cancer with environmental exposure to cadmium: the meta-analytical evidence. *Cancer Causes Control* 2015;26:1281–8. <https://doi.org/10.1007/S10552-015-0621-5>.
- [157] Khanjani N, Jafarnejad AB, Tavakkoli L. Arsenic and breast cancer: a systematic review of epidemiologic studies. *Rev Environ Health* 2017;32:267–77. <https://doi.org/10.1515/REVEH-2016-0068>.
- [158] Moslehi R, Stagnar C, Srinivasan S, Radziszowski P, Carpenter DO. The possible role of arsenic and gene-arsenic interactions in susceptibility to breast cancer: A systematic review. *Rev Environ Health* 2021;36:523–34. <https://doi.org/10.1515/REVEH-2020-0080/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- [159] Baris D, Waddell R, Beane Freeman LE, Schwenn M, Colt JS, Ayotte JD, et al. Elevated Bladder Cancer in Northern New England: The Role of Drinking Water and Arsenic. *J Natl Cancer Inst* 2016;108. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJW099>.
- [160] Yu M, Zhang J. Serum and Hair Nickel Levels and Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Trace Elem Res* 2017;179:32–7. <https://doi.org/10.1007/S12011-017-0949-7/METRICS>.
- [161] Pesch B, Kendzia B, Pohlabein H, Ahrens W, Wichmann HE, Siemiatycki J, et al. Exposure to Welding Fumes, Hexavalent Chromium, or Nickel and Risk of Lung Cancer. *Am J Epidemiol* 2019;188:1984–93. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWZ187>.
- [162] Suh M, Wikoff D, Lipworth L, Goodman M, Fitch S, Mittal L, et al. Hexavalent chromium and stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Toxicol* 2019;49:140–59. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1578730>.
- [163] Jones SR, Atkin P, Holroyd C, Lutman E, Vives i Batlle J, Wakeford R, et al. Lung

- cancer mortality at a UK tin smelter. *Occup Med (Chic Ill)* 2007;57:238–45.  
<https://doi.org/10.1093/OCCMED/KQL153>.
- [164] Schnorr TM, Steenland K, Thun MJ, Rinsky RA. Mortality in a cohort of antimony smelter workers. *Am J Ind Med* 1995;27:759–70.  
<https://doi.org/10.1002/AJIM.4700270510>.
- [165] Feng Y, Zeng JW, Ma Q, Zhang S, Tang J, Feng JF. Serum copper and zinc levels in breast cancer: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol* 2020;62:126629.  
<https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2020.126629>.
- [166] Jouybari L, Kiani F, Islami F, Sanagoo A, Sayehmiri F, Hosnedlova B, et al. Copper Concentrations in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Med Chem* 2019;27:6373–83. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190918120209>.
- [167] Zhu X, Pan D, Wang N, Wang S, Sun G. Relationship Between Selenium in Human Tissues and Breast Cancer: a Meta-analysis Based on Case-Control Studies. *Biol Trace Elem Res* 2021;199:4439–46. <https://doi.org/10.1007/S12011-021-02574-9>.
- [168] He D, Wang Z, Huang C, Fang X, Chen D. Serum Selenium Levels and Cervical Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Trace Elem Res* 2017;179:195–202. <https://doi.org/10.1007/S12011-017-0982-6/METRICS>.
- [169] Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandes R, Cooley K, Seely A, et al. Selenium and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS One* 2011;6:e26259. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0026259>.
- [170] Jouybari L, Kiani F, Akbari A, Sanagoo A, Sayehmiri F, Aaseth J, et al. A meta-analysis of zinc levels in breast cancer. *J Trace Elem Med Biol* 2019;56:90–9. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2019.06.017>.
- [171] Wang Y, Sun Z, Li A, Zhang Y. Association between serum zinc levels and lung cancer: a meta-analysis of observational studies. *World J Surg Oncol* 2019;17. <https://doi.org/10.1186/S12957-019-1617-5>.
- [172] Zhang C, Cheng R, Ding J, Li X, Niu H, Li X. Serum Copper and Zinc Levels and Colorectal Cancer in Adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination 2011-2016. *Biol Trace Elem Res* 2022;200:2033–9. <https://doi.org/10.1007/S12011-021-02826-8>.
- [173] Rhee J, Graubard BI, Purdue MP. Blood lead levels and lung cancer mortality: An updated analysis of NHANES II and III. *Cancer Med* 2021;10:4066–74. <https://doi.org/10.1002/CAM4.3943>.
- [174] Anđelković M, Djordjevic AB, Vukelić D, Đukić-Čosić D, Aćimović M, Bojanić N, et al. Cadmium and lead implication in testis cancer; is there a connection? *Chemosphere* 2023;330. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138698>.
- [175] Meng Y, Tang C, Yu J, Meng S, Zhang W. Exposure to lead increases the risk of meningioma and brain cancer: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol* 2020;60:126474. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2020.126474>.
- [176] Kim S, Song SH, Lee CW, Kwon JT, Park EY, Oh JK, et al. Low-Level Environmental Mercury Exposure and Thyroid Cancer Risk Among Residents Living Near National Industrial Complexes in South Korea: A Population-Based Cohort Study. <https://HomeLiebertpubCom/Thy> 2022;32:1118–28.

<https://doi.org/10.1089/THY.2022.0084>.

- [177] Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* 2007;115 Suppl 1:106–14. <https://doi.org/10.1289/EHP.9358>.
- [178] Pierozan P, Kosnik M, Karlsson O. High-content analysis shows synergistic effects of low perfluorooctanoic acid (PFOS) and perfluorooctane sulfonic acid (PFOA) mixture concentrations on human breast epithelial cell carcinogenesis. *Environ Int* 2023;172:107746. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2023.107746>.
- [179] Goodson WH, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Ali AM, de Cerain Salsamendi AL, et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. *Carcinogenesis* 2015;36:S254–96. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGV039>.
- [180] Stafoggia M, Breitner S, Hampel R, Basagaña X. Statistical Approaches to Address Multi-Pollutant Mixtures and Multiple Exposures: the State of the Science. *Curr Environ Heal Reports* 2017;4:481–90. <https://doi.org/10.1007/S40572-017-0162-Z/METRICS>.
- [181] Keil AP, Buckley JP, O'Brien KM, Ferguson KK, Zhao S, White AJ. A quantile-based g-computation approach to addressing the effects of exposure mixtures. *Environ Health Perspect* 2020;128. [https://doi.org/10.1289/EHP5838/SUPPL\\_FILE/EHP5838.S002.CODEANDDATA.ACCO.ZIP](https://doi.org/10.1289/EHP5838/SUPPL_FILE/EHP5838.S002.CODEANDDATA.ACCO.ZIP).
- [182] Wild CP. Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1847–50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>.
- [183] Vermeulen R, Schymanski EL, Barabási AL, Miller GW. The exposome and health: Where chemistry meets biology. *Science* (80- ) 2020;367:392–6. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAY3164>.
- [184] Vineis P, Robinson O, Chadeau-Hyam M, Dehghan A, Mudway I, Dagnino S. What is new in the exposome? *Environ Int* 2020;143:105887. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105887>.
- [185] Vineis P, Chadeau-Hyam M, Gmuender H, Gulliver J, Herceg Z, Kleinjans J, et al. The exposome in practice: Design of the EXPOsOMICS project. *Int J Hyg Environ Health* 2017;220:142–51. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2016.08.001>.
- [186] Dennis KK, Marder E, Balshaw DM, Cui Y, Lynes MA, Patti GJ, et al. Biomonitoring in the Era of the Exposome. *Environ Health Perspect* 2017;125:502–10. <https://doi.org/10.1289/EHP474>.
- [187] Riboli E, Hunt K, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, et al. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 2002;5:1113–24. <https://doi.org/10.1079/PHN2002394>.
- [188] International Agency for Research on Cancer (IARC). EPIC-Europe study. EPIC Centres 2024. <https://epic.iarc.fr/centres/> (accessed January 9, 2024).
- [189] González CA, Navarro C, Martínez C, Quirós JR, Dorransoro M, Barricarte A, et al.

- [The European prospective investigation about cancer and nutrition (EPIC)]. *Rev Esp Salud Publica* 2004;78:167–76. <https://doi.org/10.1590/S1135-57272004000200004>.
- [190] World Health Organization. International Classification of Diseases for Oncology, 3rd Edition (ICD-O-3). Classifications 2024. <https://www.who.int/standards/classifications/other-classifications/international-classification-of-diseases-for-oncology> (accessed January 29, 2024).
- [191] Peters T, Brage S, Westgate K, Franks PW, Gradmark A, Diaz MJT, et al. Validity of a short questionnaire to assess physical activity in 10 European countries. *Eur J Epidemiol* 2012;27:15–25. <https://doi.org/10.1007/S10654-011-9625-Y/FIGURES/3>.
- [192] Wang X, Mukherjee B, Park SK. Associations of cumulative exposure to heavy metal mixtures with obesity and its comorbidities among U.S. adults in NHANES 2003–2014. *Environ Int* 2018;121:683–94. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.09.035>.
- [193] Wang R, Long T, He J, Xu Y, Wei Y, Zhang Y, et al. Associations of multiple plasma metals with chronic kidney disease in patients with diabetes. *Ecotoxicol Environ Saf* 2022;244:114048. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.114048>.
- [194] Mérida-Ortega Á, Rothenberg SJ, Cebrián ME, López-Carrillo L. Breast cancer and urinary metal mixtures in Mexican women. *Environ Res* 2022;210:112905. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.112905>.
- [195] Hiatt RA, Haslam SZ, Osuch J. The Breast Cancer and the Environment Research Centers: Transdisciplinary Research on the Role of the Environment in Breast Cancer Etiology. *Environ Health Perspect* 2009;117:1814–22. <https://doi.org/10.1289/EHP.0800120>.
- [196] Pala V, Agnoli C, Cavalleri A, Rinaldi S, Orlandi R, Segrado F, et al. Prediagnostic Levels of Copper and Zinc and Breast Cancer Risk in the ORDET Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2022;31:1209–15. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1252/682049/AM/PRE-DIAGNOSTIC-LEVELS-OF-COPPER-AND-ZINC-AND>.
- [197] Kotsopoulos J, Sukiennicki G, Muszyńska M, Gackowski D, Kąklewski K, Durda K, et al. Plasma micronutrients, trace elements, and breast cancer in BRCA1 mutation carriers: An exploratory study. *Cancer Causes Control* 2012;23:1065–74. <https://doi.org/10.1007/S10552-012-9975-0/METRICS>.
- [198] Li Z, Long T, Wang R, Feng Y, Hu H, Xu Y, et al. Plasma metals and cancer incidence in patients with type 2 diabetes. *Sci Total Environ* 2021;758:143616. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143616>.
- [199] Bai Y, Wang G, Fu W, Lu Y, Wei W, Chen W, et al. Circulating essential metals and lung cancer: Risk assessment and potential molecular effects. *Environ Int* 2019;127:685–93. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.04.021>.
- [200] Lin J, Lin X, Qiu J, You X, Xu J. Association between heavy metals exposure and infertility among American women aged 20–44 years: A cross-sectional analysis from 2013 to 2018 NHANES data. *Front Public Heal* 2023;11:1122183. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2023.1122183/BIBTEX>.
- [201] Tu Y, Fan G, Wu N, Wu H, Xiao H. Association of plasma lead, cadmium and selenium levels with hearing loss in adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2011–2012. *Br J Nutr* 2022;128:1100–7. <https://doi.org/10.1017/S0007114521004335>.

- [202] Fernández-Martínez NF, Ching-López A, Olry de Labry Lima A, Salamanca-Fernández E, Pérez-Gómez B, Jiménez-Moleón JJ, et al. Relationship between exposure to mixtures of persistent, bioaccumulative, and toxic chemicals and cancer risk: A systematic review. *Environ Res* 2020;188. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109787>.
- [203] Niehoff NM, O'Brien KM, Keil AP, Levine KE, Liyanapatirana C, Haines LG, et al. Metals and Breast Cancer Risk: A Prospective Study Using Toenail Biomarkers. *Am J Epidemiol* 2021;190:2360–73. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWAB204>.
- [204] White AJ, O'Brien KM, Niehoff NM, Carroll R, Sandler DP. Metallic Air Pollutants and Breast Cancer Risk in a Nationwide Cohort Study. *Epidemiology* 2019;30:20–8. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000917>.
- [205] Kresovich JK, Erdal S, Chen HY, Gann PH, Argos M, Rauscher GH. Metallic air pollutants and breast cancer heterogeneity. *Environ Res* 2019;177:108639. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2019.108639>.
- [206] Lim JT, Tan YQ, Valeri L, Lee J, Geok PP, Chia SE, et al. Association between serum heavy metals and prostate cancer risk – A multiple metal analysis. *Environ Int* 2019;132:105109. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.105109>.
- [207] Park SY, Wilkens LR, Morris JS, Henderson BE, Kolonel LN. Serum zinc and prostate cancer risk in a nested case–control study: The multiethnic cohort. *Prostate* 2013;73:261–6. <https://doi.org/10.1002/PROS.22565>.
- [208] Wang H, Wang J, Cao Y, Chen J, Deng Q, Chen Y, et al. Combined Exposure to 33 Trace Elements and Associations With the Risk of Oral Cancer: A Large-Scale Case-Control Study. *Front Nutr* 2022;9:913357. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.913357/BIBTEX>.
- [209] Zhang K, Zhu T, Quan X, Qian Y, Liu Y, Zhang J, et al. Association between blood heavy metals and lung cancer risk: A case-control study in China. *Chemosphere* 2023;343:140200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140200>.
- [210] Caini S, Cozzolino F, Saieva C, Aprea MC, De Bonfioli Cavalcabo' N, Ermini I, et al. Serum heavy metals and breast cancer risk: A case-control study nested in the Florence cohort of the EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition) study. *Sci Total Environ* 2023;861:160568. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.160568>.
- [211] Feng JF, Lu L, Zeng P, Yang YH, Luo J, Yang YW, et al. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *Int J Clin Oncol* 2012;17:575–83. <https://doi.org/10.1007/S10147-011-0327-Y/METRICS>.
- [212] Costa MI, Sarmiento-Ribeiro AB, Gonçalves AC. Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* 2023, Vol 24, Page 4822 2023;24:4822. <https://doi.org/10.3390/IJMS24054822>.
- [213] Satarug S, Vesey DA, Gobe GC. Health Risk Assessment of Dietary Cadmium Intake: Do Current Guidelines Indicate How Much is Safe? *Environ Health Perspect* 2017;125:284–8. <https://doi.org/10.1289/EHP108>.
- [214] Rodgers KM, Udesky JO, Rudel RA, Brody JG. Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environ Res* 2018;160:152–82.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2017.08.045>.

- [215] Liu H, Sun Y, Ran L, Li J, Shi Y, Mu C, et al. Endocrine-disrupting chemicals and breast cancer: a meta-analysis. *Front Oncol* 2023;13:1282651. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1282651/BIBTEX>.
- [216] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [217] Wang L, Wise JTF, Zhang Z, Shi X. Progress and Prospects of Reactive Oxygen Species in Metal Carcinogenesis. *Curr Pharmacol Reports* 2016;2:178–86. <https://doi.org/10.1007/S40495-016-0061-2/FIGURES/1>.
- [218] Wise JTF, Wang L, Zhang Z, Shi X. The 9th Conference on Metal Toxicity and Carcinogenesis: The conference overview. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017;331:1–5. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2017.04.007>.
- [219] Chen QY, DesMarais T, Costa M. Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019;59:537. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010818-021031>.
- [220] Kamiya T. Copper Biology in Health and Disease: Copper in the tumor microenvironment and tumor metastasis. *J Clin Biochem Nutr* 2022;71:22. <https://doi.org/10.3164/JCBN.22-9>.
- [221] Zhu Y, Costa M. Metals and molecular carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2020;41:1161–72. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGAA076>.
- [222] Zimta AA, Schitcu V, Gurzau E, Stavaru C, Manda G, Szedlacsek S, et al. Biological and molecular modifications induced by cadmium and arsenic during breast and prostate cancer development. *Environ Res* 2019;178:108700. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2019.108700>.
- [223] Zhao L, Islam R, Wang Y, Zhang X, Liu LZ. Epigenetic Regulation in Chromium-, Nickel- and Cadmium-Induced Carcinogenesis. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14235768>.
- [224] Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 2016 239 2016;23:8244–59. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6333-X>.
- [225] Manić L, Wallace D, Onganer PU, Taalab YM, Farooqi AA, Antonijević B, et al. Epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis. *Toxicol Reports* 2022;9:778–87. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2022.03.037>.
- [226] Michalczyk K, Cymbaluk-Płoska A. The Role of Zinc and Copper in Gynecological Malignancies. *Nutr* 2020, Vol 12, Page 3732 2020;12:3732. <https://doi.org/10.3390/NU12123732>.
- [227] Byrne C, Divekar SD, Storch GB, Parodi DA, Martin MB. Metals and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2013;18:63–73. <https://doi.org/10.1007/S10911-013-9273-9/METRICS>.
- [228] Suzuki T, Hidaka T, Kumagai Y, Yamamoto M. Environmental pollutants and the immune response. *Nat Immunol* 2020 2112 2020;21:1486–95.

<https://doi.org/10.1038/s41590-020-0802-6>.

- [229] Guilbert C, Kelly ADR, Petruccelli LA, Lemaire M, Mann KK. Exposure to tungsten induces DNA damage and apoptosis in developing B lymphocytes. *Leuk* 2011 2512 2011;25:1900–4. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.160>.
- [230] Huang HW, Lee CH, Yu HS. Arsenic-Induced Carcinogenesis and Immune Dysregulation. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16. <https://doi.org/10.3390/IJERPH16152746>.
- [231] Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutr* 2019, Vol 11, Page 2273 2019;11:2273. <https://doi.org/10.3390/NU11102273>.
- [232] Tan HW, Mo HY, Lau ATY, Xu YM. Selenium Species: Current Status and Potentials in Cancer Prevention and Therapy. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 75 2018;20:75. <https://doi.org/10.3390/IJMS20010075>.
- [233] Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 2016 239 2016;23:8244–59. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6333-X>.
- [234] Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne JLCM, Svendsen C, Swain S, Stürzenbaum SR. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci Total Environ* 2010;408:3725–34. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2010.02.038>.
- [235] Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *J Chem* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
- [236] Lamkarkach F, Ougier E, Garnier R, Viau C, Kolossa-Gehring M, Lange R, et al. Human biomonitoring initiative (HBM4EU): Human biomonitoring guidance values (HBM-GVs) derived for cadmium and its compounds. *Environ Int* 2021;147:106337. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106337>.
- [237] Lagunas-Rangel FA, Linnea-Niemi JV, Kudlak B, Williams MJ, Jönsson J, Schiöth HB. Role of the Synergistic Interactions of Environmental Pollutants in the Development of Cancer. *GeoHealth* 2022;6:e2021GH000552. <https://doi.org/10.1029/2021GH000552>.
- [238] Issah I, Duah MS, Arko-Mensah J, Bawua SA, Agyekum TP, Fobil JN. Exposure to metal mixtures and adverse pregnancy and birth outcomes: A systematic review. *Sci Total Environ* 2024;908:168380. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.168380>.

## Trabajo científico asociado a la tesis doctoral

**Título:** Breast cancer risk for the joint exposure to metals and metalloids in women: Results from the EPIC-Spain cohort.

**Autores:** Nicolás Francisco Fernández-Martínez, Miguel Rodríguez-Barranco, José María Huerta, Fernando Gil, Pablo Olmedo, Esther Molina-Montes, Marcela Guevara, Raúl Zamora-Ros, Ana Jiménez-Zabala, Sandra Milena Colorado-Yohar, Eva Ardanaz, Catalina Bonet, Pilar Amiano, María Dolores Chirlaque, Beatriz Pérez-Gómez, José Juan Jiménez-Moleón, Miguel Martín-Jiménez, Esperanza de Santiago, María José Sánchez.

**Revista:** *Science of The Total Environment*.

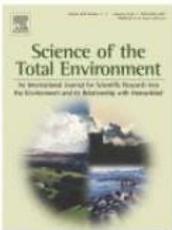
**Fecha de publicación:** 28/11/2023.

**Factor de impacto (2022):** 9,800.

**Categoría JCR y posición (2022):** *Environmental Sciences*, 26/275 (Q1, D1).

**PMID:** 38036124.

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168816>.



**Breast cancer risk for the joint exposure to metals and metalloids in women: Results from the EPIC-Spain cohort**

**Author:** Nicolás Francisco Fernández-Martínez, Miguel Rodríguez-Barranco, José María Huerta, Fernando Gil, Pablo Olmedo, Esther Molina-Montes, Marcela Guevara, Raúl Zamora-Ros, Ana Jiménez-Zabala, Sandra Milena Colorado-Yohar, Eva Ardanaz, Catalina Bonet, Pilar Amiano et al.

**Publication:** Science of The Total Environment

**Publisher:** Elsevier

**Date:** Available online 28 November 2023

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

### Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>



Contents lists available at ScienceDirect

## Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Breast cancer risk for the joint exposure to metals and metalloids in women: Results from the EPIC-Spain cohort

Nicolás Francisco Fernández-Martínez<sup>a,b,c</sup>, Miguel Rodríguez-Barranco<sup>a,b,c,\*</sup>, José María Huerta<sup>c,d</sup>, Fernando Gil<sup>e</sup>, Pablo Olmedo<sup>e</sup>, Esther Molina-Montes<sup>a,c,f,g</sup>, Marcela Guevara<sup>c,h,i</sup>, Raúl Zamora-Ros<sup>j,k</sup>, Ana Jiménez-Zabala<sup>c,l,m</sup>, Sandra Milena Colorado-Yohar<sup>c,d,n</sup>, Eva Ardanaz<sup>c,h,i</sup>, Catalina Bonet<sup>j,k</sup>, Pilar Amiano<sup>c,l,m</sup>, María Dolores Chirlaque<sup>c,d</sup>, Beatriz Pérez-Gómez<sup>c,o</sup>, José Juan Jiménez-Moleón<sup>a,c,p</sup>, Miguel Martín-Jiménez<sup>q,r,s</sup>, Esperanza de Santiago<sup>t</sup>, María-José Sánchez<sup>a,b,c,p</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs, GRANADA, 18012 Granada, Spain

<sup>b</sup> Escuela Andaluza de Salud Pública (EASP), 18011 Granada, Spain

<sup>c</sup> Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Epidemiology, Regional Health Council, IMIB-Arrixaca, Murcia University, 30008 Murcia, Spain

<sup>e</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>f</sup> Department of Nutrition and Food Science, University of Granada, 18011 Granada, Spain

<sup>g</sup> Institute of Nutrition and Food Technology (INYTA) 'Jose Mataix', Biomedical Research Center, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>h</sup> Instituto de Salud Pública y Laboral de Navarra, 31003 Pamplona, Spain

<sup>i</sup> Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), 31008 Pamplona, Spain

<sup>j</sup> Unit of Nutrition and Cancer, Cancer Epidemiology Research Program, Catalan Institute of Oncology (ICO), 08908 Bellvitge, Spain

<sup>k</sup> Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08908 Barcelona, Spain

<sup>l</sup> Ministry of Health of the Basque Government, Sub Directorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, 20013 San Sebastian, Spain

<sup>m</sup> BioGipuzkoa Health Research Institute, Epidemiology of Chronic and Communicable Diseases Group, 20014 San Sebastián, Spain

<sup>n</sup> Research Group on Demography and Health, National Faculty of Public Health, University of Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>o</sup> Department of Epidemiology for Chronic Diseases, National Center of Epidemiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>p</sup> Department of Legal Medicine and Toxicology, University of Granada, 18016 Granada, Spain

<sup>q</sup> Hospital Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Universidad Complutense, 28007 Madrid, Spain

<sup>r</sup> GEICAM, Spanish Breast Cancer Group, 28703 Madrid, Spain

<sup>s</sup> Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Oncología (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain

<sup>t</sup> GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government, PTS Granada, 18016 Granada, Spain

\* Corresponding author at: Escuela Andaluza de Salud Pública, Cuesta del Observatorio, 4, 18011 Granada, (Spain).  
E-mail address: [miguel.rodriguez.barranco.easp@juntadeandalucia.es](mailto:miguel.rodriguez.barranco.easp@juntadeandalucia.es) (M. Rodríguez-Barranco).

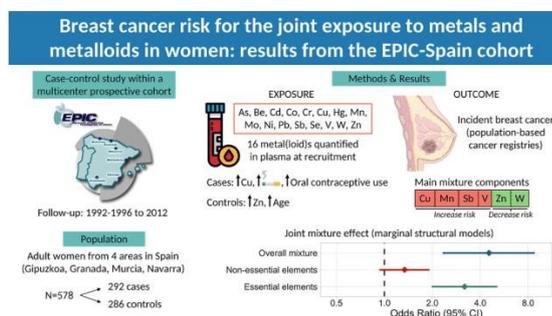
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168816>

Available online 28 November 2023  
0048-9697/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

## HIGHLIGHTS

- Exposure to 16 metal(loid)s was assessed in 578 women from a multicenter cohort.
- Breast cancer cases showed significantly higher Cu and lower Zn plasma levels.
- The single-metal analysis found a positive association for Cu, Pb and W.
- The mixture analysis identified Cu, Mn, Sb, V, W and Zn as the main components.
- The joint effect of the metal mixture was a 4-fold increase in breast cancer risk.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

Editor: Lidia Minguez Alarcon

## Keywords:

Breast cancer  
Metals  
Metalloids  
Metal mixture  
Biological monitoring  
Epidemiology

## ABSTRACT

Environmental factors play a role in breast cancer development. While metals and metalloids (MMs) include some carcinogens, their association with breast cancer depends on the element studied. Most studies focus on individual MMs, but the combined effects of metal mixtures remain unclear. The aim of this study was to analyze the relationship between the joint exposure to MMs and the risk of developing female breast cancer.

We conducted a case-control study within the multicenter prospective EPIC-Spain cohort. Study population comprised 292 incident cases and 286 controls. Plasma concentrations of 16 MMs were quantified at recruitment. Potential confounders were collected using a questionnaire and anthropometric measurements. Mixed-effects logistic regression models were built to explore the effect of individual MMs. Quantile-based g computation models were applied to identify the main mixture components and to estimate the joint effect of the metal mixture.

The geometric means were highest for Cu (845.6 ng/ml) and Zn (604.8 ng/ml). Cases had significantly higher Cu concentrations ( $p = 0.010$ ) and significantly lower Zn concentrations ( $p < 0.001$ ). Cu (+0.42) and Mn (+0.13) showed the highest positive weights, whereas Zn (-0.61) and W (-0.16) showed the highest negative weights. The joint effect of the metal mixture was estimated at an OR = 4.51 (95%CI = 2.32–8.79), suggesting a dose-response relationship. No evidence of non-linearity or non-additivity was found.

An unfavorable exposure profile, primarily characterized by high Cu and low Zn levels, could lead to a significant increase in the risk of developing female breast cancer. Further studies are warranted to confirm these findings.

## 1. Introduction

Cancer is a significant public health concern as it ranks among the leading causes of morbidity and mortality (GBD 2017 Causes of Death Collaborators GA et al., 2018). The most incident cancer in women is breast cancer, with more than two million cases diagnosed worldwide in 2020 (Ferlay et al., 2020). In Spain, there were 34,750 new cases of female breast cancer, accounting for almost 30 % of all cancers in women (Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2022). Despite having improved our understanding of breast cancer causes, such as alcohol consumption (Jung et al., 2016), overweight and obesity in postmenopausal women (Schonfeld et al., 2011), and low levels of physical activity (Wu et al., 2013), knowledge gaps still exist. Environmental factors have recently gained interest due to the evidence indicating that exposure to chemicals is associated with an increased risk of developing breast cancer (Gray et al., 2017).

Metals and metalloids (MMs) are metallic elements defined by a relatively high density. This group is integrated by essential trace elements (e.g., selenium) and by metals without any known physiological function (e.g., tungsten). The fundamental route of exposure in the general population is oral ingestion, followed by inhalation and dermal contact (Tchounwou et al., 2012), the latter two being particularly relevant in certain occupations, such as industry (e.g., mining, smelting, welding) (O'Neal and Zheng, 2015; Gerhardsson et al., 2002) and the military (Skalny et al., 2021). Seafood, meat and supplements are among

the main sources of exposure to copper, selenium and zinc (Lombardi-Boccia et al., 2003), whereas exposure to mercury comes essentially from fish intake, vegetables are an important source of molybdenum and nickel, and drinking water and food crops (e.g., rice) are major sources of arsenic (Spaur et al., 2023) and lead. Tobacco smoke is a major source of exposure to cadmium, and contaminated air – especially in urban and industrialized areas – is a source of cadmium and chromium (Vimercati et al., 2017). In addition, cosmetics and leather products are a source of chromium through dermal contact, which might be a neglected route of exposure to cobalt in occupational settings (Kettelarj et al., 2018).

MMs have been associated with adverse health effects such as anemia, neurotoxicity and nephrotoxicity (Jaishankar et al., 2014). Furthermore, some of them are established carcinogens. For example, chromium is a risk factor for lung cancer, nickel is associated with cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses, and arsenic potentially induces skin and urinary bladder cancer (Straif et al., 2009). MMs are also involved in the development of hormone-dependent cancers, including breast cancer (Wei and Zhu, 2019; Peng et al., 2015). However, the association with breast cancer varies greatly depending on the specific metal studied (Liu et al., 2022).

Numerous biomonitoring-based studies (often with a case-control design) have analyzed the relationship between exposure to MMs and breast cancer risk. Existent literature points essentially at cadmium, for which a positive association has been found, especially for non-dietary exposures (Florez-Garcia et al., 2023). Besides, higher serum levels of

arsenic and nickel have been associated with a higher risk of breast cancer (Moslehi et al., 2020; Yu and Zhang, 2017). In turn, zinc concentrations may be reduced in women with breast cancer (Feng et al., 2020). Similarly, breast cancer risk negatively correlates with selenium levels in serum (but not in other biological matrices) (Zhu et al., 2021). Results for copper are mixed, with some studies reporting higher serum levels in breast cancer patients than in healthy controls (Feng et al., 2020) and others reporting no significant differences between groups (Jouybari et al., 2020). No association was found between lead blood levels and breast cancer (Gaudet et al., 2019). The extent to which other metals, such as mercury or antimony, may contribute to the development of breast cancer has barely been assessed from an epidemiological perspective.

In spite of the abundance of such studies, multiple MMs lack a no observed adverse effect level (NOAEL). Yet, there is some evidence that up to 40 % of adolescents in Europe are exposed to high levels of toxicologically relevant arsenic (Govarts et al., 2023). Moreover, >10 % of adults exceed the health-based guidance values of cadmium (Govarts et al., 2023), which have not decreased over time despite the European Union regulations aimed at limiting its use (e.g., in cosmetics and electronics) (Bund, 2016). Exposure to lead could be another cause for concern, as serious adverse effects have been observed even at blood concentrations <50 ng/ml, thus making it difficult to establish minimal risk levels (Abadin et al., 2020).

In addition to the above, most studies focus on the role of individual substances, failing to address that we are simultaneously exposed to myriad environmental chemicals (Vineis and Focht, 2018). These can interact with one another, exhibiting synergistic and antagonistic effects – and metals are no exception (Lim et al., 2019). Over the last decades, the advancement of statistical methods has enabled the study of toxic exposures in environmental health through a mixture approach. One such method is quantile-based g computation (QgC), which yields unbiased estimates of the effects of mixtures, while accounting for uncertainty due to small sample sizes (Keil et al., 2020). Based on bootstrapping and Monte Carlo simulations, QgC allows to identify key mixture components, to estimate the joint effect of mixtures, and to explore non-linearity and non-additivity (Keil et al., 2020).

In this study, QgC was applied to analyze the association between exposure to a mixture of MMs and female breast cancer risk, and to determine the main components potentially influencing the mixture effect. Plasma concentrations of 16 elements were assessed in women with and without breast cancer from a multicenter prospective cohort.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

We conducted a non-matched case-control study within the EPIC-Spain cohort, included in the larger EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) study (González et al., 2004), an ongoing multicenter prospective cohort with >25 years of follow-up. Involving 23 research centers across 10 European countries, EPIC's main objective is to analyze the influence of nutritional status, lifestyle and environmental factors on the incidence, mortality and survival of cancer and other chronic diseases.

### 2.2. Study population

The EPIC-Spain cohort included 41,437 participants aged from 29 to 69 years who were enrolled between 1992 and 1996 in five provinces in Spain (Asturias, Gipuzkoa, Granada, Murcia and Navarra). Participants were mostly recruited among blood donors and represented a wide range of socioeconomic and educational backgrounds. Details on EPIC study populations and data collection can be found elsewhere (Riboli et al., 2002). Active follow-up of the EPIC cohort is performed periodically to identify new cases of cancer of any location.

Follow-up time began at the date of recruitment and incident cases were identified by linking the EPIC-Spain cohort with the Population-based Cancer Registries in the provinces where the participants resided at the time of recruitment. Data of cancer cases, including cancer site, morphology, basis of diagnosis, stage at diagnosis (according to TNM 7th edition), and date of diagnosis were obtained from those Registries. Prevalent cases (participants with any cancer diagnosis before recruitment) were excluded. The date of the end of follow-up for cases identification was December 31, 2012.

The sample in the present study consisted of 300 women with breast cancer according to the International Classification of Diseases for Oncology 3rd revision (ICD-O-3) code C50 – cases – and 300 women without breast cancer – controls – from four EPIC-Spain centers (Gipuzkoa, Granada, Murcia and Navarra). Participants with a first primary incident breast cancer were randomly selected from a pool of 643 cases identified during follow-up, with an equal number sampled from each center. Multiple primary tumors and in situ carcinomas had been previously excluded from such pool. Controls were selected through center-stratified random sampling among women who had not developed cancer by the same date.

### 2.3. Covariate assessment

Appropriately-trained interviewers administered a standardized questionnaire at baseline to gather information on lifestyle and other health-related factors. The questionnaire included items on menopausal status, reproductive history, use of oral contraceptives and hormone replacement therapy, educational level, history of tobacco smoking, alcohol consumption and physical activity (Riboli et al., 2002). Educational level was classified as none, primary school, secondary school, technical or vocational training, and university degree. Smoking status was grouped into three categories: never, former, and current smoker. Alcohol consumption in grams per day was categorized as no drinker (0 g/day), drinker  $\leq 20$  g/d, and drinker  $>20$  g/d. Information about physical activity was collected accounting for seasonal variation, and a simple four-level physical activity index – inactive, moderately inactive, moderately active, active – was created and validated using recreational activity (Peters et al., 2012).

At recruitment, height, weight, and hip and waist circumferences were measured according to standard methodology (Riboli et al., 2002). Based on their body mass index (BMI), participants were classified into normal weight ( $<25$  kg/m<sup>2</sup>), overweight (25– $<30$  kg/m<sup>2</sup>) or obese ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>).

### 2.4. Sample collection and chemical analyses

Blood samples were drawn from each participant at recruitment, mostly in fasting conditions (77.7 %). Blood samples were centrifuged and 0.5 ml plasma aliquots were stored in liquid nitrogen ( $-196$  °C). Samples were analyzed without knowing the disease status (case vs. control).

Plasma concentrations of 16 MMs were quantified: arsenic (As), beryllium (Be), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), mercury (Hg), manganese (Mn), molybdenum (Mo), nickel (Ni), lead (Pb), antimony (Sb), selenium (Se), vanadium (V) tungsten (W), and zinc (Zn). MMs were analyzed with ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) Agilent 8900 triple quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), tuned and calibrated prior to analysis. This analytical technique uses inductively coupled plasma to ionize samples for precise quantification of elements. Its advantages over conventional mass spectrometry include high sensitivity, multi-element analysis, and lower detection limits, making it particularly valuable in environmental and trace element analysis. Plasma samples were added 400 ng/ml of an internal multi-element standard solution containing scandium, germanium, iridium and rhodium. To maximize accuracy, suitable certified reference materials were used, specifically water from the USA National

Institute of Standards and Technology (NIST Trace Elements in Natural Water Standard Reference Material SRM 1640a), as well as a certified serum metal standard (Seronom Trace Elements Serum L-2, Sero, Billingstad, Norway), which was analyzed together with a blank and an intermediate calibration standard every 12 samples to ensure data validity. Additionally, 8.3 % of samples were reanalyzed at the end of each working session as quality controls. The limits of detection (LOD) ranged from 0.01 ng/ml (As, Co and W) to 18.43 ng/ml (Zn); values below the LOD were assigned the LOD divided by the square root of 2. The limits of quantification (LOQ) ranged from 0.02 ng/ml (Co) to 55.29 ng/ml (Zn). The limits of detection and quantification for each element are shown in Appendix A.

### 2.5. Statistical analysis

We conducted bivariate analyses to compare individual characteristics between breast cancer cases and controls using the Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate. Concentrations of MMs were described using the geometric mean with a 95 % confidence interval, and comparisons between cases and controls were performed using the Mann-Whitney *U* test due to the strongly asymmetric distribution of the variables. A Spearman's correlation matrix was built to examine the direction and magnitude of monotonic relationships between MMs.

Mixed-effects multivariable logistic regression models were built as an initial approach to explore associations between individual MMs and breast cancer risk. MMs with >25 % of values below the LOD (Be and Cd) were excluded from the individual analysis. All mixed-effects models were adjusted for age at recruitment, menopausal status (including an interaction term with body mass index), nulliparity, breastfeeding, use of hormone replacement therapy, body mass index, physical activity, alcohol intake, smoking status, and educational level as fixed factors, while the study center constituted the random term (intercept). To assess linear and non-linear relationships, we employed three strategies regarding the inclusion of each metal in such models: i) as a continuous variable, ii) log-transformed in base 2, and iii) categorized into quartiles.

To evaluate the metal mixture, multivariable QgC models with binominal distribution were applied (previously, the values of MMs were standardized to have mean = 0 and standard deviation = 1, and categorized into quartiles of exposure). MMs with >25 % of values below the LOD (Be and Cd) were also excluded from the mixture analysis. All QgC models were adjusted for the same covariates as in the individual-metal models, in addition to the study center. First, a model conditional on covariates was used to identify the influence of individual MMs on the mixture effect. This model assigned a positive or negative weight to each component, allowing us to evaluate the magnitude and direction of the association between MMs and breast cancer risk. Next, we attempted to analyze the joint effect of the metal mixture. After multiplying by (-1) the concentrations of MMs that had shown a negative association in the individual-metal models and/or a negative weight in the conditional model, we built a marginal structural model to estimate the population average effect, assuming linearity and additivity. To assess for non-linearity of the joint effect of the mixture in the additive scenario, a model with restricted cubic splines with 2 degrees of freedom for all elements was applied (the choice of 2 degrees of freedom relied on the hypothesis that the effect of MMs could reach a saturation point at higher levels). Then, we added restricted cubic splines and plausible interactions between MMs reported in previous research (Wang et al., 2022; Wang et al., 2018; Mérida-Ortega et al., 2022) to test for non-linear and non-additive effects of selected metals. For this analysis, we restricted MMs to those deemed as relevant in the mixture, based on their weight. Last, the metal mixture was split into essential metals, which have one or more biological functions in humans (Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V, Zn), and non-essential MMs, which do not (As, Hg, Pb, Sb, W), and we constructed a separate model for each subset of elements.

All statistical tests were two-sided and p-values <0.05 were considered significant. Analyses were conducted using Stata v17 (Stata Statistical Software: Release 17. College Station, TX: StataCorp LP) and the "qgcomp" package in R software version 4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

### 3. Results

Of the 300 cases and 300 controls initially included in the study, it was possible to determine the concentrations of MMs in 292 cases and 286 controls who had a plasma sample available. Participants had a median age at recruitment of 50.3 years (interquartile range [IQR] = 44.4–57.1 years). A considerable proportion had not reached primary school (39.6 %), and a minority were physically active or moderately active (25.8 %), with two thirds being overweight or obese (72.1 %). Most consumed alcohol (53.6 %) and were never smokers (75.4 %). In terms of obstetrics and gynecological history, nulliparity was reported by 67 participants only (11.8 %), most had a history of breastfeeding (78.2 %) and almost half of women (45.3 %) were post-menopausal. Most tumors (77.3 %) were diagnosed at early stages (TNM staging I or II). Compared to controls, cases were significantly younger – thus having a significantly higher frequency of pre-menopausal status –, and reported a significantly higher frequency of tobacco smoking and of oral contraceptive use. Table 1 depicts the baseline characteristics of breast cancer cases and controls.

The detection percentages of MMs in plasma showed high variation: whereas Be (1.2 %) and Cd (9.0 %) were seldom detected and hence excluded from the statistical analyses, the values of the other MMs were above the LOD in >75 % of samples. The geometric means were highest for Cu (845.6 ng/ml) and Zn (604.8 ng/ml) and lowest for W (0.02 ng/ml) and Pb (0.23) (Appendix B). When analyzing between-group differences, Cu concentrations were significantly higher in cases ( $p = 0.010$ ), while Zn concentrations were significantly higher in controls ( $p < 0.001$ ) (Table 2). Plasma concentrations of MMs are represented in Fig. 1. Regarding the correlation matrix (Fig. 2), the main correlations observed were: between Mn and W ( $\rho = 0.48$ ), between Hg and As ( $\rho = 0.35$ ), between Hg and Se ( $\rho = 0.34$ ) and between Ni and Sb ( $\rho = 0.34$ ).

The individual-metal analysis (Table 3 and Appendix C) found three metals significantly associated with breast cancer risk in two or more of the aforementioned strategies: Cu, Pb and V (all associations were positive). A potential possible non-linear relationship was identified for Sb (categorized into quartiles), for Se (log-transformed) and for W (categorized into quartiles).

In the metal mixture analysis, the components showing the highest positive weights were Cu (+0.42), Mn (+0.13), Sb (+0.12) and V (+0.10), whereas Zn (-0.61) and W (-0.16) showed the highest negative weights (Fig. 3). The joint effect of the metal mixture was estimated at an OR = 4.51, 95%CI = 2.32–8.79 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4). This result derived from the marginal structural model, which estimates the population average effect. In the graphical representation of the model, the second quartile is taken as the reference category. The findings of the non-linear model align with the linear model (Appendix D), providing evidence for a dose-response relationship between the mixture of MMs and breast cancer risk. No evidence of the non-linear association described for Sb, Se and W was observed in the metal mixture analysis including restricted cubic splines for each of these elements (Appendix D). Similarly, previously documented interactions between MMs (Zn–Pb, Zn–As, Sb–Cr and Sb–Pb) were not validated in our metal mixture (Appendix E). Breast cancer risk was associated with exposure to the mixture of essential MMs (OR = 3.19, 95%CI = 1.98–5.13), but not with that of non-essential MMs (OR = 1.34, 95%CI = 0.93–1.92) (Appendix F).

**Table 1**  
Baseline characteristics of breast cancer cases and controls.

Characteristic	Cases N = 286 (49.5 %)	Controls N = 292 (50.5 %)	p- value <sup>a</sup>
Center			–
Gipuzkoa	74 (25.9 %)	74 (25.3 %)	
Granada	62 (21.7 %)	70 (24.0 %)	
Murcia	75 (26.2 %)	75 (25.7 %)	
Navarra	75 (26.2 %)	73 (25.0 %)	
Stage at diagnosis			–
I	188 (69.9 %)	–	
II	20 (7.4 %)	–	
III	55 (20.4 %)	–	
IV	6 (2.2 %)	–	
Unknown	17	–	
Age group (years)			<0.001
<40	48 (16.8 %)	19 (6.5 %)	
40–49	117 (40.9 %)	100 (34.2 %)	
50–59	91 (31.8 %)	116 (39.7 %)	
≥60	30 (10.5 %)	57 (19.5 %)	
Educational level			0.838
None	111 (39.1 %)	116 (40.1 %)	
Primary school	113 (39.8 %)	109 (37.7 %)	
Secondary school	13 (4.6 %)	15 (5.2 %)	
Technical or vocational training	18 (6.3 %)	24 (8.3 %)	
University degree	29 (10.2 %)	25 (8.7 %)	
Unknown	2	3	
Recreational index			0.438
Inactive	121 (42.3 %)	125 (42.8 %)	
Moderately inactive	84 (29.4 %)	99 (33.9 %)	
Moderately active	56 (19.6 %)	50 (17.1 %)	
Active	25 (8.7 %)	18 (6.2 %)	
Waist-to-hip ratio	0.83 (0.79, 0.87)	0.82 (0.79, 0.87)	0.999
Body mass index			0.512
Normal (≥18.5 to <25 kg/m <sup>2</sup> )	85 (29.7 %)	76 (26.0 %)	
Overweight (≥25 to <30 kg/m <sup>2</sup> )	118 (41.3 %)	133 (45.5 %)	
Obese (≥30 kg/m <sup>2</sup> )	83 (29.0 %)	83 (28.4 %)	
Alcohol consumption			0.085
No drinker	123 (43.0 %)	145 (49.7 %)	
Drinker ≤20 g/d	138 (48.3 %)	133 (45.5 %)	
Drinker >20 g/d	25 (8.7 %)	14 (4.8 %)	
Smoking status			0.041
Never	203 (71.0 %)	233 (79.8 %)	
Former	35 (12.2 %)	22 (7.5 %)	
Current	48 (16.8 %)	37 (12.7 %)	
Menopausal status			<0.001
Premenopausal	156 (54.5 %)	110 (37.7 %)	
Postmenopausal	101 (35.3 %)	139 (47.6 %)	
Surgical postmenopausal	9 (3.1 %)	30 (10.3 %)	
Perimenopausal	20 (7.0 %)	30 (10.3 %)	
Nulliparous	33 (11.8 %)	34 (11.7 %)	0.999
Unknown	6	2	
Breastfeeding ever	218 (77.9 %)	227 (78.5 %)	0.922
Unknown	6	3	
Duration of breastfeeding (months)	9 (5, 18)	11 (6, 17)	0.188
Unknown	6	3	
Oral contraceptive use ever	124 (43.4 %)	95 (32.5 %)	0.009
Time under oral contraceptives (years)	2 (1, 5)	1 (1, 4)	0.041
HRT use ever	33 (11.7 %)	30 (10.9 %)	0.860
Unknown	5	17	
Time under HRT (years)	1 (1, 2)	2 (1, 3)	0.397
Unknown	7	18	

Data are presented as absolute frequency (n) and relative frequency (%) for qualitative variables, and as median and interquartile range (IQR) for quantitative variables. HRT: hormone replacement therapy.

<sup>a</sup> p-value of Chi-square test or Mann-Whitney U test, as appropriate.

## 4. Discussion

### 4.1. Main results

To our knowledge, this is among the first studies worldwide examining the association between exposure to MMs – considering the joint effect of metal mixtures – and risk of breast cancer development. The study participants showed barely detectable plasma concentrations of Be and Cd, so these chemicals could not be included in the analyses. Two MMs showed significant differences according to disease status: Cu, with higher concentrations in breast cancer cases, and Zn, with higher concentrations in controls. The results of the individual metal assessment indicated that whereas Cu, Mn, Ni, Pb and V could increase the risk of breast cancer development, Zn and W would act as protective elements. The metal mixture approach revealed that a hypothetical exposure profile with high levels of Cu, Mn, Sb, V, Ni, Cr, Se, Pb and As, combined with low levels of Zn, W, Co, Hg and Mo would increase the risk of developing breast cancer, predominantly diagnosed at early stages, by a factor of 4.5. The two MMs that showed the strongest positive and negative association were Cu and Zn, respectively, thus having the largest individual contribution to the mixture effect. This association would be subject to a dose-response relationship, as no evidence of non-linearity was found. These findings do not support the hypothesis that the association is driven by non-essential elements; instead, it was the mixture of essential MMs that was significantly associated to breast cancer risk. Moreover, contrary to previous reports of synergistic metal effects, we observed no evidence of non-additive associations.

Because breast cancer is usually characterized by an extended latency period, environmental factors influencing its development would exert a long-term effect (Hiatt et al., 2009). In this study, the time elapsed between exposure and outcome had a median of 10 years and 8 months, with an IQR from 5 years and 7 months to 13 years and 6 months. Consequently, the joint effect observed could plausibly reflect the result of a prolonged exposure to MMs.

We applied QgC, a recent methodology suitable for investigating joint effects of exposure mixtures. The mathematical development of the method involves estimating the effect on the response variable by increasing a quantile of all mixture components. However, this analytical approach may assume that all elements act as risk factors, and that an increase in each of them represents a higher risk exposure. This analytical strategy is valid for studies on air pollution, for example, where all measured pollutants are considered harmful to health. However, we think it should be adapted to each specific study based on the role of the elements constituting the mixture. In the case of MMs, it is known that some elements have physiological functions and may act as protective factors rather than risk factors for the health outcome of interest. In regard to breast cancer, previous studies suggest a protective effect of Zn (Feng et al., 2020; Pala et al., 2022), while in our single-metal analysis other elements, such as W or Mo, indicated a tentative negative association with breast cancer risk. The inclusion of MMs that act as risk factors and MMs acting as protective factors could lead to risk compensation, which may hinder the estimation of the true exposure effect. In fact, while the individual association observed with Zn and Cu is quite evident, albeit in opposite directions, a mixture model including only these two MMs resulted in a null risk (OR = 0.99; 95%CI = 0.80–1.23, data not shown) for the joint increase in both elements by one quartile.

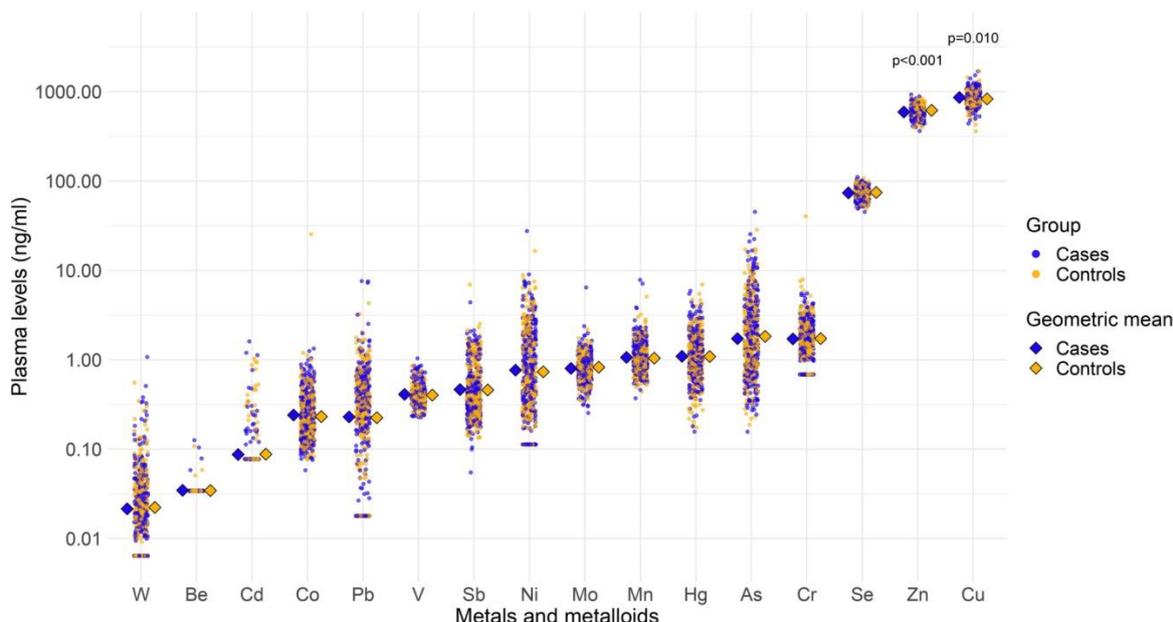
For this reason, an adaptation was introduced in our study to measure the exposure of those MMs that showed a protective effect in the individual models, as well as negative weights in the conditional model. Such modification involved multiplying the values of those elements by (–1), so that an increase by a quartile in the model be interpreted as a decrease in the degree of exposure. Consequently, this reflected an exposure where high values of potentially harmful elements coexist with low values of those that could act as protective factors. Ultimately, the association measure yielded represents the risk associated with the most

**Table 2**  
Plasma concentrations of metals and metalloids at recruitment in breast cancer cases and controls.

Metal	Cases (N = 292)				Controls (N = 286)				p-value*
	>LOD (%)	Median (ng/ml)	GM (ng/ml)	95 % CI (ng/ml)	>LOD (%)	Median (ng/ml)	GM (ng/ml)	95 % CI (ng/ml)	
As	100.0	1.61	1.72	1.53–1.94	100.0	1.63	1.83	1.64–2.04	0.348
Be	1.4	–	–	–	1.0	–	–	–	–
Cd	9.8	–	–	–	8.2	–	–	–	–
Co	100.0	0.23	0.24	0.22–0.26	100.0	0.22	0.23	0.22–0.25	0.397
Cr	85.7	1.86	1.71	1.61–1.81	89.0	1.74	1.73	1.63–1.83	0.542
Cu	89.5	868.10	861.24	842.65–880.25	100.0	834.15	830.47	813.69–847.59	0.010
Hg	100.0	1.10	1.09	1.02–1.17	100.0	1.12	1.09	1.01–1.16	0.793
Mn	100.0	0.99	1.06	1.01–1.11	100.0	1.01	1.04	1.00–1.09	0.774
Mo	100.0	0.82	0.80	0.77–0.84	100.0	0.85	0.83	0.80–0.85	0.130
Ni	100.0	0.80	0.77	0.67–0.87	90.8	0.65	0.73	0.65–0.83	0.610
Pb	85.3	0.32	0.23	0.20–0.27	84.2	0.30	0.22	0.19–0.26	0.844
Sb	100.0	0.43	0.46	0.43–0.50	100.0	0.40	0.46	0.42–0.50	0.580
Se	100.0	74.40	73.65	72.42–74.90	100.0	74.90	74.51	73.43–75.61	0.434
V	100.0	0.40	0.41	0.40–0.42	100.0	0.39	0.40	0.39–0.41	0.297
W	75.5	0.02	0.02	0.02–0.02	78.4	0.02	0.02	0.02–0.02	0.447
Zn	100.0	594.43	592.33	582.18–602.66	100.0	623.81	617.28	607.21–627.51	<0.001

As: arsenic. Be: beryllium. Cd: cadmium. CI: confidence interval. Co: cobalt. Cr: chromium. Cu: copper. GM: geometric mean. Hg: mercury. LOD: limit of detection. Mn: manganese. Mo: molybdenum. Ni: nickel. Pb: lead. Sb: antimony. Se: selenium. V: vanadium. W: tungsten. Zn: zinc.

\* p-value of Mann-Whitney U test.



**Fig. 1.** Plasma concentrations of metals and metalloids at recruitment in breast cancer cases and controls. As: arsenic. Be: beryllium. Cd: cadmium. Co: cobalt. Cr: chromium. Cu: copper. Hg: mercury. Mn: manganese. Mo: molybdenum. Ni: nickel. Pb: lead. Sb: antimony. Se: selenium. V: vanadium. W: tungsten.

unfavorable exposure profile, explaining (at least partially) its considerable magnitude.

Women in this study showed a relatively low degree of exposure to MMs, according to their plasma concentrations. To illustrate, multiple studies from different countries have quantified higher levels of Cu and Zn, along with other essential MMs like Cd and Cr (Pala et al., 2022; Kotsopoulos et al., 2012; Li et al., 2021; Bai et al., 2019; Lin et al., 2023; Mortada et al., 2020; Tu et al., 2022); this also applies to non-essential MMs, including As (Kotsopoulos et al., 2012; Li et al., 2021), Hg (Lin et al., 2023), Sb (Kotsopoulos et al., 2012) and Pb (Li et al., 2021; Lin et al., 2023). The only exceptions were Co and Se, which showed values similar to or above those usually reported (according to studies mostly conducted in non-European populations) (Kotsopoulos et al., 2012; Li

et al., 2021; Bai et al., 2019). Taken together, these findings could mean that heavily exposed populations might be at higher risk (that is, assuming a dose-response relationship), although we can only conjecture about the potential implications of alternative exposure scenarios.

Arguably, it would be preferable to compare the plasma concentrations herein observed with guidance or reference values, but this is no easy endeavor. Guidance values often refer to levels in the environment (e.g., water), to specific products (e.g., cosmetics), or to daily limits of single-source exposures (usually, ingestion or inhalation). Besides, the available minimal risk levels that have been derived for certain elements are typically defined in urine, likely because it is the most extensively studied matrix. Of note, some exceptions include: As, of which the geometric mean in plasma exceeded the US reference value <1 ng/ml in

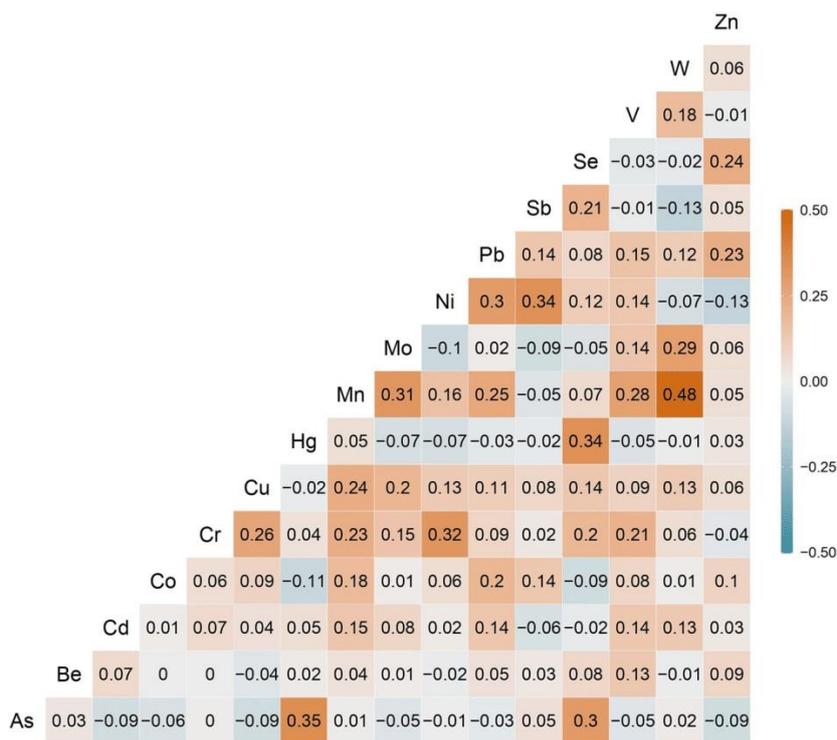


Fig. 2. Spearman's correlation matrix of metals and metalloids. As: arsenic. Be: beryllium. Cd: cadmium. Co: cobalt. Cr: chromium. Cu: copper. Hg: mercury. Mn: manganese. Mo: molybdenum. Ni: nickel. Pb: lead. Sb: antimony. Se: selenium. V: vanadium. W: tungsten. The numbers indicate the Spearman's correlation coefficient (rho) for each distinct pair of metals and metalloids.

blood (Chou et al., 2007) (but was found to be unassociated with breast cancer risk); Cu, and Zn, the plasma concentrations of which were well below the US reference values of 1146 ng/ml (Alman et al., 2022) and 1000 ng/ml in serum (Roney et al., 2005), respectively. Beyond these considerations, we think that epidemiological studies like the present one can make a two-fold contribution: to estimate the total body burden of MMs through matrices other than urine, and to help regulatory organisms to establish safe or minimal risk levels of MMs for which such thresholds have not been elucidated yet.

Recently, we systematically reviewed the relationship between exposure to mixtures of persistent substances measured in bio-monitoring studies and risk of developing any type of cancer, identifying a major gap for MMs (Fernández-Martínez et al., 2020). Fortunately, a handful of epidemiological studies have been published ever since; to our knowledge, none of them measured metals in plasma. Niehoff et al. conducted an excellent case-cohort study with a large sample size to examine the risk of breast cancer development in women from the Sister Study (USA and Puerto Rico) between 2003 and 2017, measuring exposure to 15 MMs in toenails and modelling the combined effect of metal mixtures using QgC (Niehoff et al., 2021). There was no association between metal mixtures and breast cancer risk, when considering a joint increase to all metals by one tertile. However, in the individual analysis of MMs, they reported an unexpected inverse association for Mo. Possible reasons underlying the discrepancy with our findings include the biological matrix, the strategy employed when introducing MMs in the statistical models, and the characteristics of participants in the Sister study, who were only eligible if they had a sister who had been diagnosed with breast cancer – as genetic susceptibility increases, the role of environmental factors might not be as relevant.

Besides, a case-control study assessed mixtures of 10 metals (not including Cu or Zn) in the urine of Mexican women (Mérida-Ortega et al., 2022). The authors found significant differences in the

concentrations of several metals between breast cancer cases and controls. They further identified that the principal component mixture encompassing Cr, Ni, Sb, Al, Pb and Sn was positively associated with breast cancer risk. Of them, only Sn was individually associated with a higher risk of breast cancer. Although we found a positive association for Sb in the mixture analysis, our results were generally not concordant with these findings. We believe that this was essentially due to heterogeneity in the specific metals assessed in each study; also, because the urine samples were taken after the histological confirmation of breast cancer, the temporal sequence (i.e., the exposure preceding the outcome) could not be clearly determined.

An alternative approach to biomonitoring is to use environmental measurements as a proxy for the exposure. In this vein, researchers of the Sister Study assessed whether census-tract estimates of air concentrations of 10 MMs influenced the individual risk of developing breast cancer (White et al., 2019). By means of weighted-quantile sum (WQS) regression, a weak positive association was found between the metal mixture and the risk of developing post-menopausal but not overall breast cancer. Consistent with the individual metal analysis, the elements with highest weights were Pb, Cd and Hg. Alongside substantive differences in the mixture components (Cu and Zn were not included), it should be noted that air assessments can only provide limited evidence of health effects of MMs, since diet constitutes the main route of exposure in the general population.

Acknowledging the challenges posed by studies lacking a mixture approach in terms of comparing results, we think that some of them are worth mentioning, considering the scant evidence available to answer our research question. Notably, the association between individual MMs and breast cancer has been previously examined in the EPIC study. Serum levels of 6 MMs (again, neither Cu nor Zn were included) in non-smokers from the EPIC-Florence cohort were unassociated with breast cancer risk, with the exception of Co, for which an inverse association

**Table 3**  
Mixed-effect multivariable logistic regression models analyzing individual metals and metalloids.

Metal (ng/ml)	Model	Odds Ratio	95 % CI	p-value	p-value (trend)
As	Linear	1.02	0.97–1.07	0.431	–
	log <sub>2</sub> (As)	0.97	0.82–1.14	0.691	–
	Quartile 2 (0.9–1.6)	0.62	0.31–1.22	0.163	0.610
	Quartile 3 (1.6–3.4)	0.78	0.47–1.32	0.358	–
Co	Linear	0.94	0.90–0.98	0.002	–
	log <sub>2</sub> (Co)	1.05	0.98–1.13	0.188	–
	Quartile 2 (0.2–0.2)	0.86	0.62–1.20	0.381	0.619
	Quartile 3 (0.2–0.3)	1.18	0.83–1.69	0.352	–
Cr	Linear	0.98	0.88–1.08	0.625	–
	log <sub>2</sub> (Cr)	0.98	0.79–1.21	0.842	–
	Quartile 2 (1.2–1.8)	0.80	0.68–0.95	0.010	0.666
	Quartile 3 (1.8–2.3)	1.05	0.942–1.18	0.376	–
Cu	Linear	1.19*	1.09–1.29*	<0.001	–
	log <sub>2</sub> (Cu)	2.74	1.32–5.69	0.007	–
	Quartile 2 (757.0–852.3)	1.04	0.75–1.45	0.824	<0.001
	Quartile 3 (852.3–940.1)	1.58	0.87–2.87	0.129	–
Hg	Linear	0.98	0.79–1.22	0.866	–
	log <sub>2</sub> (Hg)	0.96	0.70–1.31	0.788	–
	Quartile 2 (0.7–1.1)	0.60	0.53–0.69	<0.001	0.395
	Quartile 3 (1.1–1.6)	0.70	0.18–0.96	0.025	–
Mn	Linear	1.18	0.57–2.46	0.662	–
	log <sub>2</sub> (Mn)	1.12	0.82–1.52	0.469	–
	Quartile 2 (0.8–1.0)	1.38	0.84–2.26	0.200	0.470
	Quartile 3 (1.0–1.4)	1.00	0.61–1.63	0.995	–
Mo	Linear	1.18	0.57–2.44	0.664	–
	log <sub>2</sub> (Mo)	0.89	0.51–1.53	0.668	–
	Quartile 2 (0.7–0.8)	0.73	0.43–1.23	0.235	0.125
	Quartile 3 (0.8–1.0)	0.75	0.51–1.10	0.142	–
Ni	Linear	1.02	0.09–1.14	0.436	–
	log <sub>2</sub> (Ni)	1.05	0.48–2.29	0.902	–
	Quartile 2 (0.3–0.7)	0.88	0.55–1.40	0.585	0.112
	Quartile 3 (0.7–1.7)	1.47	1.00–2.14	0.047	–
Pb	Linear	1.21	1.08–1.35	0.001	–
	log <sub>2</sub> (Pb)	1.04	1.03–1.06	<0.001	–
	Quartile 2 (0.1–0.3)	1.07	0.88–1.31	0.497	0.051
	Quartile 3 (0.3–0.5)	1.30	0.95–1.77	0.100	–
	Quartile 4 (0.5–7.6)	1.18	1.04–1.34	0.013	–

**Table 3 (continued)**

Metal (ng/ml)	Model	Odds Ratio	95 % CI	p-value	p-value (trend)
Sb	Linear	1.03	0.94–1.12	0.548	–
	log <sub>2</sub> (Sb)	1.07	0.93–1.24	0.313	–
	Quartile 2 (0.3–0.4)	1.26	0.77–2.04	0.354	0.042
	Quartile 3 (0.4–0.7)	1.77	1.16–2.68	0.008	–
Se	Linear	1.40	0.89–2.19	0.144	–
	log <sub>2</sub> (Se)	0.99	0.99–1.00	0.111	–
	Quartile 2 (68.4–74.8)	0.66	0.43–0.99	0.043	–
	Quartile 3 (74.8–80.9)	0.83	0.53–1.30	0.414	0.876
V	Linear	0.82	0.38–1.80	0.627	–
	log <sub>2</sub> (V)	0.97	0.64–1.47	0.884	–
	Quartile 3 (0.4–0.4)	4.87	3.06–7.76	<0.001	–
	Quartile 4 (0.4–1.0)	1.57	1.38–1.77	<0.001	–
W	Linear	1.19	0.83–1.68	0.343	<0.001
	log <sub>2</sub> (W)	1.12	1.07–1.16	<0.001	–
	Quartile 2 (0.0–0.0)	1.60	1.32–1.93	<0.001	–
	Quartile 3 (0.0–0.0)	5.06	0.95–26.98	0.058	–
Zn	Linear	0.98	0.94–1.03	0.446	–
	log <sub>2</sub> (Zn)	0.93	0.52–1.68	0.818	0.045
	Quartile 2 (548.5–608.4)	0.79	0.57–1.09	0.147	–
	Quartile 3 (608.4–672.0)	0.82	0.62–1.07	0.147	–
	Linear	0.71*	0.45–1.12*	0.137	–
	log <sub>2</sub> (Zn)	0.22	0.03–1.63	0.139	–
	Quartile 2 (672.0–929.1)	0.63	0.32–1.24	0.180	0.127
	Quartile 4 (672.0–929.1)	0.37	0.11–1.21	0.098	–

As: arsenic. CI: confidence interval. Co: cobalt. Cr: chromium. Cu: copper. Hg: mercury. Mn: manganese. Mo: molybdenum. Ni: nickel. Pb: lead. Sb: antimony. Se: selenium. V: vanadium. W: tungsten. Zn: zinc. \*Odds Ratio of increasing exposure to copper and zinc by 100 ng/ml (instead of by 1 ng/ml). All mixed-effects logistic regression models were adjusted for age at recruitment, menopausal status, nulliparity, breastfeeding, use of hormone replacement therapy, body mass index, physical activity, alcohol intake, smoking status and educational level. The study center constituted the random term (intercept).

was observed (Caini et al., 2023). Nevertheless, some research has pointed at Cu and Zn, including the Cu/Zn ratio, a surrogate of oxidative stress linked to cancer development (Feng et al., 2012). Cu and Zn are necessary to maintain physiological functions, the former as it is a functional component of several enzymes, and the latter because of its catalytic, structural and regulatory functions, participating in cell signaling, proliferation and survival, among other processes (Costa et al., 2023). In agreement with our finding regarding the significant association for essential MMs, especially Cu and Zn (in both the single- and the multiple-metal models), a comprehensive meta-analysis concluded that females with breast cancer had higher Cu levels, lower Zn levels and higher Cu/Zn in serum than controls (Feng et al., 2020). Furthermore, a case-control study nested in a prospective cohort from Italy assessing prediagnostic metals levels found that the Cu/Zn ratio was associated with an almost two-fold higher risk of developing breast cancer (Pala et al., 2022).

**4.2. Mechanisms of action**

The plausibility of a positive association between mixtures of MMs

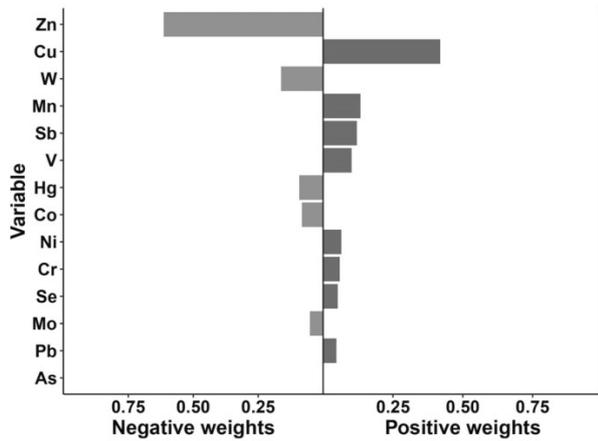


Fig. 3. Weights of individual components of the metal mixture yielded by the QgC conditional model.

As: arsenic. Co: cobalt. Cr: chromium. Cu: copper. Hg: mercury. Mn: manganese. Mo: molybdenum. Ni: nickel. Pb: lead. Sb: antimony. Se: selenium. V: vanadium. W: tungsten. Among weights, positive and negative refers to the sign of the association with breast cancer risk. The model was adjusted for center, age at recruitment, menopausal status, nulliparity, breastfeeding, use of hormone replacement therapy, body mass index, physical activity, alcohol intake, smoking status, educational level and an interaction term between menopausal status and body mass index.

and breast cancer risk relies on several carcinogenic mechanisms. Despite the antioxidant functions of some metals (e.g., Se and Zn), the most studied one is oxidative stress, characterized by an increase in reactive oxygen species (ROS) that can be toxic to nucleic acids, proteins, and lipids (Wu et al., 2016). Metal-induced carcinogenicity mediated by oxidative stress is a complex process: initially, increased levels of ROS produce genetic and epigenetic alterations, and metabolic

reprogramming, whereas decreased levels of ROS in advanced stages promote apoptosis resistance and autophagy dysfunction, leading to inflammation and angiogenesis (Wang et al., 2016; Wise et al., 2017). Besides, certain MMs exhibit genotoxic properties, causing direct DNA damage and altering the DNA repair process, which results in genomic instability (Parida and Patel, 2023). Although mutations have traditionally been considered the turning point, other molecular events such as signal transduction have gained recognition as contributing factors (Tchounwou et al., 2012). MMs can also influence cellular epigenetics by modulating the expression of essential genes through DNA methylation, histone modifications, and dysregulation of microRNAs (Wise et al., 2017; Aalami et al., 2022). Additionally, some MMs act as endocrine-disrupting chemicals (EDCs) (Luevano and Damodaran, 2014), facilitating the development of hormone-dependent cancers, including breast cancer. Last, MMs display a variety of immunotoxic effects that range from promoting inflammation to impairing the anti-tumor immune response (Guilbert et al., 2011). Yet, most of the abovementioned mechanisms have been described for individual MMs, neglecting and likely underestimating the potential health effects of metal mixtures (Wu et al., 2016).

4.3. Limitations

This study has some limitations. Firstly, although the study was based on a multicenter cohort, its modest sample size may have led to a reduced statistical power; nevertheless, we found evidence on the risk of developing breast cancer. Secondly, exposure to MMs was assessed at a single measurement. Although the exposure may not have been constant (essentially, due to modifications in the dietary pattern), metal concentrations are relatively stable over time, given their persistent and bioaccumulative nature (Ali et al., 2019). In addition, the fact that such baseline assessment preceded the outcome, by design, avoids the possibility of a reverse causality bias. Thirdly, all MMs were determined in plasma, which is not optimal for certain elements. For instance, whole blood and urine are usually the preferred biological matrices for measuring exposure to Pb and Cd, respectively (Lamkarkach et al., 2021;

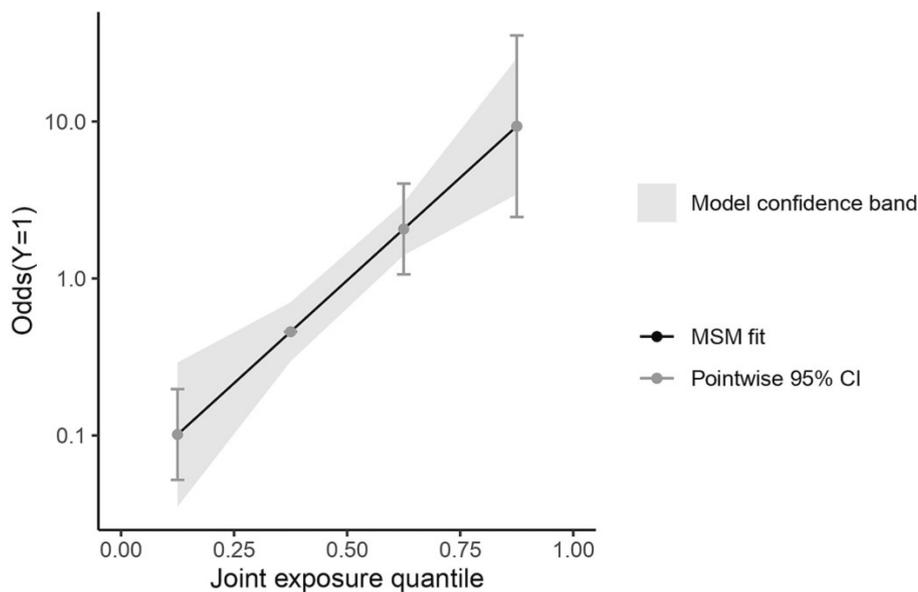


Fig. 4. Joint effect of the metal mixture yielded by the QgC marginal structural model.

In the marginal structural model (MSM), the odds ratio (Y axis) represents the population average effect of increasing the exposure to metals and metalloids with positive weights by one quartile, while decreasing the exposure to metals and metalloids with negative weights by one quartile. The model was adjusted for center, age at recruitment, menopausal status, nulliparity, breastfeeding, use of hormone replacement therapy, body mass index, physical activity, alcohol intake, smoking status, educational level and an interaction term between menopausal status and body mass index.

Martinez-Morata et al., 2023); this might explain why Cd concentrations were detected in such a low proportion of samples. Fourthly, despite having applied a valid method (QGC) to estimate the joint effect of metal mixtures, the reality of environmental exposures is far more complex, as MMs can also interact with other pollutants, such as microplastics (Lagunas-Rangel et al., 2022). Fifthly, because menopausal status was assessed at recruitment only, we were able to control for hormonal factors related with the exposure but not with breast cancer development. To overcome these limitations, we think that future studies should have large sample sizes, assess the exposure through various biological matrices and repeated measurements, and include other classes of environmental pollutants besides MMs, in order to capture a broader range of the human exposome (Dennis et al., 2016).

## 5. Conclusions

An exposure profile primarily characterized by high levels of Cu and low levels of Zn, alongside the joint action of other MMs, could lead to a significant increase in the risk of developing breast cancer in women, independent of other known risk factors. The metal mixture analysis allowed for the exploration of multiple elements in various scenarios, including non-linear and non-additive effects. However, a dose-response relationship appeared to be most plausible, and there was no evidence of synergistic effects among the selected metal combinations. In order to confirm these findings, studies on mixtures of MMs should be replicated in larger cohorts with multiple measurements over time.

## Funding

This work was supported by the Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) (Exp.: ESP21PI01) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Exp.: PI21/01295). The EPIC-Spain project was funded by the Health Research Fund (FIS) – Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Regional Governments of Andalucía, Asturias, Basque Country, Murcia and Navarra, and the Catalan Institute of Oncology – ICO (Spain). RZ-R was supported by the “Miguel Servet II” (CPII20/00009) program from the Instituto de Salud Carlos III (Co-funded by European Social Fund (ESF) investing in your future).

## Ethical approval

This paper includes human samples for the investigation. The ethical implications of the study were considered according to the principles of the Declaration of Helsinki Declaration. All participants were informed at recruitment of the objectives of the EPIC project, and they signed an informed consent. The EPIC project was approved by the ethical review boards from the International Agency for Research on Cancer (IARC) (Lyon, France). This study received the approval of the Ethics Committee of Granada, Spain (Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Granada), with code number 0852-N-21 on April 29, 2021.

## CRedit authorship contribution statement

**Nicolás Francisco Fernández-Martínez:** Formal analysis, Software, Writing – original draft. **Miguel Rodríguez-Barranco:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Software, Writing – review & editing. **José María Huerta:** Funding acquisition, Methodology, Writing – review & editing. **Fernando Gil:** Investigation, Writing – review & editing. **Pablo Olmedo:** Investigation, Writing – review & editing. **Esther Molina-Montes:** Writing – review & editing. **Marcela Guevara:** Writing – review & editing, Data curation. **Raúl Zamora-Ros:** Methodology, Writing – review & editing. **Ana Jiménez-Zabala:** Writing – review & editing. **Sandra Milena Colorado-Yohar:** Data curation, Writing – review & editing. **Eva Ardanaz:** Funding acquisition, Writing – review &

editing. **Catalina Bonet:** Methodology, Writing – review & editing. **Pilar Amiano:** Funding acquisition, Writing – review & editing. **María Dolores Chirlaque:** Funding acquisition, Writing – review & editing. **Beatriz Pérez-Gómez:** Writing – review & editing. **José Juan Jiménez-Moleón:** Writing – review & editing. **Miguel Martín-Jiménez:** Writing – review & editing. **Esperanza de Santiago:** Investigation, Writing – review & editing. **María-José Sánchez:** Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

## 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.

## Data availability

The data of this study is preserved by the EPIC-Spain research group. Data are subject to data sharing agreements and are not publicly available.

## Acknowledgements

This paper will be part of the doctoral thesis developed by Nicolas Francisco Fernández-Martínez in the Clinical Medicine and Public Health Program of the University of Granada (Spain) and directed by Dr. Maria José Sánchez and Dr. Miguel Rodríguez-Barranco. This work would not have been possible without the generous collaboration of the EPIC participants.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168816>.

## References

- Aalami, A.H., Hoseinzadeh, M., Hosseini Manesh, P., Jiryai Sharahi, A., Kargar, Aliabadi E., 2022. Carcinogenic effects of heavy metals by inducing dysregulation of microRNAs: a review. *Mol. Biol. Rep.* 49, 12227–12238. <https://doi.org/10.1007/S11033-022-07897-X>.
- Abadin, H., Taylor, J., Buser, M., Scinicariello, F., Przybyla, J., Klotzbach, J.M., et al., 2020. Toxicological Profile for Lead. U.S. Atlanta, GA.
- Ali, H., Khan, E., Ilahi, I., 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *J. Chem.* 2019 <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
- Alman, B., Fay, M., Antezana, A., Derrick, H., Chiger, A., Hall, S., et al., 2022. Toxicological Profile for Copper. U.S. Atlanta, GA.
- Bai, Y., Wang, G., Fu, W., Lu, Y., Wei, W., Chen, W., et al., 2019. Circulating essential metals and lung cancer: risk assessment and potential molecular effects. *Environ. Int.* 127, 685–693. <https://doi.org/10.1016/J.ENVIINT.2019.04.021>.
- Bund, B., 2016. Technically avoidable heavy metal contents in cosmetic products. *J. Consum. Prot. Food Saf.* 121 (12), 51–53. <https://doi.org/10.1007/S00003-016-1044-2>, 2016.
- Caini, S., Cozzolino, F., Saieva, C., Aprea, M.C., De Bonfoli Cavalcabo, N., Ermini, I., et al., 2023. Serum heavy metals and breast cancer risk: a case-control study nested in the Florence cohort of the EPIC (European prospective investigation into cancer and nutrition) study. *Sci. Total Environ.* 861. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.160568>.
- Chou, S., Harper, C., Ingerman, L., Lladós, F., Colman, J., Chappell, L., et al., 2007. Toxicological Profile for Arsenic. U.S. Atlanta, GA.
- Costa, M.I., Sarmento-Ribeiro, A.B., Gonçalves, A.C., 2023. Zinc: from biological functions to therapeutic potential. *Int. J. Mol. Sci.* 24. <https://doi.org/10.3390/IJMS24054822>.
- Dennis, K.K., Marder, E., Balshaw, D.M., Cui, Y., Lynes, M.A., Patti, G.J., et al., 2016. Biomonitoring in the era of the exposome. *Environ. Health Perspect.* 125, 502–510. <https://doi.org/10.1289/EHP474>.
- Feng, J.F., Lu, L., Zeng, P., Yang, Y.H., Luo, J., Yang, Y.W., et al., 2012. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *Int. J. Clin. Oncol.* 17, 575–583. <https://doi.org/10.1007/S10147-011-0327-Y>.
- Feng, Y., Zeng, J.W., Ma, Q., Zhang, S., Tang, J., Feng, J.F., 2020. Serum copper and zinc levels in breast cancer: a meta-analysis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 62. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2020.126629>.

- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., et al., 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. Available from: <https://gco.iarc.fr/>. (Accessed 28 March 2023).
- Fernández-Martínez, N.F., Ching-López, A., de Labry, Oly, Lima, A., Salamanca-Fernández, E., Pérez-Gómez, B., Jiménez-Moleón, J.J., et al., 2020. Relationship between exposure to mixtures of persistent, bioaccumulative, and toxic chemicals and cancer risk: a systematic review. *Environ. Res.* 188. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109787>.
- Florez-García, V.A., Guevara-Romero, E.C., Hawkins, M.M., Bautista, L.E., Jensen, T.E., Yu, J., et al., 2023. Cadmium exposure and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Environ. Res.* 219. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115109>.
- Gaudet, M.M., Deubler, E.L., Kelly, R.S., Ryan Diver, W., Teras, L.R., Hodge, J.M., et al., 2019. Blood levels of cadmium and lead in relation to breast cancer risk in three prospective cohorts. *Int. J. Cancer* 144, 1010–1016. <https://doi.org/10.1002/IJC.31805>.
- Abate, D., Abate, K.H., Abay, S.M., Abbafati, C., Abbasi, N., et al., GBD 2017 Causes of Death Collaborators GA, 2018. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)* 392, 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7).
- Gerhardsson, L., Englyst, V., Lundström, N.G., Sandberg, S., Nordberg, G., 2002. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 16, 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80055-4](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80055-4).
- González, C.A., Navarro, C., Martínez, C., Quiros, J.R., Dorronsoro, M., Barricarte, A., et al., 2004. The European prospective investigation about cancer and nutrition (EPIC). *Rev. Esp. Salud Pública* 78, 167–176. <https://doi.org/10.1590/s1135-57272004000200004>.
- Govarts, E., Gilles, L., Rodriguez Martin, L., Santonen, T., Apel, P., Alvitto, P., et al., 2023. Harmonized human biomonitoring in European children, teenagers and adults: EU-wide exposure data of 11 chemical substance groups from the HBM4EU Aligned Studies (2014–2021). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 249. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2023.114119>.
- Gray, J.M., Rasanayagam, S., Engel, C., Rizzo, J., 2017. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ. Health* 16. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0287-4>.
- Guilbert, C., Kelly, A.D.R., Petrucci, L.A., Lemaire, M., Mann, K.K., 2011. Exposure to tungsten induces DNA damage and apoptosis in developing B lymphocytes. *Leukemia* 25, 1900–1904. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.160>.
- Hiatt, R.A., Haslam, S.Z., Osuch, J., 2009. The breast cancer and the environment research centers: transdisciplinary research on the role of the environment in breast cancer etiology. *Environ. Health Perspect.* 117, 1814–1822. <https://doi.org/10.1289/EHP.0800120>.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72. <https://doi.org/10.2478/into-2014-0009>.
- Jouybari, L., Kiani, F., Islami, F., Sanagoo, A., Sayehmiri, F., Hosnedlova, B., et al., 2020. Copper concentrations in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Curr. Med. Chem.* 27, 6373–6383. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190918120209>.
- Jung, S., Wang, M., Anderson, K., Baglietto, L., Bergkvist, L., Bernstein, L., et al., 2016. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *Int. J. Epidemiol.* 45, 916–928. <https://doi.org/10.1093/IJE/DYV156>.
- Keil, A.P., Buckley, J.P., O'Brien, K.M., Ferguson, K.K., Zhao, S., White, A.J., 2020. A quantile-based g-computation approach to addressing the effects of exposure mixtures. *Environ. Health Perspect.* 128. <https://doi.org/10.1289/EHP5838>.
- Kettlerij, J., Midander, K., Lidén, C., Bottai, M., Julander, A., 2018. Neglected exposure route: cobalt on skin and its associations with urinary cobalt levels. *Occup. Environ. Med.* 75, 837–842. <https://doi.org/10.1136/OEMED-2018-105099>.
- Kotsopoulos, J., Sukiennicki, G., Muszyńska, M., Gackowski, D., Kąklewski, K., Durda, K., et al., 2012. Plasma micronutrients, trace elements, and breast cancer in BRCA1 mutation carriers: an exploratory study. *Cancer Causes Control* 23, 1065–1074. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-9975-0>.
- Lagunas-Rangel, F.A., Linnea-Niemi, J.V., Kudlak, B., Williams, M.J., Jönsson, J., Schiöth, H.B., 2022. Role of the synergistic interactions of environmental pollutants in the development of cancer. *GeoHealth* 6, e2021GH000552. <https://doi.org/10.1029/2021GH000552>.
- Lamkarkach, F., Ougier, E., Garnier, R., Viau, C., Kolossa-Gehring, M., Lange, R., et al., 2021. Human biomonitoring initiative (HBM4EU): human biomonitoring guidance values (HBM-GVs) derived for cadmium and its compounds. *Environ. Int.* 147, 106337. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106337>.
- Li, Z., Long, T., Wang, R., Feng, Y., Hu, H., Xu, Y., et al., 2021. Plasma metals and cancer incidence in patients with type 2 diabetes. *Sci. Total Environ.* 758. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143616>.
- Lim, J.T., Tan, Y.Q., Valeri, L., Lee, J., Geok, P.P., Chia, S.E., et al., 2019. Association between serum heavy metals and prostate cancer risk – a multiple metal analysis. *Environ. Int.* 132, 105109. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105109>.
- Lin, J., Lin, X., Qiu, J., You, X., Xu, J., 2023. Association between heavy metals exposure and infertility among American women aged 20–44 years: a cross-sectional analysis from 2013 to 2018 NHANES data. *Front. Public Heal.* 11. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1122183>.
- Liu, L., Chen, J., Liu, C., Luo, Y., Chen, J., Fu, Y., et al., 2022. Relationships between biological heavy metals and breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front. Nutr.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.838762>.
- Lombardi-Boccia, G., Aguzzi, A., Cappelloni, M., Di Lullo, G., Lucarini, M., 2003. Total-diet study: dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy. *Br. J. Nutr.* 90, 1117–1121. <https://doi.org/10.1079/BJN2003997>.
- Luevano, J., Damodaran, C., 2014. A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 33, 183–194. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2014011075>.
- Martinez-Morata, I., Sobel, M., Tellez-Plaza, M., Navas-Acien, A., Howe, C.G., Sanchez, T. R., 2023. A state-of-the-science review on metal biomarkers. *Curr. Environ. Heal. Rep.* <https://doi.org/10.1007/s40572-023-00402-x>.
- Mérida-Ortega, A., Rothenberg, S.J., Cebrián, M.E., López-Carrillo, L., 2022. Breast cancer and urinary metal mixtures in Mexican women. *Environ. Res.* 210. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112905>.
- Mortada, W.I., Awadalla, A., Khater, S., Ahmed, A., Hamam, E.T., El-zayat, M., et al., 2020. Copper and zinc levels in plasma and cancerous tissues and their relation with expression of VEGF and HIF-1 in the pathogenesis of muscle invasive urothelial bladder cancer: a case-controlled clinical study. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 15835–15841. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08113-8>.
- Mosleh, R., Stagnar, C., Srinivasan, S., Radziszowski, P., Carpenter, D.O., 2020. The possible role of arsenic and gene-arsenic interactions in susceptibility to breast cancer: a systematic review. *Rev. Environ. Health* 36, 523–534. <https://doi.org/10.1515/REVEH-2020-0080>.
- Niehoff, N.M., O'Brien, K.M., Keil, A.P., Levine, K.E., Liyanapitirana, C., Haines, L.G., et al., 2021. Metals and breast cancer risk: a prospective study using toenail biomarkers. *Am. J. Epidemiol.* 190, 2360–2373. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWAB204>.
- O'Neal, S.L., Zheng, W., 2015. Manganese toxicity upon overexposure: a decade in review. *Curr. Environ. Heal. Rep.* 2, 315–328. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0056-x/TABLES/2>.
- Pala, V., Agnoli, C., Cavalleri, A., Rinaldi, S., Orlandi, R., Segrado, F., et al., 2022. Prediagnostic levels of copper and zinc and breast cancer risk in the ORDET cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 31, 1209–1215. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1252>.
- Parida, L., Patel, T.N., 2023. Systemic impact of heavy metals and their role in cancer development: a review. *Environ. Monit. Assess.* 195, 766. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11399-z>.
- Peng, L., Huang, Y., Zhang, J., Peng, Y., Lin, X., Wu, K., et al., 2015. Cadmium exposure and the risk of breast cancer in Chaoshan population of southeast China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 19870–19878. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5212-1>.
- Peters, T., Brage, S., Westgate, K., Franks, P.W., Gradmark, A., Diaz, M.J.T., et al., 2012. Validity of a short questionnaire to assess physical activity in 10 European countries. *Eur. J. Epidemiol.* 27, 15–25. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9625-y>.
- Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2022. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España. <https://redcan.org/es/publicaciones> (accessed March 28, 2023).
- Riboli, E., Hunt, K.J., Slimani, N., Ferrari, P., Norat, T., Fahey, M., et al., 2002. European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Heal. Nutr.* 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1079/PHN2002394>.
- Roney, N., Smith, C., Williams, M., Osier, M., Paikoff, S., 2005. *Toxicological Profile for Zinc*.
- Schonfeld, S.J., Pfeiffer, R.M., Lacey, J.V., Berrington De González, A., Doody, M.M., Greenlee, R.T., et al., 2011. Hormone-related risk factors and postmenopausal breast cancer among nulliparous versus parous women: an aggregated study. *Am. J. Epidemiol.* 173, 509–517. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWQ404>.
- Skalny, A.V., Aschner, M., Bobrovitsky, I.P., Chen, P., Tsatsakis, A., Paoliello, M.M.B., et al., 2021. Environmental and health hazards of military metal pollution. *Environ. Res.* 201. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111568>.
- Spaur, M., Lombard, M.A., Ayotte, J.D., Bostick, B.C., Chillrud, S.N., Navas-Acien, A., et al., 2023. Cross-sectional associations between drinking water arsenic and urinary inorganic arsenic in the United States: NHANES 2003–2014. *Environ. Res.* 227. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115741>.
- Straif, K., Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., et al., 2009. A review of human carcinogens—Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 10, 453–454. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70134-2).
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS* 101, 133–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6).
- Tu, Y., Fan, G., Wu, N., Wu, H., Xiao, H., 2022. Association of plasma lead, cadmium and selenium levels with hearing loss in adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2011–2012. *Br. J. Nutr.* 128, 1100–1107. <https://doi.org/10.1017/S0007114521004335>.
- Vimercati, L., Gatti, M.F., Gagliardi, T., Cuccaro, F., De Maria, L., Caputi, A., et al., 2017. Environmental exposure to arsenic and chromium in an industrial area. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 11528–11535. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8827-6>.
- Vineis, P., Fecht, D., 2018. Environment, cancer and inequalities—the urgent need for prevention. *Eur. J. Cancer* 103, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.04.018>.
- Wang, L., Wise, J.T.F., Zhang, Z., Shi, X., 2016. Progress and prospects of reactive oxygen species in metal carcinogenesis. *Curr. Pharmacol. Rep.* 2, 178–186. <https://doi.org/10.1007/s40495-016-0061-2/FIGURES/1>.
- Wang, X., Mukherjee, B., Park, S.K., 2018. Associations of cumulative exposure to heavy metal mixtures with obesity and its comorbidities among U.S. adults in NHANES 2003–2014. *Environ. Int.* 121, 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.09.035>.

- Wang, R., Long, T., He, J., Xu, Y., Wei, Y., Zhang, Y., et al., 2022. Associations of multiple plasma metals with chronic kidney disease in patients with diabetes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 244. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.114048>.
- Wei, Y., Zhu, J., 2019. Blood levels of endocrine-disrupting metals and prevalent breast cancer among US women. *Med. Oncol.* 37. <https://doi.org/10.1007/S12032-019-1328-3>.
- White, A.J., O'Brien, K.M., Niehoff, N.M., Carroll, R., Sandler, D.P., 2019. Metallic air pollutants and breast cancer risk in a nationwide cohort study. *Epidemiology* 30, 20–28. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000917>.
- Wise, J.T.F., Wang, L., Zhang, Z., Shi, X., 2017. The 9th conference on metal toxicity and carcinogenesis: the conference overview. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 331, 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2017.04.007>.
- Wu, Y., Zhang, D., Kang, S., 2013. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 137, 869–882. <https://doi.org/10.1007/S10549-012-2396-7>.
- Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 239 (23), 8244–8259. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6333-X>, 2016.
- Yu, M., Zhang, J., 2017. Serum and hair nickel levels and breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Biol. Trace Elem. Res.* 179, 32–37. <https://doi.org/10.1007/S12011-017-0949-7>.
- Zhu, X., Pan, D., Wang, N., Wang, S., Sun, G., 2021. Relationship between selenium in human tissues and breast cancer: a meta-analysis based on case-control studies. *Biol. Trace Elem. Res.* 199, 4439–4446. <https://doi.org/10.1007/S12011-021-02574-9>.



## Anexos

**Anexo 1.** Cuestionario sobre hábitos y antecedentes personales para mujeres del estudio EPIC (cohorte EPIC-España).

**SEXO  
FEMENINO**

Consejería de Sanidad  
y Servicios Sociales.  
Asturias.

Servicio Andaluz de  
Salud. Escuela  
Andaluza de Salud  
Pública. Granada.

Departamento de  
Sanidad. Delegación de  
Salud de Gipuzkoa.

Consejería de Sanidad  
y Asuntos Sociales.  
Región de Murcia.

Departamento de  
Salud. Gobierno de  
Navarra.

Instituto de  
Investigación  
Epidemiológica y  
Clínica (IREC).  
Mataró.

# CUESTIONARIO SOBRE HABITOS Y ANTECEDENTES PERSONALES

# EPIC

## ESTUDIO PROSPECTIVO EUROPEO SOBRE DIETA CANCER Y SALUD

### IMPORTANTE:

#### LEER ANTES DE EMPEZAR A RELLENAR EL CUESTIONARIO

Antes de empezar, queremos agradecerle muy sinceramente su participación. Como ya le habrán informado, el objetivo de este estudio es conocer la relación de la alimentación con la salud. Además, a través de la información de este cuestionario, se estudiará la influencia de otros factores (como el consumo de tabaco, enfermedades y operaciones quirúrgicas, las condiciones laborales, la actividad física, etc.).

Toda la información que va a darnos es absolutamente **confidencial**, por lo tanto no debe temer que en los resultados de este estudio figure su nombre, ya que sólo se harán públicos los resultados globales (porcentajes, promedios, etc.).

El cuestionario ha sido diseñado para que usted tenga que hacer el menor esfuerzo posible en su cumplimentación. La mayoría de las respuestas exigen sólo colocar **una o varias cruces en las casillas** que correspondan a su caso.

A veces tendrá que escribir un número en una casilla, como por ejemplo, la edad que tenía cuando le ocurrió algún acontecimiento o los años en que realizó alguna actividad. Si tiene que poner un sólo número en un espacio en el que hay dos casillas, escríbalo siempre en la casilla de la derecha.

Ejemplo: Si fuma 5 cigarrillos al día, ponga

5

**SI AL CONTESTAR EL CUESTIONARIO SE ENCUENTRA CON QUE NO SABE COMO RESPONDER UNA PREGUNTA SEÑALELA Y CONSULTELO CUANDO LO ENTREGUE. NO DEJE NINGUNA PREGUNTA SIN CONTESTAR.**



## SECCION 2 ACTIVIDAD FISICA

### 1. EN EL TRABAJO

Quisiéramos saber el tipo y la cantidad de actividad física que implica su trabajo. Por favor, señale cuál de las 4 posibilidades siguientes se corresponde mejor con su **trabajo actual**: (si tiene más de 1 trabajo, indique el que más horas por semana dedica. Si está jubilado, o no trabaja actualmente, deje la pregunta en blanco).

- **Ocupación sedentaria** Usted pasa la mayor parte de su tiempo sentada (por ejemplo trabajo de oficina, etc.) . . . . .  1
- **Ocupación que implica estar de pie** Usted pasa la mayor parte de su tiempo de pie o andando. Pero su trabajo no requiere un esfuerzo físico intenso (por ejemplo, dependiente de una tienda, peluquera, guarda de seguridad, ama de casa, etc...). . . . .  2
- **Trabajo manual** Implica cierto esfuerzo físico que puede incluir el manejo de objetos pesados y la utilización de herramientas (por ejemplo, fontanero, electricista, carpintero, etc.) . . . . .  3
- **Trabajo manual pesado** Implica una actividad física muy vigorosa que incluya el manejo de objetos muy pesados (por ejemplo, estibador, albañil, minero, peón en la construcción, etc.) . . . . .  4

### 2. OTRAS ACTIVIDADES

En una semana habitual **durante el año pasado**, ¿cuántas horas por semana dedicó a cada una de las actividades siguientes? . . . . .

- a) **Caminar** (incluyendo desplazamientos al lugar de trabajo, ir de compras y tiempo de ocio) . . . . . En verano  horas por semana  
En invierno  horas por semana
  - b) **Ir en bicicleta** (incluyendo desplazamientos al lugar de trabajo, y el tiempo libre) . . . . . En verano  horas por semana  
En invierno  horas por semana
  - c) **Jardinería** . . . . . En verano  horas por semana  
En invierno  horas por semana
  - d) **Bricolaje** en casa . . . . .  horas por semana
  - e) **Ejercicio físico** (por ejemplo, fútbol, aeróbic, natación, tenis, gimnasia, etc.) . . . . . En verano  horas por semana  
En invierno  horas por semana
  - f) **Trabajo de la casa** (por ejemplo, limpiar, lavar, cocinar, cuidar de los niños, etc.) . . . . .  horas por semana
3. La práctica vigorosa de alguna de estas actividades le quita la respiración o le da palpitaciones . . . . . No  1 Si  2
- Si la respuesta es SI, ¿cuántas horas en total dedica cada semana a este tipo de actividades físicas vigorosas? . . . . .  horas por semana
4. ¿Cuántos pisos de escaleras sube cada día? . . . . .  pisos por día

## SECCION 3 CUESTIONARIO DE CONSUMO DE TABACO

1. ¿Usted fuma **actualmente**? (señale con una X la/s casilla/s que correspondan a su caso. Si fuma cigarrillos y puros deberá marcar en las dos casillas) (**Debe contestar** aunque no fume ni haya fumado nunca).

- Sí, fumo cigarrillos de forma habitual (al menos uno al día) . . . . .  1
- Sí, fumo puros de forma habitual (al menos uno a la semana) . . . . .  2
- Sí, fumo en pipa de forma habitual (al menos una a la semana) . . . . .  3
- No fumo actualmente, pero fumé tiempo atrás . . . . .  4
- No fumo actualmente, ni nunca he fumado . . . . .  5 vaya a sección 4

SI AHORA NO FUMA PERO HABIA FUMADO ANTES, POR FAVOR, VAYA AL APARTADO 2 DE EX FUMADORES. SI USTED FUMA ACTUALMENTE, CONTINUE CUMPLIMENTANDO EL APARTADO 1 DE CONSUMO ACTUAL.

### APARTADO 1: CONSUMO ACTUAL DE CIGARRILLOS

Conteste solo si fuma actualmente **de forma habitual**.

- 2. ¿Cuántos cigarrillos fuma **al día**? . . . . .
- 3. ¿Fuma habitualmente cigarrillos? (*señale con una X*)
  - Predominantemente con filtro . . . . .  1
  - Predominantemente sin filtro . . . . .  2
  - Con y sin filtro . . . . .  3
- 4. ¿Habitualmente **inhala** (se "traga") **el humo** de los cigarrillos? (*señale con una X*)
  - Sí, profundamente hasta los pulmones . . . . .  1
  - Sí, pero no profundamente . . . . .  2
  - No inhala el humo (sólo en la boca) . . . . .  3

5. Señale, por favor, ¿cuál es el **tipo** de cigarrillos que fuma habitualmente?

- Habitualmente rubio . . . . .  1  
 Habitualmente negro . . . . .  2  
 Rubio y negro . . . . .  3

6. ¿Fuma habitualmente cigarrillos **bajos en nicotina** y alquitrán (cigarrillos light o ultra light)? . . . . . No  1 Si  2

7. ¿A qué **edad** aproximada **empezó** a fumar cigarrillos de forma habitual (al menos uno al día)? . . . . . Años

8. Escriba cuántos cigarrillos por día **fumaba** habitualmente a las **edades** que se indican. Marque con una X el **tipo de tabaco** y si fumó principalmente cigarrillos con o sin **filtro**:

cuando tenía:	Número por día	Filtro			Tabaco		
		Con	Sin	Ambos	Rubio	Negro	Ambos
Unos 20 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Unos 30 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Unos 40 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Unos 50 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

**APARTADO 2: EX FUMADORES DE CIGARRILLOS**

Por favor, complete este apartado si **ha fumado cigarrillos** alguna vez en el **pasado de forma habitual**, pero **ha dejado de fumar**.

9. Si en la actualidad **NO** fuma cigarrillos, ¿a qué **edad comenzó a fumar por primera vez** en forma habitual? . . . . . Años

10. ¿A qué **edad dejó de fumar** por última vez? . . . . . Años

11. Escriba cuántos cigarrillos por día **fumaba** habitualmente a las **edades** que se indican, y marque con una X el **tipo de tabaco** y si fumó principalmente cigarrillos con o sin **filtro**:

cuando tenía:	Número por día	Filtro			Tabaco		
		Con	Sin	Ambos	Rubio	Negro	Ambos
Unos 20 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Unos 30 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Unos 40 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Unos 50 años	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

**SECCION 4 ANTECEDENTES MEDICOS Y OPERACIONES QUIRURGICAS**

Por favor, señale con una X la casilla correspondiente de la columna del "Si" aquellas enfermedades que **alguna vez un médico** le haya dicho que **sufre o ha sufrido**. En caso afirmativo escriba la **edad** aproximada que tenía usted cuando comenzó o las tuvo **por primera vez**. Debe señalar con una X la casilla "Si" o "No", según corresponda, para **todas** las enfermedades enumeradas.

*Marque con una X si ha tenido o no cada una de las enfermedades y a qué edad apareció por primera vez.*

**ENFERMEDADES**

	No	Si	Edad
1. Infarto de Miocardio (ataque al corazón) . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
2. Angina de pecho (problemas coronarios) . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
3. Ictus (Trombosis o derrame cerebral) . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
4. Otros problemas circulatorios cerebrales . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
5. Tensión (presión sanguínea) alta . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
5.1. Si es sí, recibe tratamiento por esta causa? . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	
6. Hiperlipemia (colesterol o lípidos altos en la sangre) . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
7. Diabetes (Azúcar en la sangre) . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
7.1. Si es sí, recibe tratamiento con insulina? . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	
8. Piedras en la vesícula biliar . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
8.1. Si es sí, ¿fue operada por esta causa? . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
9. Polipos en el intestino . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
10. Cáncer . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
10.1. Si es sí, especifique en qué parte del cuerpo . . . . .			<input type="text"/>

Código CIEO   
 No utilizar

	No	Si	Edad
11. Asma . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
12. Ulcera de estómago y/o duodeno . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>
12.1 Si es sí, ¿fue operada por esta causa? . . . . .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/>



- Después de 2 años . . . . .  3
- Después de 3 años . . . . .  4
- Después de 4 años . . . . .  5
- Después de 5 ó más años . . . . .  6
- Después del primer embarazo . . . . .  7
- Siempre fue irregular en los primeros 10 años . . . . .  8

5. En su **juventud**, ¿tomó algún medicamento para regularizar el ritmo de su regla? . . . . . No  1 Si  2

6. ¿A qué edad tuvo su primera relación sexual? (años)

- 
- 14 o menos 15-16 17-18 19-20 21-22 23-24 25-30 31-35 36-39 40 o más Nunca

**7. EMBARAZOS**

7.1. ¿Ha estado embarazada alguna vez? . . . . . No  1 Si  2

7.2. SI LA RESPUESTA ES NO.

¿Ha intentado alguna vez quedarse embarazada? . . . . . No  1 Si  2

Si la respuesta es **NO**, pase a la pregunta 12 de esta sección.

7.3. SI LA RESPUESTA ES SI ¿Cuál fue el resultado de su primer embarazo?

- Aborto espontáneo . . . . .  1                      Aborto voluntario o por indicación médica . . . . .  3
- Nacido muerto . . . . .  2                      Nacido vivo . . . . .  4

8. ¿Ha tenido algún aborto espontáneo? . . . . . No  1 Si  2

SI LA RESPUESTA ES SI

8.1. ¿Cuántos? . . . . .  1  2  3  4  5

1            2            3            4            5 o más

8.2. ¿Cuántas veces ha estado hospitalizada por causa de un aborto espontáneo? . . . . .  1  2  3  4  5

1            2            3            4            5 o más

8.3. ¿Qué edad tenía cuando sufrió su primer aborto espontáneo? . . . . . Años

8.4. ¿Qué edad tenía cuando sufrió su último aborto espontáneo? . . . . . Años

9. ¿Ha tenido algún aborto voluntario o por indicación médica? . . . . . No  1 Si  2

SI LA RESPUESTA ES SI

9.1. ¿Cuántos? . . . . .  1  2  3  4  5

1            2            3            4            5 o más

9.2. ¿Qué edad tenía cuando sufrió su primer aborto voluntario o por indicación médica? . . . . . Años

9.3. ¿Qué edad tenía cuando sufrió su último aborto voluntario o por indicación médica? . . . . . Años

10. ¿Ha tenido algún hijo que haya nacido muerto? (Embarazo de al menos 6 a 7 meses del que nace un niño muerto). No  1 Si  2

SI LA RESPUESTA ES SI

10.1. ¿Cuántos? . . . . .  1  2  3  4  5

1            2            3            4            5 o más

10.2. ¿Qué edad tenía cuando tuvo su primer hijo nacido muerto? . . . . . Años

10.3. ¿Qué edad tenía cuando tuvo su último hijo nacido muerto? . . . . . Años

11. ¿Ha tenido algún hijo nacido vivo? . . . . . No  1 Si  2                      ¿cuántos?

**1er. EMBARAZO DEL QUE HA NACIDO UN NIÑO VIVO**

1. ¿Qué edad tenía entonces? . . . . . Edad

2. ¿Cuántos niños nacieron en este parto?  
Si tuvo más de uno (gemelos, trillizos, etc.) indique el número según el sexo . . . . . Varón(es)  Mujer(es)

3. ¿Les dio el pecho? . . . . . No  1 Si  2

4. Si lo hizo, ¿durante cuánto tiempo?

<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 9	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 11
1	2-3	4-5	6-7	2	3	4-5	6-7	8-9	10-11	12 o más
(semanas)				(meses)						

**2o. EMBARAZO DEL QUE HA NACIDO UN NIÑO VIVO**

1. ¿Qué **edad** tenía entonces? . . . . . Edad

2. ¿Cuántos niños nacieron en este parto?  
Si tuvo más de uno (gemelos, trillizos, etc.) indique el número según el sexo . . . . . Varón(es)  Mujer(es)

3. ¿Les dio el **pecho**? . . . . . No  Si

4. Si lo hizo, ¿durante cuánto **tiempo**?  
             
 1 2-3 4-5 6-7 2 3 4-5 6-7 8-9 10-11 12 o más  
 (semanas) (meses)

**3er. EMBARAZO DEL QUE HA NACIDO UN NIÑO VIVO**

1. ¿Qué **edad** tenía entonces? . . . . . Edad

2. ¿Cuántos niños nacieron en este parto?  
Si tuvo más de uno (gemelos, trillizos, etc.) indique el número según el sexo . . . . . Varón(es)  Mujer(es)

3. ¿Les dio el **pecho**? . . . . . No  Si

4. Si lo hizo, ¿durante cuánto **tiempo**?  
             
 1 2-3 4-5 6-7 2 3 4-5 6-7 8-9 10-11 12 o más  
 (semanas) (meses)

**RESPONDA SOLO SI HA TENIDO MAS DE 3 HIJOS**

**ULTIMO EMBARAZO DEL QUE HA NACIDO UN NIÑO VIVO**

1. ¿Qué **edad** tenía entonces? . . . . . Edad

2. ¿Cuántos niños nacieron en este parto?  
Si tuvo más de uno (gemelos, trillizos, etc.) indique el número según el sexo . . . . . Varón(es)  Mujer(es)

3. ¿Les dio el **pecho**? . . . . . No  Si

4. Si lo hizo, ¿durante cuánto **tiempo**?  
             
 1 2-3 4-5 6-7 2 3 4-5 6-7 8-9 10-11 12 o más  
 (semanas) (meses)

12. ¿Ha visitado alguna vez a un médico por problemas de **infertilidad (no poder tener hijos)**? . . . . . No  Si
- 12.1. Si ha contestado que sí, ¿le ha dicho alguna vez el médico que tenía problemas de infertilidad (esterilidad)? . . . . . No  Si
- 12.2. ¿Ha tomado alguna vez **medicamentos** para tratar un problema de infertilidad? . . . . . No  Si
- 12.3. ¿Le han **operado** a causa de la infertilidad? . . . . . No  Si

**SECCION 6 ANTICONCEPTIVOS Y TERAPIA HORMONAL SUSTITUTORIA**

**1. USO DE ANTICONCEPTIVOS ORALES**

1.1. ¿Ha tomado alguna vez anticonceptivos orales (la píldora para control del embarazo o por otra razón)? . . . . . No  Si

SI HA CONTESTADO QUE SI

1.2. ¿Cuánto **tiempo "total"** la ha estado tomando? (sume todo el tiempo que haya estado tomando la píldora, sin contar los períodos de abandono de la toma de la píldora).  
 (años)                 
 1 o menos 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 o más

1.3. ¿Qué **edad** tenía cuando **empezó** a tomar la píldora?  
                
 14 o menos 15-16 17-18 19-20 21-22 23-24 25-26 27-28 29-30 31-35 36-40 41 o más

1.4. ¿Toma actualmente la píldora? . . . . . No  Si

SI LA RESPUESTA ES NO

1.5. ¿A qué **edad dejó** de tomar la píldora? . . . . . Edad

**2. OTROS ANTICONCEPTIVOS**

2.1. ¿Le han puesto alguna vez **inyecciones** anticonceptivas (para no quedarse embarazada o por otro motivo) . . . . . No  Si

SI LA RESPUESTA ES SI

2.2. ¿Qué **edad** tenía cuando se la pusieron por **primera** vez? . . . . . Edad

2.3. ¿Durante **cuántos años** aproximadamente le han puesto inyecciones anticonceptivas? . . . . . Años

2.4. ¿Qué **edad** tenía cuando se la pusieron por **última** vez? . . . . . Edad

2.5. ¿Ha usado alguna vez un **dispositivo intrauterino (DIU)**? . . . . . No  Si

2.6. ¿Está utilizando un DIU actualmente? . . . . . No  Si

**3. TRATAMIENTO SUSTITUTIVO CON HORMONAS (TRATAMIENTO PARA LA MENOPAUSIA)**

3.1. ¿Ha tomado o toma hormonas (estrógenos/progestágenos) para el tratamiento de la **menopausia**? . . . . . No  1 Si  2

SI LA RESPUESTA ES NO, PASE A LA SIGUIENTE SECCION

SI LA RESPUESTA ES SI

3.2. ¿Durante **cuánto tiempo** (en años) ha tomado hormonas para el tratamiento de la menopausia?

1     2     3     4     5     6     7     8     9     10     11     12     13     14     15  
 Menos de 6 meses    De 6 meses a 1 año    2    3    4    5    6    7    8    9    10    11    12    13    14    14 o más

3.3. ¿Cuántos **años** tenía cuando **empezó** a tomar hormonas para el tratamiento de la menopausia?

1     2     3     4     5     6     7     8     9     10     11     12     13     14     15     16  
 40 ó menos    41    42    43    44    45    46    47    48    49    50    51    52    53    54    55 ó más

3.4. ¿Está tomando **actualmente** hormonas para el tratamiento de la menopausia? . . . . . No  1 Si  2

3.5. ¿De qué **forma** ha tomado o está tomando las hormonas para el tratamiento de la menopausia? (*haga una X en la/s casilla/s que correspondan a su caso*)

- Vía oral (en forma de píldora) . . . . .  1
- Vía intramuscular (inyección) . . . . .  2
- Subcutánea (por implantación bajo la piel) . . . . .  3
- Por cremas (vaginales o directamente en la piel) . . . . .  4
- Apósitos adhesivos aplicados en la piel (parches) . . . . .  5

3.6. ¿Podría escribir el nombre del **medicamento** que **está tomando actualmente** para el tratamiento de la menopausia?

.....

Código	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
No utilizar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3.7. ¿Son estas las **únicas** hormonas que ha tomado para el tratamiento de la menopausia? . . . . . No  1 Si  2

**SECCION 7 OCUPACION**

Si **actualmente desempeña o ha desempeñado alguna vez**, como mínimo **durante un año**, alguna de las ocupaciones que figuran a continuación, por favor, márkuelas. (No están todas las ocupaciones posibles, sólo algunas. Si usted no ha trabajado en ninguna de ellas, déjelo en blanco.)

- |   |  |
|---|--|
| 1.1. Ganadera o criadora . . . . . <input type="checkbox"/> 1                   | 9. Industria del vidrio . . . . . <input type="checkbox"/> 19          |
| 1.2. Agricultora o granjera . . . . . <input type="checkbox"/> 2                | 10. Imprenta, artes gráficas . . . . . <input type="checkbox"/> 20     |
| Marque si ha empleado alguna vez pesticidas                                     | 11. Transportes . . . . . <input type="checkbox"/> 21                  |
| o herbicidas . . . . . <input type="checkbox"/> 3                               | SI ES SI, TRABAJO DE:  |
| ¿Cuándo trabajó en la agricultura?  | — Conductora de camión . . . . . <input type="checkbox"/> 22           |
| — Solamente antes de 1960 . . . . . <input type="checkbox"/> 4                  | — Conductora de taxi o autobús . . . . . <input type="checkbox"/> 23   |
| — Antes, después o sólo después de 1960. . . . . <input type="checkbox"/> 5     | 12. Industria nuclear . . . . . <input type="checkbox"/> 24            |
| 2. Industria Química . . . . . <input type="checkbox"/> 6                       | 13. Industria papelera . . . . . <input type="checkbox"/> 25           |
| SI ES SI, TRABAJO EN:   | 14. Producción de cementos con   |
| — Refinería . . . . . <input type="checkbox"/> 7                                | asbesto (fibrocemento) . . . . . <input type="checkbox"/> 26           |
| — Tintes . . . . . <input type="checkbox"/> 8                                   | 15. Producción de aislantes  |
| — Laboratorio . . . . . <input type="checkbox"/> 9                              | asbesto/amianto . . . . . <input type="checkbox"/> 27                  |
| 3. Industria Goma/Caucho . . . . . <input type="checkbox"/> 10                  | 16. Fabricación de cemento . . . . . <input type="checkbox"/> 28       |
| 4. Industria Textil . . . . . <input type="checkbox"/> 11                       | 17. Fabricación de cerámica . . . . . <input type="checkbox"/> 29      |
| SI ES SI, TRABAJO EN:   | 18. Carnicería . . . . . <input type="checkbox"/> 30                   |
| — Tintes . . . . . <input type="checkbox"/> 12                                  | 19. Peluquera . . . . . <input type="checkbox"/> 31                    |
| — Preparación de fibras o tejidos . . . . . <input type="checkbox"/> 13         | 20. Trabajadora de Gasolinera . . . . . <input type="checkbox"/> 32    |
| 5. Industria de pieles y curtidos . . . . . <input type="checkbox"/> 14         | 21. Camarera de bar . . . . . <input type="checkbox"/> 33              |
| 6. Fabricación de zapatos y marroquinería . . . . . <input type="checkbox"/> 15 | 22. Trabajadora de Restaurante . . . . . <input type="checkbox"/> 34   |
| 7. Industria de la madera . . . . . <input type="checkbox"/> 16                 | 23. Médicos o Servicios de Salud . . . . . <input type="checkbox"/> 35 |
| SI ES SI, TRABAJO EN:   | (Ej.: Enfermera, laboratorio, etc.)                                    |
| — Fabricación de muebles . . . . . <input type="checkbox"/> 17                  |  |
| 8. Industria eléctrica/electrónica . . . . . <input type="checkbox"/> 18        |  |

*Este estudio está coordinado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC-OMS) y auspiciado por el Programa de Europa contra el Cáncer de la Comunidad Europea (CE), el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) y las Comunidades Autónomas participantes.*

**Anexo 2.** Límites de detección y de cuantificación de los metales pesados y semimetales (MPS) estudiados en esta tesis doctoral.

MPS	Límite de detección (ng/ml)	Límite de cuantificación (ng/ml)
As	0,01	0,04
Be	0,05	0,14
Cd	0,11	0,33
Co	0,01	0,02
Cr	0,97	2,91
Cu	0,22	0,66
Hg	0,06	0,19
Mn	0,10	0,29
Mo	0,04	0,12
Ni	0,16	0,48
Pb	0,03	0,08
Sb	0,02	0,05
Se	0,43	1,28
V	0,03	0,08
W	0,01	0,03
Zn	18,43	55,29

### **Anexo 3.** Código de Stata y de R empleado para el análisis multivariante de metales pesados y semimetales (MPS) considerados individualmente.

#### *Codebook*

cc: desenlace de estudio (caso vs. control).

age\_recr: edad al reclutamiento.

l\_school: nivel educativo.

pa\_recr: nivel de actividad física.

bmi\_dic: índice de masa corporal dicotomizado (normopeso, sobrepeso/obesidad).

menopause: estatus menopáusico.

alc\_re: consumo de alcohol.

smoke\_stat: tabaquismo.

n\_preg: número de embarazos.

feed: antecedente de lactancia materna.

hormen: tratamiento con terapia hormonal sustitutiva.

Model: tipo de modelo (lineal, log-lineal o categórico).

#### *Modelos lineales - Stata*

```
foreach x of varlist As-Zn {  
xtlogit cc 'x' age_recr l_school pa_recr bmi_dic##i.menopause alc_re i.smoke_stat n_preg feed  
hormen, or vce(robust)  
}
```

#### *Modelos log-lineales (log<sub>2</sub>) - Stata*

\*Tras aplicar transformacion logarítmica en base 2 a los elementos\*

```
foreach x of varlist log2As-log2Zn {  
xtlogit cc 'x' age_recr l_school pa_recr bmi_dic##i.menopause alc_re i.smoke_stat n_preg feed  
hormen, or vce(robust)  
}
```

### *Modelos categóricos (cuartiles) - Stata*

\*Tras categorizar los elementos en cuartiles\*

```
foreach x of varlist perAs-perZn {  
  xtlogit cc i.'x' age_recr l_school pa_recr bmi_dic##i.menopause alc_re i.smoke_stat n_preg feed  
  hormen, or vce(robust)  
}
```

\*Para obtener el valor p de la tendencia\*

```
foreach x of varlist perAs-perZn {  
  xtlogit cc 'x' age_recr l_school pa_recr bmi_dic##i.menopause alc_re i.smoke_stat n_preg feed  
  hormen, or vce(robust)  
}
```

### *Representación gráfica - R*

# Cargar paquetes requeridos

```
library(rio)
```

```
library(dplyr)
```

```
library(tidyr)
```

```
library(ggplot2)
```

# Importar tabla con los resultados de los modelos de STATA

```
resultados <- import("db/base_modelos_stata.xlsx")
```

# Asegurar formato correcto de la odds ratio y los límites de sus intervalos de confianza al 95%

```
resultados$OR <- as.numeric(resultados$OR)
```

```
resultados$OR.LL <- as.numeric(resultados$OR.LL)
```

```
resultados$OR.UL <- as.numeric(resultados$OR.UL)
```

# Figura con modelos lineales

```
resultados_lineal <- ors %>% filter(Model=="linear")
```

```
ggplot(resultados_lineal, aes(x = Model, y = OR, shape = Model, color = Model))+
```

```
  geom_hline(yintercept = 1, color = "grey25", alpha = 0.6, linewidth = 1, linetype = 'dashed')+
```

```
  scale_y_continuous(  
    trans = "log2",
```

```
    limits = c((1/8)/sqrt(2), 8*sqrt(2)),
```

```
    breaks = c(0.25, 1, 4),
```

```
    labels = c("0,25", "1", "4"))+  
  
```

```
  
```

```

geom_point(size = 2.5) +
scale_shape_manual(values = c(15), labels = c("Lineal"))+
scale_color_manual(values = c( "#024687"), labels = c("Lineal"))+
geom_errorbar(aes(ymin = OR.LL, ymax = OR.UL),
              width = 0.075,
              linewidth = 0.8)+
facet_wrap(~Metal, ncol = 7)+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(size = 16),
      axis.text.y = element_text(size = 13, color = "grey5"),
      axis.text.x = element_blank(),
      axis.ticks.x = element_blank(),
      panel.grid.major.y = element_line(linewidth = 1),
      panel.grid.minor.y = element_line(linewidth = 1),
      panel.grid.major.x = element_blank(),
      panel.grid.minor.x = element_blank(),
      strip.text = element_text(size = 14),
      legend.position = 'none',
      legend.title = element_text(size = 16),
      legend.text = element_text(size = 15))+
labs(x = NULL, y = 'Odds Ratio (IC 95%)')

# Figura con modelos log-lineales
resultados_log <- ors %>% filter(Model=="log")
ggplot(resultados_log, aes(x = Model, y = OR, shape = Model, color = Model))+
geom_hline(yintercept = 1, color = "grey25", alpha = 0.6, linewidth = 1, linetype = 'dashed')+
scale_y_continuous(
  trans = "log2",
  limits = c((1/8)/sqrt(2), 8*sqrt(2)),
  breaks = c(0.25, 1, 4),
  labels = c("0,25", "1", "4"))+
geom_point(size = 2.5) +
scale_shape_manual(values = c( 17), labels = c(bquote(log[2]))))+
scale_color_manual(values = c( "#FF6600"), labels = c(bquote(log[2]))))+
geom_errorbar(aes(ymin = OR.LL, ymax = OR.UL),
              width = 0.075,
              linewidth = 0.8)+

```

```

facet_wrap(~Metal, ncol = 7)+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(size = 16),
      axis.text.y = element_text(size = 13, color = "grey5"),
      axis.text.x = element_blank(),
      axis.ticks.x = element_blank(),
      panel.grid.major.y = element_line(linewidth = 1),
      panel.grid.minor.y = element_line(linewidth = 1),
      panel.grid.major.x = element_blank(),
      panel.grid.minor.x = element_blank(),
      strip.text = element_text(size = 14),
      legend.position = 'none',
      legend.title = element_text(size = 16),
      legend.text = element_text(size = 15))+
labs(x = NULL, y = 'Odds Ratio (IC 95%)')

# Figura con modelos categoricos (cuartiles)
resultados_cat <- ors %>% filter(Model=="Q2" | Model=="Q3" | Model=="Q4")
ggplot(resultados_cat, aes(x = Model, y = OR, shape = Model, color = Model))+
  geom_hline(yintercept = 1, color = "grey25", alpha = 0.6, linewidth = 1, linetype = 'dashed')+
  scale_x_discrete(labels = c("C2", "C3", "C4"))+
  scale_y_continuous(
    trans = "log2",
    limits = c((1/8)/sqrt(2), 8*sqrt(2)),
    breaks = c(0.25, 1, 4),
    labels = c("0,25", "1", "4"))+
  geom_point(size = 2.5) +
  scale_shape_manual(values = c(16,16,16), labels = c("C2", "C3", "C4"))+
  scale_color_manual(values = c("#109618", "#109618", "#109618"), labels = c("C2", "C3", "C4"))+
  geom_errorbar(aes(ymin = OR.LL, ymax = OR.UL),
    width = 0.15,
    linewidth = 0.8)+
facet_wrap(~Metal, ncol = 7)+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(size = 16),
      axis.text = element_text(size = 13, color = "grey5"),
      panel.grid.major.y = element_line(linewidth = 1),

```

```
panel.grid.minor.y = element_line(linewidth = 1),
panel.grid.major.x = element_blank(),
panel.grid.minor.x = element_blank(),
strip.text = element_text(size = 14),
legend.position = 'none',
legend.title = element_text(size = 16),
legend.text = element_text(size = 15) )+
labs(x = NULL, y = 'Odds Ratio (IC 95%)')
# El valor p de la tendencia se puede añadir con la función geom_label() del paquete 'ggplot2'.
```

## **Anexo 4.** Código de R empleado para el análisis multivariante de las mezclas de metales pesados y semimetales (MPS).

### *Codebook*

cc: desenlace de estudio (caso vs. control).

age\_recr: edad al reclutamiento.

l\_school: nivel educativo.

pa\_recr: nivel de actividad física.

bmi\_dic: índice de masa corporal dicotomizado (normopeso, sobrepeso/obesidad).

menopause: estatus menopáusico.

alc\_re: consumo de alcohol.

smoke\_stat: tabaquismo.

n\_preg: número de embarazos.

feed: antecedente de lactancia materna.

hormen: tratamiento con terapia hormonal sustitutiva.

### *Pasos comunes*

```
# Cargar paquetes requeridos
```

```
library(rio)
```

```
library(dplyr)
```

```
library(tidyr)
```

```
library(qgcomp)
```

```
library(splines)
```

```
# Importar datos
```

```
Data <- import("db/base_datos.Rdata")
```

```
# Almacenar interaccion entre indice de masa corporal y estatus menopausico en una variable
```

```
Data <- Data %>%
```

```
  mutate(menopause_dic = as.numeric(case_when(
```

```
    menopause=="Premenopausica" ~ "0",
```

```
    menopause=="Postmenopausica" ~ "1",
```

```
    menopause=="Perimenopausica" ~ "1",
```

```
    menopause=="Postmenopausica quirurgica" ~ "1")
```

```

)) %>%
mutate (interac_bmi_menop = bmi_dic*menopause_dic)

# Recodificar numero de embarazos
Data <- Data %>%
mutate(
  preg_recod = as.numeric(case_when(
    n_preg==0 ~ "1",
    n_preg>=1 ~ "0",
    TRUE ~ "9"
  )))

# Normalizar valores de MPS (media=0, sd=1)
Data <- Data %>%
mutate_at(c(14:27), ~scale(.)[, 1])

# Seleccionar coexposicion de interes junto con las covariables de ajuste
Xnm <- c('As', 'Co', 'Cr', 'Cu', 'Hg', 'Mn', 'Mo', 'Ni', 'Pb', 'Sb', 'Se', 'V', 'W', 'Zn')
covars <- c('centro', 'age_recr', 'l_school', 'pa_recr', 'bmi_dic', 'menopause_dic', 'interac_bmi_menop',
           'alc_re', 'smoke_stat', 'preg_recod', 'feed', 'hormen')

```

### *Estimación del peso de cada componente de la mezcla*

```

# Modelo condicional
options(scipen = 999)
set.seed(1425)
cond_model <- qgcomp.noboot(cc ~ ., expnms = Xnm,
                           data=Data[, c(Xnm, covars, 'cc')], family = binomial(), q = 4)
cond_model

# Representacion grafica de los pesos
plot(cond_model)

```

### *Estimación del efecto conjunto de la mezcla*

```
# Multiplicar por (-1) los valores de MPS con peso negativo
```

```
Data$Zn <- (-1) * Data$Zn
```

```
Data$W <- (-1) * Data$W
```

```
Data$Hg <- (-1) * Data$Hg
```

```
Data$Co <- (-1) * Data$Co
```

```
Data$Mo <- (-1) * Data$Mo
```

```
# Estimar el efecto conjunto de la mezcla suponiendo linealidad y aditividad
```

```
msm_model <- qgcomp.boot(cc ~ ., expnms = Xnm, data = Data[, c(Xnm, covars, 'cc')],  
                        family = binomial(), rr = FALSE,  
                        q = 4, B = 500, MCsize = 10000, parallel = TRUE,  
                        seed = 1425)
```

```
msm_model
```

```
# Representacion grafica del modelo
```

```
plot(msm_model, suppressprint = TRUE, flexfit = FALSE,  
     pointwiseref = 2) # Por defecto, el cuartil 2 es el de referencia
```

```
# Estimar el efecto conjunto de la mezcla evaluando no linealidad
```

```
# Este modelo de ejemplo incluye splines cubicas restringidas para todos los elementos
```

```
msm_model_nonlin <- qgcomp.boot(cc ~ bs(As) + bs(Co) + bs(Cr) + bs(Cu) + bs(Hg) + bs(Mn) +  
                                bs(Mo) + bs(Ni) + bs(Pb) + bs(Sb) + bs(Se) + bs(V) + bs(W) +  
                                bs(Zn) + centro + age_recr + l_school + pa_recr + bmi_dic +  
                                menopause_dic + interac_bmi_menop + alc_re +  
                                smoke_stat + preg_recod + feed + hormen,  
                                expnms = Xnm, data = Data[, c(Xnm, covars, 'cc')],  
                                family = binomial(), rr = FALSE,  
                                q = 4, B = 500, degree = 2, MCsize = 10000, parallel = TRUE,  
                                seed = 1425)
```

```
msm_model_nonlin
```

```
# Estimar el efecto conjunto de la mezcla evaluando no linealidad y no aditividad
```

```
# Este modelo de ejemplo incluye la interaccion entre Zn y As
```

```
msm_model_nonadd <- qgcomp.boot(cc ~ Zn*As +  
                                As + Co + Cr + Cu + Hg + Mn + Mo + Ni + Pb + Sb + Se + V +  
                                W + Zn + centro + age_recr + l_school + pa_recr + bmi_dic +  
                                menopause_dic + interac_bmi_menop + alc_re +
```

```

smoke_stat + preg_recod + feed + hormen,
expnms = Xnm, data = Data[, c(Xnm, covars, 'cc')],
family = binomial(), rr = FALSE,
q = 4, B = 500, degree = 2, MCsize = 10000, parallel = TRUE,
seed = 1425)

msm_model_nonadd

# Estimar el efecto de las mezclas de MPS esenciales y no esenciales
# Dividir la mezcla original en dos mezclas en función de si sus componentes son o no esenciales
Xnm_e <- c('Co', 'Cr', 'Cu', 'Mn', 'Mo', 'Ni', 'Se', 'V', 'Zn') # Elementos esenciales
Xnm_noe <- c('As', 'Hg', 'Pb', 'Sb', 'W') # Elementos no esenciales

# Estimar el efecto conjunto de la mezcla de elementos esenciales
msm_model_e <- qgcomp.boot(cc ~ ., expnms = Xnm_e, data = Data[, c(Xnm_e, covars, 'cc')],
family = binomial(), rr = FALSE,
q = 4, B = 500, MCsize = 10000, parallel = TRUE,
seed = 1425)

msm_model_e

# Estimar el efecto conjunto de la mezcla de elementos no esenciales
msm_model_noe <- qgcomp.boot(cc ~ ., expnms = Xnm_noe, data = Data[, c(Xnm_noe, covars, 'cc')],
family = binomial(), rr = FALSE,
q = 4, B = 500, MCsize = 10000, parallel = TRUE,
seed = 1425)

msm_model_noe

```