

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL VÍA PLACENTARIA A
COMPUESTOS QUÍMICOS MEDIOAMBIENTALES CON
ACTIVIDAD HORMONAL**

**MOTHER-INFANT EXPOSURE TO ENVIRONMENTAL
CHEMICAL COMPOUNDS WITH HORMONAL ACTIVITY
VIA THE PLACENTA**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en
Ciencias Ambientales la Licenciada MARÍA JOSÉ LÓPEZ ESPINOSA**

D. NICOLÁS OLEA SERRANO, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Medicina Física del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Coordinador de Investigación del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.

CERTIFICA: Que **Dña. MARÍA JOSÉ LÓPEZ ESPINOSA**, Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL VÍA PLACENTARIA A COMPUESTOS QUÍMICOS MEDIOAMBIENTALES CON ACTIVIDAD HORMONAL** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 28 de Marzo de 2006

Dña. FÁTIMA OLEA SERRANO, Doctora en Farmacia, Catedrática de Nutrición y Bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que **Dña. MARÍA JOSÉ LÓPEZ ESPINOSA**, Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL VÍA PLACENTARIA A COMPUESTOS QUÍMICOS MEDIOAMBIENTALES CON ACTIVIDAD HORMONAL** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 28 de Marzo de 2006

D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Medicina Física del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Jefe del Departamento de Radiología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.

CERTIFICA: Que Dña. **MARÍA JOSÉ LÓPEZ ESPINOSA**, Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL VÍA PLACENTARIA A COMPUESTOS QUÍMICOS MEDIOAMBIENTALES CON ACTIVIDAD HORMONAL** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 28 de Marzo de 2006

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

VICENTE PEADRAZA MURIEL, Director del Departamento de Radiología
y Medicina Física de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en Ciencias
Ambientales Dña. MARÍA JOSÉ LÓPEZ ESPINOSA en el Departamento
de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

Granada, 28 de Marzo de 2006

Fdo. Prof. Dr. Vicente Pedraza Muriel

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título **EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL VÍA PLACENTARIA A COMPUESTOS QUÍMICOS MEDIOAMBIENTALES CON ACTIVIDAD HORMONAL**, ha sido presentada por la **Lda. María José López Espinosa** para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Ambientales, habiendo sido dirigida por, **D. Nicolás Olea Serrano**, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física, **Dña. Fátima Olea Serrano**, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología y **D. Vicente Pedraza Muriel**, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

Granada, 28 de Marzo de 2006

Fdo. María José López Espinosa

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias al apoyo de:

- Proyecto Europeo del V Programa Marco nº QLRT-1999-01422 titulado "INCREASING INCIDENCE OF HUMAN MALE REPRODUCTIVE HEALTH DISORDERS IN RELATION TO ENVIRONMENTAL EFFECTS ON GROWTH-AND SEX STEROID-INDUCED ALTERATIONS IN PROGRAMMED DEVELOPMENT".
- Proyecto Europeo del V Programa Marco nº QLRT-2001-00603 titulado "EDEN- ENDOCRINE DISRUPTERS: EXPLORING NOVEL ENDPOINTS, EXPOSURE, LOW-DOSE AND MIXTURE-EFFECT IN HUMANS, AQUATIC WILDLIFE AND LABORATORY ANIMALS".
- Red de Investigación Cooperativa de Grupos de ISCIII "INFANCIA Y MEDIOAMBIENTE (INMA)".

Se agradece, igualmente, la ayuda recibida de la Fundación Hospital Clínico de Granada.

La doctoranda María José López Espinosa ha sido becada por la Secretaría General de Universidades e Investigación de la Junta de Andalucía, en el Programa de Personal Docente e Investigador en las Universidades y Centros de Investigación en Andalucía.

A mis padres

A mi hermana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES	4
1.2. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES CON CAPACIDAD DISRUPTORA ENDOCRINA.....	9
1.2.1. Identificación de disruptores endocrinos (DE)	11
1.2.2. Pesticidas organoclorados con actividad disruptora endocrina.....	14
1.2.2.1. DDT e isómeros/metabolitos	15
1.2.2.2. Endosulfán y derivados	18
1.2.2.3. Aldrín, dieldrín y endrín.....	21
1.2.2.4. Hexaclorobenceno.....	22
1.2.2.5. Hexaclorociclohexano.....	24
1.2.2.6. Mirex.....	25
1.2.2.7. Metoxicloro.....	25
1.2.3. Biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto.....	27
1.3. EXPOSICIÓN ALIMENTARIA A COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE).....	29
1.3.1. Productos lácteos	30
1.3.2. Frutas y verduras.....	32
1.3.3. Carne.....	33
1.3.4. Pescado	34
1.3.5. Agua	35
14. EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL A COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPs) DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE).....	37
1.4.1. Exposición transplacentaria	37
1.4.2. La placenta como biomarcador de exposición.....	41
1.4.3. Vulnerabilidad del embrión/feto a la exposición a disruptores endocrinos (DE)	42
1.4.4. Exposición del niño	45
1.4.4.1. Lactancia materna	45
1.5. FACTORES QUE CONDICIONAN Y CONSECUENCIAS DE LA EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL A COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPS) DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE).....	49
1.5.1. Lugar de residencia.....	49
1.5.2. Exposición ocupacional de la madre.....	52
1.5.3. Exposición ocupacional del padre	54
1.5.4. Prematuridad.....	55
1.5.5. Bajo peso al nacer y retardo en el crecimiento fetal intrauterino.....	57
1.5.6. Abortos espontáneos.....	59
1.5.7. Malformaciones	61
1.5.7.1. Criptorquidia.....	62
1.5.7.2. Hipospadia	65
1.5.7.3. Espina bífida y anencefalía	66
1.5.7.4. Efectos sobre el desarrollo del cerebro	66
2. OBJETIVOS.....	73

3. MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. MATERIAL	77
3.1.1. Material para conservación y extracción de muestras	77
3.1.1.1. Cámara fría y congeladores	77
3.1.1.2. Pipetas automáticas	78
3.1.1.3. Rotavapor	78
3.1.1.4. Balanzas	78
3.1.1.5. Disolventes	78
3.1.1.6. Compuestos químicos patrones	78
3.1.1.7. Otro material	79
3.1.2. Instrumentación químico-analítica	79
3.1.2.1. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)	79
3.1.2.2. Cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE)	79
3.1.2.3. Cromatógrafo de gases/masas (CG/EM)	79
3.1.3. Cultivos celulares	80
3.1.3.1. Tests biológicos E-Screen y YES	80
3.2. MÉTODOS	82
3.2.1. Diseño del estudio	82
3.2.1.1. Población potencialmente elegible	82
3.2.1.2. Población de estudio	82
3.2.2. Muestras analizadas	83
3.2.3. Metodología químico analítica	84
3.2.3.1. Extracción de las muestras	84
3.2.3.2. Determinación de lípidos totales	85
3.2.3.3. Purificación de las muestras mediante HPLC	86
3.2.3.4. Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE)	87
3.2.3.5. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)	88
3.2.4. Metodología biológica	90
3.2.4.1. Test biológico E-Screen	90
3.2.4.2. Test biológico YES	92
3.2.5. Análisis epidemiológico y estadístico	94
3.2.5.1. Variables de la madre	95
3.2.5.2. Variables del padre	101
3.2.5.3. Variables del niño	101
3.2.5.4. Variables del análisis químico	102
3.2.5.5. Variables del análisis biológico	102
3.2.5.6. Análisis de datos	103
4. RESULTADOS	107
4.1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	107
4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ANÁLISIS UNIVARIADO	108
4.2.1. Características de la madre	108
4.2.1.1. Edad	108
4.2.1.2. Características antropométricas	110
4.2.1.3. Características sociodemográficas	114
4.2.1.4. Características reproductivas de la madre	117
4.2.1.5. Antecedentes clínicos	120
4.2.1.6. Hábitos de consumo de alcohol, tabaco y otro tipo de drogas	122
4.2.1.7. Estilo de vida y exposición durante el embarazo	123
4.2.1.8. Resultados obtenidos referentes a aspectos relacionados con la dieta	128
4.2.2. Características del padre	133
4.2.2.1. Edad	133
4.2.2.2. Características sociodemográficas	134

4.2.3. Características del niño.....	137
4.2.3.1. Características antropométricas	137
4.2.3.2. Características del parto.....	141
4.3. NIVELES DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ANÁLISIS UNIVARIADO.....	146
4.3.1. Pesticidas organoclorados en muestras de tejido placentario.....	148
4.3.1.1. Resultados estadísticos para los valores de DDT y metabolitos en tejido placentario	148
4.3.1.2. Resultados estadísticos para los valores de endosulfán-I, endosulfán-II y metabolitos en tejido placentario.....	149
4.3.1.3. Resultados estadísticos para los valores de aldrín, endrín y dieldrín en las muestras de tejido placentario.....	150
4.3.1.4. Resultados estadísticos para los valores de lindano, mirex, metoxicloro y HCB en tejido placentario.....	151
4.3.1.5. Resultados estadísticos sobre el número de pesticidas detectados en tejido placentario.....	152
4.3.1.6. Correlación entre niveles de pesticidas detectados en muestras de tejido placentario	154
4.4. ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL Y/O TÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN. ANÁLISIS UNIVARIADO.....	158
4.4.1. Carga estrogénica total efectiva en muestras de tejido placentario.....	158
4.4.1.1. Resultados estadísticos para la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa.	159
4.4.1.2. Resultados estadísticos para la carga estrogénica total efectiva en la fracción beta.....	159
4.4.1.3. Correlación entre la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa y en la fracción beta en muestras de tejido placentario.....	160
4.5. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA EXPOSICIÓN A PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS BIVARIADO	161
4.5.1. Características de la madre	161
4.5.1.1. Edad	161
4.5.1.2. Índice de masa corporal antes del embarazo	172
4.5.1.3. Ganancia de peso durante el embarazo	183
4.5.1.4. Lugar de residencia	194
4.5.1.5. Nivel de estudios.....	202
4.5.1.6. Actividad laboral.....	212
4.5.1.7. Paridad	229
4.5.1.8. Hábito tabáquico durante el embarazo	240
4.5.1.9. Hábitos alimentarios	248
4.5.2. Características del padre	276
4.5.2.1. Nivel de estudios.....	276
4.5.2.2. Actividad laboral.....	284
4.5.3. Características del niño.....	300
4.5.3.1. Peso al nacer	300
4.5.3.2. Índice ponderal.....	310
4.5.3.3. Perímetro cefálico	319
4.5.3.4. Edad gestacional	329
4.5.3.5. Tipo de parto	343
4.5.3.6. Estación del año	350
4.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DEL CUESTIONARIO Y LA EXPOSICIÓN A PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS MULTIVARIADO.....	358
4.6.1. Características de la madre	358
4.6.1.1. Edad de la madre e índice de masa corporal	359
4.6.1.2. Edad de la madre y ganancia de peso.....	362
4.6.1.3. Edad de la madre y paridad.....	366
4.6.1.4. Edad de la madre y hábito tabáquico	370

4.6.1.5. Índice de masa corporal y ganancia de peso.....	374
4.6.1.6. Índice de masa corporal y lugar de residencia.....	378
4.6.1.7. Índice de masa corporal y paridad.....	382
4.6.1.8. Índice de masa corporal y hábito tabáquico	385
4.6.1.9. Ganancia de peso y lugar de residencia.....	389
4.6.1.10. Ganancia de peso y paridad.....	393
4.6.1.11. Ganancia de peso y hábito tabáquico	397
4.6.1.12. Lugar de residencia y actividad laboral durante el embarazo.....	401
4.6.1.13. Actividad laboral y percepción de la exposición a productos químicos	404
4.6.1.14. Lugar de residencia y paridad.....	408
4.6.1.15. Lugar de residencia y hábito tabáquico	413
4.6.2. Características del niño	417
4.6.2.1. Peso del niño y edad gestacional.....	417
4.6.2.2. Índice ponderal del niño y edad gestacional.....	421
4.7. ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL Y/O TÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO MEDIANTE EL ENSAYO YEAST ESTROGEN SCREEN (YES) Y COMPARACIÓN CON LA OBTENIDA EN EL ENSAYO E-SCREEN	425
4.7.1. Características de la población de estudio.....	426
4.7.2. Resultados del análisis estadístico.....	429
4.7.2.1. Resultados del análisis estadístico para la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa en el ensayo E-Screen y YES	429
4.7.2.2. Resultados estadísticos para la carga estrogénica total efectiva en la fracción beta en el ensayo E-Screen y YES.....	430
4.7.2.3. Correlación entre la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa y beta en muestras de tejido placentario mediante el ensayo E-Screen y YES.....	431
4.7.3. Análisis bivariado.....	432
4.7.3.1. Presencia/ausencia de estrogenicidad en ambos ensayos: Tablas de contingencia.....	432
4.7.3.2. Valores de estrogenicidad obtenidos en ambos ensayos: Test de Mann-Whitney.....	433
4.7.3.3. Valores de estrogenicidad obtenidos en ambos ensayos: Test de Spearman	434
5. DISCUSIÓN	439
6. SUMMARY	489
6.1. INTRODUCTION	490
6.2. MATERIAL AND METHODS.....	494
6.2.1. Participants and data collection.....	494
6.2.2. Sampling and sample preparation of placentas	494
6.2.3. Reagents	495
6.2.4. Apparatus	495
6.2.4.1. High-performance liquid chromatography (HPLC)	495
6.2.4.2. Gas chromatography and electron-capture detection (GC/ECD)	495
6.2.4.3. Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS)	496
6.2.5. Sample extraction.....	496
6.2.6. Lipid determination.....	497
6.2.7. Chemical analysis by chromatography.....	497
6.2.8. Quantitative evaluation of estrogenicity of placenta extracts.....	497
6.2.8.1. E-Screen	497
6.2.8.2. Yeast Estrogen Screen (YES).....	498
6.2.9. Statistical analysis	499
6.2.9.1. Chemical analysis.....	499
6.2.9.2. Biological analysis	500
6.3. RESULTS.....	502

6.3.1. Characteristics of mothers	502
6.3.2. Characteristics of newborns.....	504
6.3.3. Characteristics of fathers	505
6.3.4. Assessment of exposure to organochlorine pesticides of mother-infant pairs	505
6.3.4.1. Number of pesticides per placenta	505
6.3.4.2. Residues of DDTs in placenta extracts	507
6.3.4.3. Residues of endosulphans in placenta extracts	509
6.3.4.4. Residues of aldrin, endrin and dieldrin in placenta extracts.....	510
6.3.4.5. Residues of lindane, methoxychlor, mirex and HCB in placenta extracts	511
6.3.5. Association between maternal/pregnancy variables and organochlorine pesticides	512
6.3.5.1. Association between characteristics of the study population and the number of pesticides per sample	512
6.3.5.2. Association between characteristics of the study population and exposure to DDTs	515
6.3.5.3. Association between characteristics of the study population and endosulphan exposure....	521
6.3.5.4. Association between characteristics of the study population and exposure to aldrin, endrin, dieldrin.....	528
6.3.5.5. Association between characteristics of the study population and exposure to lindane, methoxychlor, mirex and HCB	533
6.3.6. Assessment of the total effective xenoestrogen burden (TExB) due to chemical residues in placenta.....	538
6.3.6.1. Levels of total effective xenoestrogen burden of alpha in placenta	538
6.3.6.2. Levels of total effective xenoestrogen burden of beta in placenta	539
6.3.7. Assessment of the association between maternal and pregnancy variables and the total effective xenoestrogen burden.....	539
6.3.7.1. Association between population characteristics and TEXB-alpha exposure	539
6.3.7.2. Association between population characteristics and TEXB-beta exposure	542
6.3.8. Comparison of two methods for the assessment of the Total effective xenoestrogen burden in placentas	545
6.3.8.1. Characteristics of the population.....	545
6.3.8.2. Statistical analysis	547
6.4. DISCUSSION.....	554
7. CONCLUSIONS.....	569
8. BIBLIOGRAFÍA	575
9. ANEXO.....	609

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

“...Los libros y revistas normalmente leídos por las madres no hablan sobre temas medioambientales. Ninguno de ellos menciona la exposición materna a pesticidas, solventes o residuos químicos tóxicos. Hay una total desconexión entre lo que se conoce científicamente y lo que es presentado a las mujeres embarazadas sobre la vida prenatal de sus hijos.....” “Existen campañas educativas que animan a tomar suplementos de ácido fólico para disminuir la probabilidad de que los niños tengan espina bífida. Las mujeres embarazadas son instruidas rutinariamente para que no beban alcohol, no fumen, y no consuman drogas.”..... “Aconsejar a las futuras madres a tomar vitaminas y prohibir el alcohol, cigarrillos y drogas es crucial. Pero desafortunadamente, sus hijos están amenazados por muchas sustancias dañinas que incluso la madre más cuidadosa no puede evitar mientras está embarazada...” (Steingraber, 2001; Massey, 2002).

1.1. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES

El Programa sobre Medio Ambiente de Naciones Unidas (UNEP) ha identificado un total de doce sustancias químicas orgánicas persistentes (COPs), la *docena sucia*, con objetivo de proceder a su eliminación global de acuerdo con el contenido del Tratado de Estocolmo, firmado en Mayo de 2001 (United Nations Environment Programme, 2002). Nueve de estas sustancias son pesticidas organoclorados, cuyos nombres más conocidos para identificarlos son: aldrín, endrín, dieldrín, DDT, clordano, heptacloro, hexaclorobenceno, toxafeno y mirex. La lista se completa con dioxinas, furanos y bifenilos policlorados (PCBs). El tratado no descarta añadir nuevas sustancias que son consideradas como COPs debido a su persistencia en el medio ambiente, bioacumulación y capacidad de forma natural de ser transportadas a lugares lejanos. Así por ejemplo, hay un amplio consenso en que algunos de los pesticidas que están en uso en países industrializados, como por ejemplo el lindano y el endosulfán, se ajustan a los criterios para ser considerados como COPs, por lo que muy posiblemente se incluyan próximamente en la lista de los COPs.

El Convenio de Estocolmo establece la eliminación de la producción y uso de aldrín, clordano, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y toxafeno, la restricción en la producción y uso del DDT y la reducción de las emisiones intencionadas desde fuentes antropogénicas de los subproductos tipo dioxinas y furanos. Además, establece las condiciones en las que estos compuestos deben ser eliminados y señala la relación de planes de aplicación de cada país, que se revisarán de forma periódica, constituyendo así un programa eficiente de eliminación y control de los compuestos orgánicos persistentes.

Desde que España firmó en mayo de 2001 el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, aun no lo ha ratificado y se siguen dando situaciones anacrónicas como, por ejemplo, el uso del DDT como intermediario en la fabricación de dicofol, compuesto químico fabricado ya solamente en cinco países: Brasil, China, India, Israel y España. España es así el único productor europeo de dicofol, con una producción anual de 1500 Tm, en la empresa Montecinca (Huesca) (Greenpeace y Ecologistas en Acción, 2003),

que precisa de la síntesis previa de DDT como producto base para la transformación en dicofol.

El nombre de COPs, revela algunas de las características de estas sustancias (Thornton, 2000):

La C de “contaminante”, significa que los COPs son tóxicos. Incluso en pequeñas concentraciones alteran los procesos biológicos normales, y pueden provocar cáncer, supresión del sistema inmune, e interferir con las funciones del cerebro, fertilidad y desarrollo fetal, como se verá en la revisión presentada en los apartados siguientes de esta introducción.

La O significa “orgánico”, es decir, todos los miembros de esta familia tienen un esqueleto de carbón, lo cual también significa que son más o menos solubles en grasa. Se trata de compuestos que una vez emitidos al medio ambiente en pequeñas cantidades, son incorporados en las fracciones grasas de plantas y animales donde se almacenan. Este fenómeno explica, por otra parte, que la principal ruta de exposición de los humanos sea la cadena alimentaria. Algunos COPs, entre ellos los pesticidas de interés para este trabajo, poseen además uno o varios átomos de cloro, lo que les hace incluso más solubles en grasa. No es coincidencia pues, que todos los compuestos incluidos en este tratado sean organoclorados.

La P de “persistente” significa que poseen una larga vida media. Pocos organismos tienen los enzimas necesarios para metabolizar estos compuestos por lo que son resistentes a la degradación. Esta característica conlleva varias consecuencias. La primera es que el organismo acumula compuestos más rápidamente que los elimina. Teóricamente, cuantos más años tiene un individuo, más cantidad de COPs puede haber acumulado. Además, como la vida media de los COPs normalmente excede la vida de una generación humana (veinte o treinta años), los COPs pasan a través de la madre al hijo durante el embarazo y lactancia. Existen estudios que asocian la edad de la madre con la cantidad de pesticidas organoclorados transmitidos al hijo. En nuestro país, en un estudio llevado a cabo en Huelva, hace ahora más de diez años, las madres de mayor edad presentaron niveles superiores de DDT en leche, como corresponde al haber estado en contacto por más tiempo con un medio ambiente

contaminado (Martínez et al., 1993). Además, correlaciones positivas entre la edad de la madre y los niveles de DDE en sangre de cordón, se han descrito en estudios llevados a cabo en Canadá y Bélgica (Rhainds et al., 1999; Covaci et al., 2002). En la India, Saxena et al., (1981a) descubrieron que las mujeres embarazadas con edades menores o iguales a 25 años tenían menores niveles de pesticidas en su sangre que las de mayor edad. En otros estudios realizados en países tan dispares como India y Alemania, los niveles de residuos de pesticidas organoclorados encontrados en la sangre de recién nacidos se relacionaron también con la edad de la madre (Siddiqui et al., 1981; Lackmann et al., 1996; Lackmann et al., 1999). Asociaciones que se han ido confirmando en otros trabajos realizados en Polonia, Italia y México, que también encontraron un incremento con la edad en los niveles de pesticidas organoclorados (OCs) en tejido adiposo de las madres (Ludwicki & Goralczyk, 1994; Gallelli et al., 1995; Waliszewski et al., 1998; Waliszewski et al., 2000a). La paridad, también ha sido relacionada en algunos estudios con los niveles de pesticidas encontrados en las madres. En estudios realizados en EE.UU. y la India, donde se tenían datos de la historia de lactancia, se vio que los niveles de pesticidas OCs más elevados eran encontrados en las primíparas al compararlas con mujeres que ya habían dado el pecho con anterioridad (Rogan et al., 1986a; Nair et al., 1996). En el estudio brasileño de Sarcinelli et al., (2003); los niveles de p,p'-DDE en sangre de las madres primíparas eran más altos que en multíparas y en un estudio en México, el factor de paridad indicaba un ligero descenso en los valores de DDE y DDT en muestras de tejido adiposo, aunque no era estadísticamente significativo (Waliszewski et al., 2000a).

Sin embargo, existen otros estudios en los que no se ha visto correlación entre el contenido de pesticidas organoclorados en muestras de leche o sangre de cordón umbilical y la edad de la madre; tal es el caso de un estudio llevado a cabo en Croacia en el que se analizaron niveles de p,p'-DDE en muestras de leche y sangre de cordón umbilical (Krauthacker et al., 1980) y en otro estudio llevado a cabo en Brasil en el que tampoco se vio relación entre los niveles de DDE en sangre de cordón umbilical y la edad de la madre (Sarcinelli et al., 2003).

Sea como fuere, lo cierto es que la O y la P juntas (longevidad más solubilidad en grasa) significa que los COPs se biomagnifican en la cadena alimentaria. En sistemas acuáticos, el factor de concentración en el recorrido del plancton al hombre puede alcanzar un valor de un millón. Los animales localizados en la cima de la cadena alimentaria, como la especie humana, son los que poseen un mayor riesgo de exposición. Como ejemplo de capacidad de biomagnificación está el bien estudiado DDT, pesticida que cuando se aplica sobre una extensión de cultivo suele encontrarse en una concentración baja en las plantas, mientras que en los insectos que se alimentan de ellas se acumula en concentraciones diez veces mayor. Si el insecto resiste al DDT puede servir de alimento a las ranas, por ejemplo. De ser así, la concentración en el anfibio alcanza valores 100 veces mayores a los de las plantas. Las rapaces que se comen a las ranas llegan a alcanzar concentraciones 1000 veces mayores. De esta manera se produce una magnificación de las concentraciones hasta alcanzar sus máximos en las especies que ocupan los lugares más altos de las cadenas tróficas, como es el caso del hombre.

El hecho de que todos los habitantes del planeta lleven COPs en sus tejidos grasos, sólo puede ser explicado si se tiene en cuenta otra de sus características, la semivolatilidad. Esto significa que los COPs se evaporan lentamente cuando el tiempo es cálido y se condensan rápidamente cuando la temperatura disminuye. De esta forma los COPs viajan desde zonas tropicales hasta las zonas más frías. Semivolatilidad más resistencia a la degradación en la atmósfera significa que los COPs se acumulan en zonas situadas más al norte. Efectivamente, el Ártico es su destino final, lugar donde permanecen durante muchos años. Estudios en el Ártico de Canadá mostraron que los insecticidas y herbicidas persistían de 3 a 8 veces más tiempo a bajas temperaturas que a temperaturas cálidas (Canadian Institute of Child Health, 2000). Siempre se creyó que el Ártico estaba demasiado lejos para verse afectado por los contaminantes medioambientales resultantes de las actividades industriales y agrícolas en cualquier parte del mundo, hasta que un artículo publicado hace veinte años alertó de lo contrario (Wong, 1986). Desde entonces, la evidencia de múltiples recursos ha confirmado la presencia de contaminantes

medioambientales en especies tradicionalmente consumidas por nortehños y son la prueba de que muchas de estas sustancias están siendo transportadas a largas distancias a través de la atmósfera y el agua (Jensen et al., 1997; AMAP, 1998). Entre estos contaminantes se incluyen metales y radionúclidos, además de compuestos organoclorados. A finales de los años 80, trabajos realizados en el Norte de Quebec demostraron que los niveles de PCBs en la leche humana de las madres aborígenes eran 5 veces más altas que las encontradas en la población no aborigen en el sur de la provincia (Dewailly et al., 1989). Una valoración preliminar fue llevada a cabo en una comunidad del Ártico donde la comida tradicional cuenta con una alta proporción de mamíferos marinos (Kinloch et al., 1992). Este estudio demostró que los niveles de PCBs en sangre excedían los 5 µg/l en el 39% de las mujeres en edad reproductiva que consumía pescado y animales salvajes, habitualmente. En un estudio más reciente sobre presencia de COPs en las mujeres y sus recién nacidos en los territorios de Noroeste de Canadá y Nunavut se ha confirmado la presencia de estos compuestos en todas las mujeres y los niveles de algunos de los organoclorados fueron encontrados en mayor proporción en la población Inuit que consumía, como parte de su dieta habitual, mamíferos marinos (Butler et al., 2003).

La semivolatilidad es una razón más por la que las Naciones Unidas han tomado la decisión de prohibir el uso de estas sustancias, que empleadas en algunos países son transportadas a otros bien lejos. Los COPs no entienden de fronteras.

La buena noticia es que existe la posibilidad de reemplazar la mayoría de los COPs. De hecho, han dejado de utilizarse en muchos de los países industrializados tras su sustitución por otros compuestos o por prácticas más sostenibles. Se ha aducido, no obstante, que el problema radica en que muchas naciones pobres no tienen recursos para reemplazarlos y se ven obligadas a su empleo. Este es un asunto muy discutido pero que encontraría una solución eficaz con una llamada a la solidaridad entre países.

1.2. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES CON CAPACIDAD DISRUPTORA ENDOCRINA

El sistema endocrino funciona a través de la secreción interna de mensajeros químicos- las hormonas- que son liberadas por un órgano en concreto al torrente circulatorio y acceden por vía sanguínea a los órganos diana de su acción. Estos contienen células que suelen presentar receptores específicos que se acoplan a la hormona, desencadenándose, sólo entonces, el efecto deseado.

Algunos COPs de muy diferente estructura química pueden actuar sobre la homeostasis hormonal de tal manera que el efecto disruptor endocrino (DE) de muchos compuestos orgánicos persistentes organoclorados (COPs) ha sido puesto de manifiesto en las últimas décadas en muy diferentes sistemas y órganos (Gocmen et al., 1989; Soto et al., 1994; Soto et al., 1995; Cummings & Metcalf, 1995b; Steinmetz et al., 1996; Kelce & Wilson, 1997).

Los disruptores endocrinos pueden sabotear cada uno de los procesos en que se basa la acción hormonal: pueden mimetizar la hormona ocupando su lugar, bloquear su acción compitiendo por el receptor hormonal, o modificar la síntesis de la hormona o del receptor, provocando, en última instancia, una alteración del equilibrio hormonal que puede causar desde problemas neurológicos a reproductivos, ya que las hormonas están implicadas en el control de la reproducción, la coordinación entre órganos, la organización del cerebro y el metabolismo, entre otras muchas funciones (Olea et al., 2003).

Aunque cualquier sistema hormonal es susceptible de ser dañado, lo cierto es que los primeros compuestos exógenos o xenobióticos identificados se comportaban como estrógenos, es decir, interfieren con la hormona femenina estradiol, imitando o bloqueando su acción natural. La potencia estrogénica de estos compuestos es muy variable y abarca desde mimetizadores tan potentes como el mismo estradiol a débiles agonistas que tan sólo tienen actividad parcial, ocurriendo a muy altas concentraciones. Todo esto ha conducido a que esta clase de moléculas sean agrupadas bajo el nombre genérico de xenoestrógenos, denominación que engloba a todos aquellos compuestos que manifiestan

actividad estrogénica en ensayos *in vitro* e *in vivo* independientemente de su estructura química, procedencia y aplicaciones (Olea & Olea-Serrano, 1996).

La inmensa mayoría de los individuos de las poblaciones occidentales contienen en su organismo cantidades apreciables de COPs con actividad DE. Esta contaminación, que abarca a todos los sectores de la población, es un hecho de especial relevancia desde la perspectiva de la salud humana. Lo habitual es encontrar un 80-90% de los individuos con niveles detectables de uno o varios de estos compuestos, incluso los recién nacidos, pues el acúmulo de estos compuestos en el tejido graso durante la vida de la madre supone una fuente de exposición para el hijo, tanto durante la gestación como a través de la lactancia (Sala et al., 2001; Campoy et al., 2001a; Cerrillo et al., 2005a).

Al tratarse de una exposición tan extendida pero con niveles considerados bajos de contaminantes, se ha sugerido que si bien el riesgo de enfermedad puede ser menor, el riesgo atribuible no es desdeñable ya que el número de individuos expuestos es muy alto. Aunque no hay evidencia de que esto sea así, tampoco hay completa seguridad de que el efecto a largo plazo, de todo este conjunto de sustancias que están en nuestro ambiente, sea desdeñable.

Los disruptores endocrinos llegan hasta nuestro organismo a través de una exposición ambiental “de fondo” y posiblemente a dosis muy bajas. La vía de entrada es fundamentalmente, a través de la dieta, aspecto que se tratará en un apartado posterior de esta introducción. En un estudio publicado en el año 2002, en el que se investigaron los niveles de (OCs) en sangre de cordón umbilical, en Canadá en el periodo 1993 a 2001, se pudo computar que la disminución en la concentración de OCs en el medio ambiente jugaba un papel crucial en la disminución de los mismos en la población, incluso cuando se trataba de dos poblaciones con edades, hábitos alimentarios y estilos de vida diferentes (Dallaire et al., 2002).

En España la carencia de estudios representativos de zonas geográficas amplias y bien definidas que valoren la exposición humana a agentes químicos ambientales en población sana, donde se integren datos de análisis químicos de estos compuestos, junto con los datos clínicos, epidemiológicos y ambientales, indujo a nuestro grupo a desarrollar una línea de investigación a este respecto

que se ha visto recompensada por la publicación de numerosos trabajos y la realización de tesis doctorales (Brotons, 1994; Villalobos et al., 1995; Olea & Olea-Serrano, 1996; Pérez-Gómez, 1996; Pazos et al., 1998; Jimenez, 2000; Rivas et al., 2001; López-Navarrete, 2001; Campoy et al., 2001a; Campoy et al., 2001b; Castillo et al., 2002; Botella et al., 2004; Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2004; Olmos, 2005; Carreño, 2005; Cerrillo et al., 2005b; López-Espinosa et al., 2006a). El trabajo que ahora se presenta se encuadra en este marco de actuaciones y aborda de forma global la exposición en un grupo de población de alto riesgo, el binomio madre-hijo.

1.2.1. IDENTIFICACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE)

El tipo de sustancias químicas disruptores hormonales es muy diverso y va desde productos químicos sintetizados por el hombre, hasta sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos. La diversidad estructural de los DE hace imposible predecir *a priori* si una molécula estará o no dotada de capacidad hormonal.

Se ha sugerido, que los disruptores endocrinos presentan características particulares que los hacen distintos a otros tóxicos medio ambientales y que condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad entre exposición y enfermedad (Colborn et al., 1993; Ohi, 1999). Esta forma especial de toxicidad podría deberse a que:

1. El momento de la exposición es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto. Los efectos son distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto. Si actúan durante un periodo crítico, como por ejemplo en los estadios tempranos de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, pueden producirse lesiones irreversibles.

2. Los efectos pueden no aparecer en el momento de la exposición. Los efectos inducidos pueden permanecer latentes durante años o hacerse patentes en la descendencia en lugar de en los individuos expuestos.

3. No existe un umbral de concentración preciso para el desarrollo del efecto toxicológico, o al menos, ese nivel de concentración es distinto al

reconocido como límite de seguridad para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.

4. Es posible la acción combinada de tal manera que los DE pueden actuar conjuntamente y que su efecto se traduzca en una acción sinérgica, antagónica o aditiva.

La Comunidad Europea dispone de un listado de 600 sustancias caracterizadas como disruptores endocrinos, entre las que se encuentran los bifenilos policlorados o PCBs, plaguicidas y dioxinas, que son sustancias bien conocidas y sometidas a regulación estricta, y otras sustancias como tributill estaño, algunos ftalatos, el bisfenol-A o los alquilfenoles que ahora empiezan a advertirse como un riesgo para la salud. Esta lista ha sido criticada por ser inexacta, incompleta y confusa, por la dificultad de incluir nuevos compuestos en la misma y por la escasa información sobre producción, utilización y usos proporcionada por la industria (Fernández, 2001).

Varios tests y bioensayos actualmente existentes, de muy diversa índole, han sido propuestos por diferentes organismos internacionales para la identificación de mimetizadores y/o antagonistas hormonales. Se pretende con ello ayudar en la estimación del riesgo de exposición a DE y tiene entre sus fines el que puedan ser utilizados como instrumentos de regulación en las relaciones de comercio exterior en todo el mundo (Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo, 1999).

Pero a pesar del esfuerzo realizado, en la puesta a punto y reducción de una batería de tests adecuados, se ha constatado que los efectos deletéreos sobre el sistema hormonal atribuidos a algunas de estas sustancias de interés no podrán ser objetivados con los tests toxicológicos actualmente en uso. Varias son las razones que explican este fracaso (Olea et al., 2000):

1. Un compuesto químico puede tener efectos relacionados con disrupción endocrina a dosis inferiores a las actualmente aceptadas como Nivel de Efecto Adverso No Observado (NOAEL).

2. Muchos de los tests de toxicidad no están diseñados para detectar los efectos que ocurren tras la exposición en los primeros momentos del desarrollo de un individuo.

3. Son muy pocos los tests que evalúan el efecto combinado de varios compuestos químicos.

4. Si los disruptores endocrinos actúan durante el desarrollo y afectan en periodos críticos a la homeostasis hormonal, las alteraciones de la función endocrina pueden manifestarse en cualquier órgano y en cualquier momento de la vida del individuo.

La complejidad de la caracterización toxicológica de las sustancias químicas que actúan como DE se recrudece ante la necesidad de predecir efectos que vayan más allá de la simple demostración de acción hormonal y que se implican en la patogenia de las enfermedades de base endocrina (Ashford & Miller, 1998). El caso de la exposición a dietilestilbestrol (DES) (Dodds & Lawson, 1936) es un buen ejemplo de como los tests de demostración hormonal, estrogénica en este caso, pueden fracasar en la demostración de la disrupción endocrina. Recuérdese que en algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido efecto importante. En otras ocasiones, se trata de compuestos bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los COPs.

En resumen, sea cual sea el sistema adoptado para el cribado sistemático de disruptores endocrinos, éste debe ser lo suficientemente robusto como para considerar:

1. Los diferentes valores de sensibilidad para los distintos objetivos de observación relativos a efectos hormonales.

2. El efecto de base atribuible a las propias hormonas endógenas en cualquiera de los modelos in vivo.

3. Las diferencias en susceptibilidad de subpoblaciones y la variabilidad interespecie.

4. La posibilidad de que se den fenómenos de aditividad, sinergismo y antagonismo, entre los mismos DE y entre estos y las hormonas naturales endógenas.

1.2.2. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS CON ACTIVIDAD DISRUPTORA ENDOCRINA

Según la Organización Mundial para la Salud (OMS), se entiende por residuo de pesticida a aquellas sustancias concretas que se encuentran en los alimentos, los productos agrícolas o los piensos como resultados del uso del pesticida. El término incluye tanto los derivados del plaguicida, como los productos de conversión, los metabolitos, los productos de reacción y las impurezas que se consideran de importancia toxicológica. Este término no se aplica a los antibióticos, ni a los fertilizantes, ni a otros productos químicos administrados a los animales con otros fines, como son el estímulo del crecimiento o el comportamiento reproductivo. En concreto, un pesticida agrícola es todo producto químico, natural o sintetizado, destinado a luchar contra los parásitos animales o vegetales que atacan los cultivos, excluyendo los productos de uso en veterinaria.

Debido a su diversidad estructural, con frecuencia los pesticidas se clasifican atendiendo a algunas de las propiedades derivadas de su comportamiento frente a organismos vivos, su vida media o su patrón de degradación medio ambiental. Así, los pesticidas organoclorados que son estructuralmente muy diversos y además comparten la presencia de uno o más átomos de cloro, se clasifican como compuestos persistentes, definiendo su persistencia en el medio ambiente como el tiempo necesario para que un 75-100% del compuesto desaparezca del medio. La escala de persistencia distingue entre: pesticidas no persistentes (de 1 a 12 semanas), pesticidas moderadamente persistentes (de 1 a 18 meses) y pesticidas persistentes (de 2 a 5 años).

Aunque inicialmente la persistencia de estos productos se consideró como una cualidad deseable para su empleo, ya que su efecto biocida era más duradero, pasado el tiempo se ha puesto de manifiesto los inconvenientes de este comportamiento, ya que la alta lipofilidad junto con la estabilidad química magnifica los efectos biológicos. La mayoría de los países industrializados han prohibido la utilización de los pesticidas organoclorados después de haberse revelado efectos adversos sobre la salud. Sin embargo y a pesar de la

prohibición de muchos de ellos, debido a su persistencia en los medios naturales y su lipofilia, pueden encontrarse hoy en día, incluso en individuos no expuestos de forma directa (Dich et al., 1997).

A este respecto, DDT, mucho más conocido que el resto de organoclorados, no es más que un ejemplo de esta gran familia de pesticidas organoclorados que comparten entre otras características la capacidad para mimetizar a las hormonas naturales alterando la homeostasis hormonal del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas, a través de mecanismos de acción diversos (Miller & Sharpe, 1998) y comportarse por tanto como verdaderos disruptores endocrinos.

Se presenta a continuación, de forma resumida, información sobre un grupo de pesticidas OCs persistentes que se clasifican dentro del grupo de disruptores endocrinos y que son de interés para el presente trabajo ya que se trata de los compuestos estudiados en la parte experimental y epidemiológica: p,p´DDT, o,p´DDT, o,p´DDD, p,p´DDE, metoxicloro, mirex, HCB, lindano, aldrín, dieldrín, endrín y endosulfán-I, II, diol, lactona, éter, sulfato.

1.2.2.1. DDT e isómeros/metabolitos

El DDT fue el primero de los insecticidas de segunda generación. Se trata de un hidrocarburo aromático clorado (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) introducido en el mercado como insecticida en la década de los 40. Tal es la importancia que el DDT supuso en sus primeros años de uso que además del gran beneficio en la protección de cosechas y en el aniquilamiento de insectos domésticos, se dice que evitó la muerte de 5 millones de personas anualmente. La máxima producción del insecticida se alcanzó en 1970 y a partir de entonces se fue prohibiendo su uso y por ende su fabricación. La razón de la prohibición fueron los graves problemas ambientales que se detectaron tras su utilización. Uno de los principales efectos se puso de manifiesto en la reproducción de las aves salvajes, cuyos huevos tenían unas cáscaras extraordinariamente finas y frágiles y muchos se rompían durante la incubación. Esto provocó que las poblaciones de algunas especies de aves disminuyeran de forma alarmante

(Colborn & Clement, 1992). Otro problema importante fue que muchos organismos desarrollaron resistencia y para luchar contra ellos había que emplear cantidades cada vez mayores del producto, con menor eficacia pero con mayor contaminación de suelos.

El DDT se acumula en la cadena trófica debido a su baja solubilidad en agua. Esta propiedad hace que se elimine difícilmente en orina, alcanzándose los niveles más altos en el tejido adiposo. Todas las poblaciones humanas, en cualquier parte del mundo, están expuestas a DDT y presentan niveles tisulares y séricos apreciables (Longnecker et al., 1997; Rivas et al., 2001; Porta et al., 2002; Botella et al., 2004).

Aunque su uso está prohibido actualmente en los países occidentales, todavía se utiliza para el control de la malaria en los países en vías de desarrollo. (Sharpe, 1995). El DDT comercial está formado por, aproximadamente, un 77% de p,p'DDT, un 15% de o,p'DDT, un 4% de p,p'DDE y porcentajes menores de otros isómeros. El metabolito lipofílico más estable del p,p'DDT es el p,p'DDE, que es el resultado de la dehidrocloración en el medio ambiente y en el hombre. Su presencia en los seres humanos puede reflejar tanto una exposición temprana al DDT como la exposición directa al DDE medioambiental. En general, el cociente de concentración DDT/DDE se considera un índice de utilidad para evaluar el tiempo en que ocurrió la exposición.

En comparación con otros países europeos, los niveles de DDT y DDE en la población española se consideraban en el rango medio-alto (Porta et al., 2002; Botella et al., 2004). No obstante, estudios recientes de carácter poblacional sitúan la media de la población en un rango medio-bajo respecto a otros países europeos (Zumbado et al., 2005). La posibilidad de una exposición actual al pesticida no degradado aún existe en nuestro país. La orden que prohibió el uso del DDT entró en vigor en 1977 pero no está documentado cuando terminó realmente su utilización, si es que ha terminado completamente. Esta duda obedece a varias razones: en primer lugar, a que el DDT se sigue usando como intermediarios para la fabricación de otros productos como el herbicida dicofol, que en consecuencia contiene DDT (Van de Plassche et al., 2003); en segundo lugar, existen indicios de que cantidades menores de DDT podrían estar

entrando ilegalmente en España procedentes de otros países; en tercer lugar, periódicamente se tiene noticia de usos ocasionales fraudulentos en explotaciones agrícolas y ganaderas; en cuarto lugar, hay información de que el Instituto de Toxicología recibe periódicamente notificaciones y consultas relacionadas con personas que sufren episodios de intoxicación aguda por DDT (Porta et al., 2002).

El p,p'DDE actúa como ligando del receptor de andrógenos y antagoniza su actividad transcripcional *in vitro*. En estudios *in vivo*, la exposición a este compuesto causa malformaciones en el tracto reproductivo masculino en neonatos, incluyendo disminución del peso de la próstata, supresión de los genes regulados por andrógenos y reducción del pezón y disminución del tamaño de la próstata ventral (Kelce & Wilson, 1997). Por otra parte, tanto el o,p'DDT como el p,p'DDT también muestran actividad estrógena, algo más débil este último (Soto et al., 1992). Recientemente, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al DDT como posible cancerígeno para el hombre (2B) (IARC, 2003).

La primera vez que se determinó la transferencia de DDE y DDT a través de la placenta fue en 1949 (Finnegan et al., 1949). A pesar de este descubrimiento temprano, no son muchos los trabajos que han estudiado la presencia de DDT y sus metabolitos mediante el análisis de tejido placentario. El primer trabajo realizado en muestras de placenta en las que se detectaron niveles medibles de DDE y DDT fue llevado a cabo en 1970 en EE.UU (O'Leary et al., 1970b). Se analizaron un total de 12 muestras, detectándose DDE y DDT en el 100% y 25%, respectivamente. También en los años 70, en un estudio realizado en Jerusalén sobre muestras de placenta, se detectaron niveles de p,p'DDT y sus metabolitos e isómeros, con medias comprendidas entre 0.44 μ g/g lípido para el caso del p,p'DDD y 3.95 μ g/g lípido para el p,p'DDE. Estudios realizados una década más tarde en la India (Saxena et al., 1980a), detectaron niveles de p,p'DDT e isómeros/metabolitos en un 90% de las muestras de placenta, en un rango comprendido entre el 26% para el caso del p,p'DDD y 62% para el caso de p,p'DDE, con una media geométrica de 38.21 y 50.54 μ g/g, respectivamente. Más recientemente, en Rumania, se encontraron y

cuantificaron niveles detectables de Σ DDT, en el 100% de las muestras, con una media de 35 $\mu\text{g/Kg}$ (Hura et al., 1999). Algo similar a lo que ocurrió en un estudio alemán, donde DDT fue detectado como un contaminante habitual en las placentas (Bosse et al., 1996). En Eslovaquia, se realizó un estudio con objeto de comparar la contaminación de las placentas humanas en función de su residencia ya fuese rural o urbana, analizándose un total de 120 muestras. El 74 y 46% de las muestras de la región urbana y rural, respectivamente, contenían niveles detectables de p,p'DDT y el 88 y 76%, fueron portadoras del metabolito p,p'DDE. El rango de concentraciones de los residuos variaba entre 2 y 5.2 $\mu\text{g/Kg}$. (Reichrtova et al., 1999). En Finlandia (Shen et al., 2005), el 100% de las placentas analizadas contenían alguno de los residuos de la familia de los DDTs, destacando entre otros, la frecuencia de aparición de p,p'DDT y op,p'DDE en el 100% de las muestras (con medias geométricas de 0.3 ng/g lípido y 17.8 ng/g lípido, respectivamente). En España, los trabajos de exposición placentaria no son abundantes. Así por ejemplo, en Murcia, la frecuencia de aparición de los DDT en muestras de tejido placentario se sitúa entre un 10.8% para el caso del p,p'DDD y un 44.11% para el caso del p,p'DDE. Con una media de 110.22 y 17.7 $\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo, respectivamente (Falcon et al., 2004). Nuestro grupo de trabajo ha realizado un estudio recientemente en Granada en el que se ha encontrado p,p'DDE en un 96.03% (media 2.37 ng/g placenta) de las placentas, y p,p'DDT ha sido detectado en un 59% de las muestras (1.02 ng/g placenta) (López-Espinosa et al., 2006a).

En resumen, el DDT pasó de ser un benefactor a un enemigo de la humanidad en los años 70 y 80. Tras su prohibición y su hipotético abandono hemos asistido a la incorporación de nuevos productos de estructura química algo distinta en la lucha contra plagas y enfermedades. Los nuevos compuestos parecen estar dotados de comportamientos medioambientales que los hacen menos persistentes sin que esto vaya en detrimento de su actividad insecticida.

1.2.2.2. Endosulfán y derivados

El insecticida endosulfán es un derivado del biciclohepteno que ha alcanzado gran importancia en la agricultura. Durante años ha sido el pesticida

organoclorado más utilizado en plantaciones intensivas del sureste de España. El endosulfán es una mezcla de dos isómeros, I y II. El isómero I representa el 64-67% del producto técnico y el isómero II el resto. Su uso en agricultura no está prohibido, aunque se ha restringido de forma llamativa su utilización en países que eran grandes consumidores.

De acuerdo con la información disponible, España ha sido el principal país consumidor de endosulfán dentro de la Unión Europea, seguido de Italia, Grecia y Francia (Endosulfan Preliminary Dossier, 2003).

El efecto hormonal del endosulfán se sospechó al observar atrofia testicular y una caída de los niveles de testosterona en ratas y ratones expuestos al mismo (Maier-Bode, 1968; Gupta & Gupta, 1979), pero hasta 1994 no se presentó el primer informe sobre la estrogenicidad de endosulfán en el que se demuestra el efecto proliferativo que ejerce dicho compuesto sobre células humanas de cáncer de mama mantenidas en cultivo (Soto et al., 1994). Estos mismos investigadores han señalado también su afinidad por el receptor de estrógenos y su capacidad para inducir la síntesis y secreción de proteínas estrógeno-inducidas (Soto et al., 1995). Se ha demostrado, asimismo, que el endosulfán mimetiza el efecto estrogénico en muy diversos modelos *in vitro* e *in vivo* (Andersen et al., 1999). Recientemente, se ha demostrado que algunos de sus metabolitos, endosulfán-éter y endosulfán-diol, también inducen la proliferación celular estrógeno dependiente (Rivas et al., 2001). Otros estudios han atribuido al endosulfán actividades hormonales distintas de la estrogenicidad, al ser un buen competidor para el receptor de progesterona (Vonier et al., 1996). Algunos autores sugieren que la actividad hormonal del endosulfán es independiente del receptor (Jin et al., 1997). Otros, atribuyen al endosulfán un papel sobre el sistema inmunológico (Banerjee & Hussain, 1986).

Datos recientes indican que el endosulfán causa efectos de disrupción endocrina en especies tanto acuáticas como terrestres: alteraciones en el apareamiento de anfibios, reducción de la secreción de cortisol en peces, atrofia testicular y caída espermática en mamíferos (Wirth et al., 2002; Gormley & Teather, 2003; Otludil et al., 2004; Gale et al., 2004; Park et al., 2004).

El endosulfán es un compuesto liposoluble con una larga vida media ambiental que se almacena en tejido adiposo. En su metabolismo se producen diversidad de metabolitos que en buena medida son más hidrosolubles, lo cual facilita su excreción (Smith, 1999). Entre todos sus metabolitos, el endosulfán-sulfato es el más importante. Este puede ser transformado a endosulfán-éter, que está en equilibrio con endosulfán-diol. La persistencia media de endosulfán-I y -II es de 800 y 60 días, respectivamente (Doong et al., 1999).

Las grandes áreas de agricultura intensiva en Europa se encuentran en el sureste español, cerca de la costa mediterránea. Este tipo de agricultura requiere el uso de grandes cantidades de pesticidas (Olea et al., 1999). Apoyándonos en este hecho nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo un estudio en mujeres y niños de la zona de Granada y Almería con objeto de analizar los niveles de endosulfán y metabolitos en los diferentes compartimentos corporales y su distribución corporal (Cerrillo et al., 2005a). Los resultados del mismo señalan que la mayor concentración del endosulfán comercial I y II se produce en el tejido adiposo, seguido de leche humana, hecho que apoya la idea de la eliminación de compuestos lipofílicos a través de la misma. Los metabolitos más hidrofílicos se encontraron en placenta y sangre de cordón umbilical en concentraciones elevadas (el endosulfán diol presentó un valor medio de 13.23 ng/mL). Estos resultados sugieren que en el sur de España las mujeres, durante la edad reproductiva, han estado y siguen estando expuestas a endosulfán. Además, debido a su movilización durante el embarazo y la lactancia es necesaria una investigación adicional acerca de las consecuencias que estos compuestos pueden tener en la salud infantil (Cerrillo et al., 2005a). En relación con ello es importante hacer notar que en las muestras de placenta de madres granadinas se han encontrado residuos de al menos alguno de los endosulfanes estudiados (endosulfán-I, II, diol, éter, lactona, sulfato) en un 98.30% de las muestras analizadas (López-Espinosa et al., 2006a). Hasta la fecha, solamente existe un estudio más, a parte de los realizados por nuestro grupo de trabajo, en el que se haya determinado endosulfán en placentas. Es el caso del estudio finlandés llevado a cabo por Shen et al., (2005) en el que detectaron endosulfán-I y -II en el 100 y 50% de las placentas, respectivamente.

1.2.2.3. Aldrín, dieldrín y endrín

Se trata de un grupo muy homogéneo de pesticidas derivados del dimetano-naftaleno. El dieldrín es el principal metabolito del aldrín. Los tres compuestos tienen una toxicidad aguda mayor que otros pesticidas como los DDTs. El aldrín es un plaguicida ciclodiénico ampliamente utilizado como insecticida en cultivos de maíz y algodón en las décadas de los 50 y 70, que se transforma rápidamente en dieldrín tanto en el medio ambiente como tras ser absorbido por el organismo. El endrín ha sido usado en agricultura como insecticida en el cultivo del tabaco, manzana, algodón, caña de azúcar y grano, así como en el control de roedores y aves (ATSDR, 1997). El endrín posee una estructura y función similar al aldrín y dieldrín. El aldrín es el más volátil y se estima que su vida media en el suelo es de 1.5-5.2 años (Jorgenson, 2001). La exposición a aldrín y dieldrín ocurre mayoritariamente a través de la ingesta de comida contaminada (Van Ert & Sullivan, 1992), pero también tras inhalación y a nivel dérmico. Aldrín y dieldrín alcanzan concentraciones cada vez mayores en el cuerpo humano tras años de exposición debido a su bioacumulación y difícil degradación y pueden afectar al sistema nervioso (ATSDR, 2002). En 1987, la Agencia de Protección Mediomambienta (EPA) prohibió todos los usos de aldrín y dieldrín (ATSDR, 2002), debido a la información sobre el daño al medioambiente y sobre la salud humana.

La actividad estrogénica del dieldrín se ha demostrado en ensayos *in vitro* con células estrógeno-sensibles de cáncer de mama y su nivel de actividad es comparable con la del DDT (Soto et al., 1994). La exposición al mismo se sigue, en ocasiones, de alteraciones en la fertilidad masculina (Toppari et al., 1996). En un estudio realizado por nuestro grupo, el dieldrín junto al lindano, fueron considerados factores de riesgo para la aparición de criptorquidia e hipospadias en los niños (Olmos et al., 2006).

El dieldrín se acumula en el tejido adiposo, mostrando una concentración en este compartimento 100 veces superior a la encontrada en sangre. Una vez que el aldrín se transforma en dieldrín, se excreta en heces y orina. Además del tejido adiposo, el dieldrín se concentra en el hígado, leche humana y semen. También se acumula en el cuerpo lúteo del ovario, placenta, glándula mamaria y

en la médula espinal de la mujer (Murphy et al., 1983; Matsumura, 1985). A diferencia del DDT y otros organoclorados en los que la concentración en la médula ósea es menor que en el tejido adiposo, existen datos que demuestran que el dieldrín se concentra en la médula hasta 20 veces más que en el tejido adiposo (Scheele, 1998). Otros estudios han mostrado que el dieldrín pasa a través de la placenta y se acumula en el feto, particularmente en el hígado, grasa e intestino (Salama et al., 1993).

Niveles detectables de aldrín y dieldrín fueron encontrados en muestras de placenta en un 92 y 4%, respectivamente (media geométrica 158.7 y 3.93 ppb), en un estudio realizado en la India (Saxena et al., 1980a). En un estudio realizado en Israel, la media de dieldrín fue de 0.81 $\mu\text{g/g}$ lípido (Polishuk et al., 1977). En el estudio recientemente publicado por Shen et al., (2005), se cuantificó dieldrín y aldrín en el 100% (media geométrica=1.2 ng/g lípido) y 4.5% (media geométrica=0.1 ng/g lípido), respectivamente, de las muestras estudiadas. En España, a penas sí existe información sobre los niveles de ciclodienos en placenta. En el estudio realizado en Granada, el endrín fue el más detectado en muestras de placenta de los tres compuestos de esta familia (33.11%), seguido del aldrín (26.49%) y dieldrín (22.51%), con medias de 0.70, 0.24, 0.25 ng/g placenta, respectivamente (López-Espinosa et al., 2006a).

El dieldrín se encuentra en más del 99% de las muestras de leche humana analizadas en muchos países. A pesar de ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que los niveles actuales de residuo de dieldrín en la leche humana no implican riesgo para el niño (Weybridge, 1996).

1.2.2.4. Hexaclorobenceno

El Hexaclorobenceno (HCB) es un conocido DE (Smith et al., 1987; Gocmen et al., 1989) que se bioconcentra en la grasa de los organismos vivos (Ernst et al., 1986; Hayes & Laws, 1991). El HCB fue introducido en 1945 en el mercado como fungicida. El HCB puede persistir en el medioambiente durante años, con una vida media estimada en el suelo de 23 años. Ha sido usado como fungicida en agricultura para proteger las cebollas, las semillas de trigo y otros granos. Su producción, para fines agrícolas, fue prohibida en 1971 en EE.UU.,

pero todavía se sigue utilizando para la fabricación de solventes, como intermediario para compuestos que contienen cloro en su molécula y pesticidas de otros usos (ATSDR, 1996b).

La Agencia de Protección Medioambiental (EPA) ha revelado que se han encontrado niveles detectables de HCB en los tejidos del 95% de la población americana (Robinson et al., 1990). En Jerusalén, Polishuk et al., (1977) midieron niveles de HCB en muestras de tejido placentario. Los niveles medios encontrados eran de 1.05 µg/g lípido. En la India, Saxena et al., (1980a) encontraron niveles detectables de HCB en el 100% de las muestras de placenta, con una media geométrica de 1360.48 ppb. En el estudio realizado en Eslovaquia, que comparaba la exposición materno-infantil de dos áreas, una urbana y otra rural, la frecuencia de aparición de este pesticida en las muestras de placenta variaba entre el 98% y 75%, respectivamente. Con un rango medio de concentraciones entre 0.6 y 0.4 ng/g placenta, para cada población. En el estudio llevado a cabo en Granada, un 43% de las muestras de placenta analizadas tenían niveles detectables de HCB, con una media de 0.50 ng/g placenta (López-Espinosa et al., 2006a). En 2001, un estudio realizado en Flix (Ribera del Ebro, Tarragona) puso en evidencia que los niños nacidos en dicha población entre 1997 y 1999 presentaban en el momento de nacer concentraciones muy elevadas de HCB (media geométrica=1.1 ng/mL), así como concentraciones detectables de PCBs y p,p'DDE en sangre (Sala et al., 2001).

El HCB es muy persistente en el medio ambiente y sus efectos en animales de laboratorio resultan ser los siguientes: alteración de la función ovárica, disminución de la fertilidad y disminución del peso de las vesículas seminales y de la próstata ventral (Muller et al., 1978; Foster et al., 1996). La exposición en niños puede afectar al desarrollo reproductivo, físico y mental. Se ha demostrado que las muestras de tejido de niños con criptorquidismo presentaban niveles más elevados de HCB que los niños del grupo control (Hosie et al., 2000). Otro estudio sugiere que, tanto *in vivo* como *in vitro*, el HCB mimetiza débilmente la acción de los andrógenos y como consecuencia, bajos niveles de HCB incrementan la acción de los andrógenos, mientras que niveles más altos disminuyen la actividad hormonal (Ralph et al., 2003).

1.2.2.5. Hexaclorociclohexano

El lindano es el pesticida organoclorado más utilizado dentro de este grupo. Se trata de uno de los cinco isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), concretamente el isómero gamma y tiene actividad insecticida. Sigue el desarrollo histórico del DDT dentro del gran grupo de los pesticidas organoclorados. Actualmente su uso está prohibido o restringido en los países occidentales. Ha sido utilizado en agricultura y también en salud pública para el control de vectores. A pesar de todo, el lindano se sigue vendiendo en las preparaciones farmacológicas para uso humano y animal, como es el tratamiento de la sarna y se sigue utilizando en diversas zonas agrícolas. Las vías de exposición para la población en general, son, por tanto, la comida, el aire y el contacto dérmico, además de las derivadas del empleo farmacológico.

El HCH tiene propiedades estrogénicas claramente demostradas. Destacan entre ellas la proliferación de células de cáncer de mama en ensayos *in vitro* (Steinmetz et al., 1996), producida por el isómero β y los efectos a nivel de epitelio uterino o vaginal en hembras ovariectomizadas en ratas, ratones y carneros expuestos a lindano o al β -HCH. En machos produce atrofia de los conductos seminíferos y de las células de Leydig y afecta al comportamiento reproductivo atenuado (Van Velsen et al., 1986; Chowdhury et al., 1987; Huang & Huang, 1987; Beard et al., 1999; Ulrich et al., 2001). En un estudio reciente de nuestro grupo, la exposición a lindano ha revelado ser un factor de riesgo de aparición de criptorquidia e hipospadia en niños (Olmos et al., 2006). El efecto cancerígeno en el hombre no está demostrado aunque sí se ha observado este efecto en algunos modelos animales (IARC, 2003).

El riesgo de exposición al HCH no ha desaparecido todavía debido al carácter persistente y estable en el ambiente de su molécula. Se produce su acumulación en tejidos como la glándula mamaria, el sistema nervioso y el hígado. Aunque también se acumula en otros tejidos, como la placenta, tal y como lo han demostrado algunos estudios realizados en las últimas décadas. Por ejemplo, Saxena et al., (1980a) encontraron niveles de lindano detectables en un 96% de las muestras de placentas en la India (media geométrica=389.48ppb). En Rumania (Hura et al., 1999), se demostró la

presencia de HCH en todas las muestras analizadas alcanzándose un valor medio de 19.8 µg/Kg. En Finlandia, el lindano fue detectado en un 100% (media geométrica=3.51(+23.51) ng/g lípido) de las muestras (Shen et al., 2005). En España, es de nuevo el grupo de Murcia (Falcon et al., 2004), el que detectó lindano en un 24.4% de las muestras (media=8.33 µg/g de tejido húmedo). En el estudio realizado por nuestro grupo en muestras de placentas del sur peninsular, el lindano ocupaba el tercer puesto en la escala de frecuencia de aparición (74.17%), con una media de 0.38 ng/g placenta (López-Espinosa et al., 2006a).

1.2.2.6. Mirex

El mirex pertenece al grupo de derivados del pentaclorociclodecano. Estos insecticidas se caracterizan por poseer una estructura en forma de caja. El mirex se emplea como retardador del fuego originado por plásticos, pinturas y utensilios eléctricos y su uso está restringido o prohibido actualmente en la mayoría de los países occidentales. Al presentar un alto grado de cloración y dificultad de metabolización o eliminación se facilita su acumulación ambiental y animal. Tiene un período de permanencia hasta diez años en el sedimento. Al igual que el resto de organoclorados se acumula en el tejido adiposo y se excreta con mucha dificultad. Por lo tanto, se trata de un insecticida que sufre biomagnificación en la cadena alimentaria (Ahlborg et al., 1995). Existen pocos estudios sobre exposición humana a mirex. En Finlandia, el 94% de las muestras de placenta contenían mirex (media geométrica=0.2 ng/g lípido) (Shen et al., 2005). En el estudio de Granada que ya se ha referido, el 39.90% de las placentas tenía niveles detectables de este pesticida, con una media de 0.38 ng/g placenta (López-Espinosa et al., 2006a). Además, existen pocos datos sobre sus efectos en salud humana. Dosis de mirex similares a las ingeridas en la dieta han inducido reacciones adversas en animales (ATSDR, 1996a).

1.2.2.7. Metoxicloro

El Metoxicloro es otro pesticida organoclorado de interés. Es, sin duda, el más conocido y empleado de los análogos del DDT. Tiene un espectro de toxicidad para los insectos más limitado que el DDT pero presenta la ventaja de

ser menos tóxico para los mamíferos. El metoxicloro ha demostrado ser útil para el control de las plagas domésticas, las plagas del ganado, y una gran variedad de insectos que atacan las frutas, verduras y cosechas de forraje. Una ventaja adicional del empleo del metoxicloro sobre otros pesticidas es su rápido metabolismo y mayor biodegradabilidad en los organismos animales. En el caso concreto de los animales de sangre caliente, el metoxicloro se destoxifica por desmetilación, lo que contribuye a la reducción de los efectos tóxicos crónicos inducidos por otros hidrocarburos clorados.

El metoxicloro presenta actividad proestrogénica, es decir, necesita ser activado *in vivo* o *in vitro* con microsomas hepáticos para la génesis del metabolito activo (Stresser & Kupfer, 1998). Su actividad hormonal estrogénica ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* (Bulger et al., 1978; Cummings & Metcalf, 1994; vom Saal et al., 1995; Cummings & Metcalf, 1995a; Cummings & Metcalf, 1995b). Cuando se administra *in vivo* produce efectos adversos sobre la fertilidad y sobre la actividad uterina en hembras (Ousterhout et al., 1981). También se han descrito efectos adversos en animales machos expuestos intraútero, como por ejemplo, alteración del comportamiento sexual (Cummings, 1997; Cupp et al., 2003). No se conocen con exactitud los mecanismos que conducen a la alteración de la función reproductora ya que se han asociado tanto con una acción agonista o antagonista hormonal. Hall et al., (1997), estudiando los efectos de este pesticida sobre la implantación y el desarrollo del embrión en ratones, llegaron a la conclusión de que el metoxicloro actúa como agonista estrogénico a nivel del útero y oviducto pero presenta una acción antiestrogénica en el ovario.

En Europa, hasta la fecha solamente existe el estudio realizado en muestras finlandesas en las que se haya medido metoxicloro. La frecuencia de aparición de este compuesto era del 42% con una media geométrica de 0.1 ng/g lípido. En España, no existen hasta la fecha, estudios que midan el grado de exposición materno-infantil a este pesticida mediante el análisis de la placenta, excepto el estudio realizado recientemente por nuestro grupo de investigación. En éste caso, la frecuencia de aparición del metoxicloro en placenta fue del 32.45% con una media de 0.42 ng/g placenta (López-Espinosa et al., 2006a).

1.2.3. BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN, SUSCEPTIBILIDAD Y EFECTO

Con objeto de dar una solución al problema de la estimación de la exposición conjunta a múltiples compuestos químicos con actividad DE se ha sugerido tanto la cuantificación en muestras biológicas y medioambientales del mayor número posible de compuestos químicos, como el estudio de las interacciones existentes entre ellos y el desarrollo de biomarcadores de exposición y efecto que cuantifiquen la acción hormonal.

En particular, se han propuesto tres tipos diferentes de biomarcadores en relación con la disrupción endocrina:

1. Los biomarcadores de exposición que hacen referencia a la cuantificación de DE y a su interacción con células o moléculas diana pertenecientes a un compartimento corporal determinado.

2. Los biomarcadores de susceptibilidad que definen la capacidad del organismo, inherente o adquirida, para adaptarse a las consecuencias derivadas de la exposición a disruptores endocrinos.

3. Los biomarcadores de efecto que se definen en términos de la alteración hormonal, bioquímica, fisiológica o de cualquier otro tipo que pueda ser medida, cuantificada y reconocida como una desviación del patrón normal, un efecto adverso o un signo de enfermedad.

En lo que concierne al empleo de biomarcadores de exposición a DE con actividad estrogénica, la estrategia a seguir debería considerar aspectos metodológicos de muy diferente orden: Sería necesario el establecimiento de un test biológico con el que verificar la actividad hormonal responsable del efecto, así como la selección de la muestra biológica más adecuada—sangre, suero, tejido, - en términos de accesibilidad, posibilidad de limpieza, separación de las hormonas endógenas de los xenobióticos y preparación óptima para poder ser utilizada en el test elegido.

Se ha propuesto (Soto et al., 1997) que más que medir los niveles de determinados compuestos químicos, sería más útil cuantificar la actividad biológica resultante de los exposición conjunta a DE. Nuestro grupo de trabajo adoptó hace tiempo esta aproximación y desarrolló un sistema para estimar la

carga estrogénica de xenobióticos en muestras de suero humano (Sonnenschein et al., 1995), usando el test E-Screen y un bioensayo *in vitro* de probada eficacia para identificar xenoestrógenos (Soto et al., 1992). Este bioensayo compara el rendimiento en proliferación celular entre cultivos de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama tratados con estradiol y aquellas tratados con diferentes concentraciones de xenobióticos sospechosos de ser estrogénicos (Soto et al., 1995; Villalobos et al., 1995).

Posteriormente, se desarrolló la metodología de extracción de xenoestrógenos a partir de muestras humanas de tejido adiposo y la separación de las hormonas sexuales de los xenoestrógenos bioacumulados para así poder analizar de forma individualizada distintas fracciones tisulares en el bioensayo E-Screen (Pazos et al., 1998; Rivas et al., 2001). Más recientemente esta metodología fue aplicada en el tejido placentario (Olmos et al., 2006; López-Espinosa et al., 2006b). De esta forma, el ensayo biológico de estrogenicidad E-Screen utilizado por nuestro grupo de trabajo para la medida de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) asigna un valor de estrogenicidad a las muestras biológicas analizadas (tejido adiposo, sangre, leche materna, placenta) y convierte un marcador de exposición, tipo dosis interna, en un marcador de equivalencia biológica y por tanto de efecto biológico (Pazos et al., 1998; Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004). Este marcador está siendo aplicado con éxito en estudios epidemiológicos de muy diferente índole, en los que la exposición a DE estrogénicos se cuantifica mediante la medida individual de residuos químicos y la estimación de la actividad estrogénica del extracto tisular.

Recientemente, también ha sido utilizado el ensayo Yeast Estrogen Screen (YES) para la medida de la carga estrogénica total efectiva (TEXB), asignando un valor de estrogenicidad a las muestras de tejido placentario y se ha comparado con el valor asignado en el ensayo E-Screen. El YES, es un ensayo *in vitro* para compuestos químicos capaces de interactuar con receptor estrogénico α de origen humano (hER α), ya que la secuencia íntegra del DNA del hER α fue transfectada dentro del principal cromosoma de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Routledge & Sumpter).

La aplicación del concepto de biomarcador de exposición a la estimación de TEXB y a otros ensayos de características similares, puede ser excesivamente restrictiva, ya que su expresión numérica no nos limita a indicar exposición sino que establecemos un vínculo con el efecto biológico producido.

Este tipo de biomarcador, junto con las técnicas de análisis químico que capacitan hoy día para detectar y cuantificar sustancias a concentraciones pico y nanomolar, ha permitido ajustarnos a las recomendaciones de la Unión Europea en cuanto a prioridades en disrupción endocrina. El trabajo desarrollado en esta memoria aporta algo más de conocimiento a la hipótesis planteada.

1.3. EXPOSICIÓN ALIMENTARIA A COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE)

Como ya se ha dicho con anterioridad en esta introducción, la exposición de los seres vivos a los COPs con capacidad disruptora endocrina, es universal, ya que se encuentran repartidos por todo el mundo como consecuencia de un empleo generalizado, debido a una baja degradabilidad, a que son transportados a otros lugares distintos y distantes del lugar de aplicación y a que se magnifican en la cadena trófica o alimentaria.

Los Organismos Internacionales, como la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), han establecido los niveles máximos admisibles para la ingesta de plaguicidas residuales en alimentos en base a la toxicidad del producto activo y a la proporción en que un alimento en particular entra en la dieta normal. Una vez establecidos los niveles máximos admisibles, las autoridades nacionales son las encargadas de establecer una legislación apropiada y vigilar cuidadosamente los residuos de los plaguicidas en alimentos mediante los controles analíticos adecuados (Olea et al., 2003).

En las últimas décadas, ha surgido un especial interés por parte de los sanitarios sobre el estudio de la exposición alimentaria a DE, por lo que la atención se ha centrado en la lectura crítica de la información técnica sobre el residuo de algunos pesticidas en los alimentos. Desafortunadamente la

información disponible sobre la contaminación de los alimentos por compuestos químicos DE presenta grandes vacíos temporales y variaciones geográficas importantes. A continuación se recogen algunos de los estudios más relevantes realizados en España, que pueden ayudar a dibujar el mapa de exposición a DE.

1.3.1. PRODUCTOS LÁCTEOS

Una de las fuentes de exposición alimentaria a DE es a través de la leche para consumo. Los residuos de los compuestos químicos de interés son ingeridos en la alimentación de la ganadería y se acumulan en el tejido graso del animal, siendo secretados, en parte, en la grasa de la leche. Hernández et al., (1994) recogieron muestras de leche de vaca durante los años 1990 y 1991 en el mercado madrileño y tras analizarlas descubrieron diferentes tipos de PCBs. Dos años más tarde, Losada et al., (1996) publicaron un estudio en el que analizaron muestras de leche de oveja sin cocer procedentes de León, encontrado niveles medibles de diferentes pesticidas organoclorados. El residuo más frecuente fue lindano (66.67%), seguido de α -HCH (45.59%), aldrín (23.10%), dieldrín (17.95%), p,p'DDE (10.26%) y p,p'DDT (10.26%). El mayor nivel de concentración de residuo lo alcanzó el p,p'DDE (0.0050 ppm/peso seco), seguido de aldrín (0.0035ppm/peso seco) y dieldrín (0.0035 ppm/peso seco). Este mismo año, se publicó un estudio realizado en el País Vasco, en el que se denunció la presencia de γ -HCH, en un 17% de las muestras de leche analizadas (Urieta et al., 1996). Igualmente, se encontraron niveles cuantificables de PCBs, dioxinas y furanos en muestras de leche en polvo de diversas marcas recogidas durante 1996 (Ramos et al., 1999b). En otro estudio posterior que analizó el residuo en leche pasteurizada cordobesa, se vio que la mayoría (95%) de las muestras contenía uno de los isómeros del grupo HCH y que el 13% de las muestras analizadas excedía el límite máximo de residuo recomendado por la UE. Ninguna de las muestras excedía los niveles permitidos para el grupo del p,p'DDT. La concentración de lindano fue de 0.007 mg/Kg, aldrín 0.002 mg/Kg, dieldrín 0.028 mg/Kg, p,p'DDD 0.009 mg/Kg, p,p'DDE 0.045 mg/Kg y sumatoria de DDTs 0.067 mg/Kg (Martínez et al., 1997).

La mantequilla, como derivado lácteo, también ha sido objeto de estudio en cuanto a residuos de organoclorados. El grupo de Badía-Vila (2000) comparó la frecuencia y concentración de plaguicidas en la mantequilla de España con la de otros países europeos. Los resultados mostraron que no existían diferencias en el tipo de plaguicidas, pero sí en los niveles, siendo más altos en las muestras españolas, especialmente para el caso del lindano, HCB y beta-HCH. También en mantequilla se detectaron niveles de PCBs, PCDDs y PCDFs en diversas marcas comercializadas en España según se refiere en un estudio publicado en el año 1997 (Ramos et al., 1999c).

Con respecto al queso, en un estudio realizado en 1995 (Bentabol & Jodral, 1995) con queso de cabra, se determinó la presencia de 17 pesticidas organoclorados (alfa-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH, aldrín, dieldrín, endrín, heptacloro epóxido, clordano, o,p´DDT, p,p´DDT, o,p´DDD, p,p´DDD, o,p´DDE, p,p´ DDE y HCB).

Niveles elevados de PCBs, dioxinas y furanos se describieron en muestras de yogures comerciales en España según se refiere en un estudio realizado por Ramos et al., (1999a).

La ingesta de residuos organoclorados por el bebé mediante la leche materna durante la lactancia, es otra forma de exposición alimentaria a los pesticidas (Rogan et al., 1986a; Longnecker & Rogan, 2001; Karmaus et al., 2001b). El acúmulo de DDE en tejido graso durante la vida de la madre puede suponer una fuente importante de exposición para el hijo tanto durante la gestación como a través de la lactancia (Olea & Olea-Serrano, 1996). Sólo esta vía de exposición placentaria y leche materna es capaz de explicar los niveles de algunos DE detectados en grasa de niños de corta edad (Olea et al., 1999; Jimenez, 2000).

Como hemos visto hasta ahora, niveles detectables de organoclorados se encontraron en gran parte de las muestras de productos lácteos en España. Aún así, parece ser que la tendencia temporal de los niveles afortunadamente es descendente, al menos para los compuestos persistentes que se han sometido a una regulación más estricta (Fernández M.A. et al., 2002).

1.3.2. FRUTAS Y VERDURAS

El control de los niveles de residuos de determinados pesticidas es una exigencia de la producción agrícola para el caso de las frutas y verduras (European Commission, 2001). Legumbres (Lázaro et al., 1996), lechugas, tomates y habichuelas verdes (Viana et al., 1996), frutas tales como melones y sandías y verduras tales como pimientos, pepinos, berenjenas y calabacines (Martínez Vidal et al., 2004), e incluso vino (García Repetto et al., 1996), entre otros, han sido motivo de análisis y estudio para investigar las curvas de eliminación de los residuos de pesticidas.

La mayor parte de los trabajos de monitorización de residuos pertenecen a informes internos de las distintas administraciones, regionales, nacionales y europeas. A este respecto, el informe de la UE sobre residuos de plaguicidas comercializados en el mercado publicado en el año 2005, con datos de muestras tomadas en 2003 (Commission of the European Communities. Commission Staff Working Document, 2005), reveló que el tercer pesticida más frecuentemente encontrado en frutas y verduras era el dicofol, y en octavo lugar se situaba el endosulfán. Además, para el caso de los cereales, el lindano se encontraba en la posición tres de la lista de pesticidas más frecuentemente encontrados. En un estudio realizado en la ría de Huelva (CSIC, 2001), se investigaron los niveles medios de varios pesticidas en verduras, frutas, hortalizas y cereales. En tomate fresco, los niveles medios de endosulfán-I y -II, eran de 0.15 ppm en peso fresco. En fresas, los niveles medios de HCB se encontraron en un rango entre 0.27 y 1.3 ng/g, los niveles medios de lindano fueron de 33.32 ng/g y los niveles de p,p'DDE y p,p'DDT estaban comprendidos en un rango desde no detección y 0.24 ng/g peso seco, y no detección y 0.17 ng/g peso seco, respectivamente, llevando a pensar que se habían producido aportes recientes de DDT en algunos campos de cultivo.

Con respecto a otros compuestos químicos, como por ejemplo dioxinas y furanos, en un estudio realizado por Domingo et al., (1999), en el que se midieron los niveles de estos compuestos en diferentes tipos de alimentos elegidos aleatoriamente de mercados y supermercados de Tarragona, destacó la

elevada ingesta de dioxinas y furanos a través de cereales, vegetales y aceites con respecto a estudios realizados en otros países.

1.3.3. CARNE

La carne y sus derivados, han sido considerados por varios estudios como las principales fuentes de exposición de la ingesta diaria de los contaminantes organoclorados en la población en general (Herrera et al., 1996; Bordajandi et al., 2004). Así por ejemplo, el 100% de las muestras de carne de cordero y cerdo analizadas por el grupo de Herrera (1996) en Zaragoza tenían niveles detectables de DDT, HCB y HCH. También en Aragón, γ -HCH, DDT, HCB y endosulfán fueron cuantificadas en muestras de carne de crianza regional (Lázaro et al., 1996). El γ -HCH y HCB fueron encontrados en muestras de carne del País Vasco (Urieta et al., 1996). En un estudio realizado en la riera de la ría de Huelva, se encontraron niveles detectables de DDE y DDT en muestras de distintos tipos de carne (pollo, cerdo, gallina, embutidos, lomo, jamón). El rango de concentraciones de DDE variaba entre 9.53 ng/g grasa para el jamón y 0.30 ng/g grasa para el lomo y el rango de concentraciones de DDT iba desde 4.16 ng/g grasa para el caso de la carne de cerdo a 0.49 para el lomo (CSIC, 2001). En algunos de los alimentos estudiados, los niveles medios de DDT eran superiores a los de su principal metabolito DDE, y la única explicación lógica encontrada fue el posible uso actual del compuesto DDT.

En otros estudios en los que el objetivo era investigar, no sólo los plaguicidas existentes en determinados productos cárnicos (salchichas y jamón), sino la influencia del procesamiento de estos productos en la degradación del residuo plaguicida (Arino et al., 1995), se observó que en el caso del p,p'DDE, la curación no afectaba al nivel del residuo. En otro estudio con el mismo objetivo, se obtuvo un resultado parecido: el proceso tecnológico de curación no ejercía un efecto significativo sobre los niveles de residuos en las salchichas (Bayarri et al., 1998).

Con respecto a otros compuestos orgánicos persistentes, trabajos realizados en Cataluña, detectaron dioxinas, furanos y PCBs en muestras de pollo y cerdo (Abad et al., 2002). Igualmente, siete PCBs fueron detectados en

muestras de cerdo procedentes de una fábrica de procesado en Galicia (López-López-Leiton et al., 2001). En Madrid, se midieron niveles de COPs en carnes de vaca, cerdo, cordero y pollo que fueron recogidas en los mercados entre 1990 y 1991 (Hernández et al., 1994). En el informe presentado por el CSIC en la ría de Huelva, los niveles de Σ PCBs variaban entre 51.67 ng/g grasa en carne de gallina y 5.55 ng/g grasa en embutidos (CSIC, 2001).

1.3.4. PESCADO

El vertido constante de compuestos químicos al medio ambiente de origen industrial, agrícola y urbano y su biomagnificación a través de la cadena trófica da lugar a la contaminación de las aguas continentales y marítimas, y conlleva a que se encuentren en peces en niveles detectables y algunas veces superiores a los recomendados por la UE. Tal es el caso de río Cinca (Huesca), cuyas aguas están altamente contaminadas por DDT y derivados, especialmente p,p'DDE, procedentes de una fábrica donde se produce dicofol. Tal es la contaminación que en 1999, tras un estudio realizado por INTERLAB para la Confederación Hidrográfica del Ebro, se denunció la alta contaminación de este río por DDT y metabolitos y se recomendó el no consumo de peces (INTERLAB para la Confederación Hidrográfica del Ebro, 1999). En otros ríos, tales como el Turia (Valencia) y la Ría de Huelva, Bordajandi et al., (2003; 2004) encontraron niveles detectables de diferentes compuestos organoclorados en las muestras de peces recogidas.

En las rías gallegas se detectaron niveles medibles de PCBs, lindano, heptacloro, aldrín, isodrin, heptacloro epóxido, dieldrin, endrin, p,p'DDE, o,p'DDT, p,p'DDT y metoxicloro en mejillones cultivados o recolectados entre 1990 y 1991 en los 4 mayores estuarios de las rías (Alvárez-Pineiro et al., 1995). También en Galicia, en un estudio posterior, se encontraron de nuevo en moluscos, niveles detectables de compuestos organoclorados tales como PCBs, p,p'DDE, o,p'DDT, p,p'DDT, aldrín, isodrin y endrin (Carro et al., 2004). En una piscifactoría localizada en Castilla y León, se descubrieron niveles detectables de varios plaguicidas organoclorados (lindano, heptacloro epóxido, aldrín, dieldrin, endrin, p,p'DDE, y p,p'DDT) en el músculo de la trucha arco iris. El residuo más

frecuente fue el lindano (67.5%) seguido del heptacloro epóxido (55.0%) (Sahagún et al., 1998). Urieta et al., (1996) describieron la contaminación por DDE en peces procedentes de distintos mercados en el País Vasco. HCH, DDT, HCB y endosulfán fueron medidos en muestras de peces en Aragón por Lázaro et al., (1996). Por último, en la ría de Huelva, los niveles medios de DDE y DDT variaban entre 305.59 ng/g grasa y 10.15 ng/g grasa, respectivamente, para el pescado blanco y 0.70 ng/g grasa y 0.25 ng/g grasa, respectivamente, para las conservas de atún.

Con respecto a otros productos organoclorados, residuos de PCDDs, PCDFs y PCBs fueron encontrados en muestras de salmón, atún, sardinas, ostras, mejillones y almejas comprados en los supermercados de Madrid con una tendencia a la disminución en los niveles en el periodo comprendido entre 1995 y 2003 (Gomara et al., 2005). En un estudio catalán en el que se definió la ingesta diaria de dioxinas a través de los alimentos consumidos, se determinó que el mayor porcentaje de aportación a esta ingesta era el pescado y marisco (31%), seguido de cerca por los productos lácteos (25%), cereales (14%) y carne (13%). Al comparar la ingesta diaria de dioxinas de la población catalana con otros países, se vio que solamente era superada por EE.UU. (Llobet et al., 2003b). En otro estudio de este grupo catalán, en el que se estudiaron los niveles de 11 congéneres de PCBs en diferentes productos comprados en el mercado, se encontró que los niveles más altos de dichos contaminantes estaban en el pescado y marisco (11,864.18 ng/Kg de peso seco) (Llobet et al., 2003a). En la ría de Huelva, los niveles medios máximos de Σ PCBs se detectaron en coquinas (130.5 ng/g grasa) y los mínimos en conservas de atún (1.3 ng/g grasa) (CSIC, 2001).

1.3.5. AGUA

El agua también es una fuente de exposición a DE. En análisis llevados a cabo en Barcelona se midieron un total de 22 pesticidas en aguas de bebida (Quintana et al., 2001). En un estudio más reciente en Gran Canaria, se encontraron 16 plaguicidas organoclorados (aldrín, alfa-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH, dieldrín, endrín, endrín aldehído, endosulfán I y II,

endosulfán sulfato, DDD, DDE, DDT, heptacloro y heptacloro epóxido) fueron encontrados en muestras de agua embotellada (Sagrera-Ruano et al., 2003). En un área protegida de la Comunidad de Madrid, se detectaron niveles cuantificables de p,p´DDT y p,p´DDE, entre otros compuestos, siendo las concentraciones del compuesto padre mayores que las del metabolito, dando una idea de un posible uso reciente de p,p´DDT en España (Fernández et al., 2000). En el río Guadalquivir, se hallaron tanto en el agua como en los sedimentos, pesticidas tales como los isómeros del HCH, heptacloro, dieldrín, aldrín, clordano y DDT y metabolitos, en concentraciones, según Espigares et al., (1997), superiores a las máximas consideradas como aptas para el consumo humano, siendo, según la opinión de estos expertos, ineficaces los sistemas de depuración para la eliminación de los residuos de estos organoclorados. También, toluenos clorados han sido detectados recientemente en el río Llobregat (Marti et al., 2005) y PCBs y pesticidas organoclorados (p,p´DDT y p,p´DDE, HCB, lindano) han sido encontrados en el río Tajo a su paso por Toledo (Sánchez-Hernández et al., 2004).

Uno de los pesticidas incluido en este estudio, aún en uso en agricultura es el endosulfán, por eso no es de extrañar, que este compuesto fuera el más frecuentemente encontrado en el análisis de aguas superficiales, de dos estudios independientes, uno realizado en Almería (Fernández Alba et al., 1998), y otro en la Comunidad Valencia (Hernández et al., 1996). En tierras almerienses, los estudios de vigilancia sirvieron para detectar y cuantificar la concentración ambiental del endosulfán alfa, beta y sulfato (Penuela & Barceló, 1998). Estos datos parecen confirmar la denuncia de Seba y Snedaker (1995) que referían al endosulfán como el pesticida más frecuentemente encontrado en la capa superficial de las aguas marítimas en la costa del Atlántico y del Pacífico.

En los estudios recogidos en este apartado, la mayoría de las muestras no excedían los niveles máximos permitidos de residuos de pesticidas impuestos por la UE. A pesar de ello el problema puede estar en la oportunidad de la exposición. Como dice Steingraber (2001) en su libro "Having Faith: An Ecologist's Journey to motherhood", "la exposición tóxica un día crucial del desarrollo puede causar daños permanentes en el feto". Steingraber relata en su

libro, la preocupación a cerca del peligro de vivir en una zona abastecida con agua potable contaminada con pesticidas y los riesgos que pueden afectar a su descendencia. Durante el embarazo de su propio hijo, la ecologista tuvo noticia de que en el agua corriente de Indiana había dos pesticidas: antrazina y alaclor, que se encontraban en concentraciones detectables. Ambos contaminantes estaban presentes en rangos considerados aceptables dentro de la normativa legal. Pero la ordenanza americana sólo investiga si el valor medio de cuatro medidas trimestrales está por debajo de “los niveles máximos de contaminantes” (MCLs). De esta forma, un máximo en primavera, época en la que se usan más cantidad de pesticidas en los cultivos, no es ilegal, siempre que la media anual esté dentro de los niveles aceptables en el curso del año. El problema es, según Steingraber, que el desarrollo embrionario “no entiende de medias anuales”. Vivimos con la confianza de unos niveles máximos seguros de residuos químicos en agua de bebida y en la comida, pero está claro que la arbitrariedad en la definición de los estándares recomendados deja mucho que desear.

En estas situaciones se debería optar por la aplicación del principio de precaución “cautela ante la incertidumbre” y por supuesto, los individuos de mayor riesgo, como las madres, deberían ser informadas de la existencia del peligro de exposición a sustancias peligrosas.

1.4. EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL A COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPS) DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE)

1.4.1. EXPOSICIÓN TRANSPLACENTARIA

Los compuestos organoclorados que incorpora la mujer embarazada representan un problema para el embrión/feto desde el mismo momento en que alcanzan la placenta y la sangre fetal (Falcon et al., 2004). La principal fuente de exposición para la madre puede ser la dieta, pero una vez incorporados al torrente circulatorio, estos residuos pueden acceder al hijo por vía sanguínea (Saxena et al., 1981a; Martínez et al., 1993; Hura et al., 1999; Weisskopf et al.,

2005). Además, la metabolización y movilización durante el embarazo de los compuestos organoclorados persistentes acumulados en la grasa en la madre a lo largo de su vida, pueden suponer una fuente adicional de exposición embrionaria y fetal de más difícil percepción (Sala et al., 2001; Waliszewski et al., 2001; Falcon et al., 2004).

Como hemos visto, los pesticidas organoclorados, lipofílicos y persistentes, tienden a acumularse en los tejidos ricos en grasa (Travis et al., 1988). Desde sus depósitos, entran en un estado de equilibrio, biocentrándose en la parte lipídica de acuerdo a su coeficiente de partición grasa/agua (Rogan et al., 1986b). De esta manera, los tejidos ricos en lípidos actúan como un depósito o reservorio de pesticidas debido a las interacciones físico-químicas que se establecen entre algunos componentes celulares y los pesticidas organoclorados (Mussalo-Rauhamaa, 1991).

Durante el embarazo y la lactancia, el metabolismo lipídico materno es el que determina los niveles de depósito y de circulación de las sustancias lipofílicas (Dorea et al., 2001). Durante esta etapa tan particular de la vida, las tasas de lipólisis y lipogénesis alcanzan un punto crítico (McNamara, 1994). Esto trae como consecuencia que los pesticidas almacenados en tejido adiposo sean liberados a la sangre de acuerdo a su coeficiente de partición y sus propiedades físico-químicas, siendo transportados posteriormente a través de la placenta y finalmente pueden alcanzar el embrión/feto. La transformación metabólica y detoxificación esperable en el hijo es baja, debido a la pobre capacidad depuradora (Waliszewski et al., 2000c) lo cual añade una particularidad aún más preocupante a la exposición durante el embarazo.

La placenta, se establece como el punto de contacto entre la madre y el embrión/feto.

Es bien conocido que la placenta, juega un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo del feto ya que desarrolla multitud de funciones (Ganapathy & Prasad, 2005):

1. Sirve como órgano endocrino, al producir varias hormonas esteroides (estrógenos, progesterona etc.) y hormonas polipeptídicas (gonadotropina coronaria etc.) importantes durante el embarazo.

2. Funciona como un órgano nutritivo mediante la transferencia de la madre al feto de nutrientes esenciales tales como glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, minerales y vitaminas.

3. Es, también, responsable del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre la circulación materna y fetal y juega un papel fundamental en la eliminación de ciertos compuestos de desecho del feto.

Para llevar a cabo estas misiones, la placenta expresa ciertos mecanismos transportadores, que permiten la transferencia de nutrientes y oxígeno de la madre al feto y de productos de desecho y dióxido de carbono del feto a la madre.

La placenta fue considerada durante mucho tiempo como una barrera impermeable que protegía el feto de todos los peligros existentes en el mundo exterior. Desafortunadamente, este modelo no es tan acertado como se suponía. A finales de los años 40, aparecieron los primeros estudios en los que se sugería la posibilidad de que la placenta no fuera tal barrera y que el feto pudiera verse afectado por la exposición materna a compuestos farmacéuticos y algunas sustancias químicas, entre ellas los pesticidas organoclorados, que a partir de ese momento, se ha ido ilustrando en multitud de estudios (O'Leary et al., 1970c; Saxena et al., 1980a; Procianoy & Schvartsman, 1981; Bush et al., 1984; Jacobson et al., 1984a; Rogan et al., 1986b; Longnecker et al., 1999; Reichrtova et al., 1999), que han mostrado la transferencia madre-hijo de los contaminantes maternos.

Hoy día, a pesar de lo que ha avanzado el conocimiento a este respecto, opiniones diversas, algunas veces contradictorias, existen sobre la transferencia de sustancias químicas a través de la barrera placentaria y su posible acumulación en el mismo tejido placentario. Algunos autores mantienen que los pesticidas organoclorados pasan la placenta sin ningún tipo de dificultad y se distribuyen y transmiten de la madre al hijo por difusión simple, de acuerdo a su liposolubilidad y al contenido lipídico del tejido (Bosse et al., 1996; DeKoning & Karmaus, 2000). Entre los defensores de esta teoría están aquellos que han descrito niveles similares (Nair et al., 1996) o incluso mayores de pesticidas

organoclorados en la sangre de cordón cuando se compara con la sangre de la madre (Siddiqui et al., 1981; Cariati et al., 1983).

En contra de esta posición, se encuentran los investigadores que defienden la capacidad de la placenta de bloquear el paso de sustancias dañinas, no sólo debido a la existencia de la misma membrana protectora sino a través de mecanismos más sofisticados como las bombas iónicas y otros mecanismos subcelulares que permiten ejercer cierto control sobre lo que se transporta en sangre (Moore & Persaud TVN, 1993). Se entiende que las sustancias químicas de pequeño tamaño y carga neutra, como por ejemplo los pesticidas organoclorados, tienen la habilidad de atravesar la barrera placentaria ya sea por simple difusión, transporte activo, difusión facilitada, pinocitosis, o filtración (Reynolds & Knott, 1989; Pacifici & Nottoli, 1995). Autores como Ganapathy y Prasad (2005), defienden que los transportadores localizados en la placenta, cuya misión es la de transportar sustratos endógenos, son capaces de interactuar con sustancias exógenas con una estructura parecida a estos sustratos endógenos. Muchas sustancias, al estar en la sangre de la madre, pasan a través de la placenta por medio de estos transportadores hasta llegar al feto. No obstante, también se admite que otros transportadores pueden coger algunas de estas sustancias en el feto y llevarlas hasta la sangre de la madre, previniendo su interacción con el feto. Entre los defensores de esta posición, se encuentran los autores de trabajos en el que los niveles de pesticidas organoclorados en sangre materna resultaron siempre mayores que en sangre de cordón umbilical (O'Leary et al., 1970b; Eckenhausen et al., 1981; Saxena et al., 1981a; Waliszewski et al., 2001), y mayores que en sangre de recién nacido (Eckenhausen et al., 1981).

La experimentación animal avala en parte esta posición. Así, por ejemplo, You et al., (1999) que estudiaron en la rata la distribución y transporte de DDE en el feto a través de la barrera placentaria, observaron cómo la distribución de este pesticida entre los diferentes tejidos del organismo dependía tanto del flujo de la sangre como de su riqueza en grasa. En la rata preñada, el paso de DDE desde la sangre de la madre a la placenta estaba limitado por el flujo de sangre y desde la placenta al feto el limitante era la difusión. De acuerdo con este estudio,

los niveles de DDE en la sangre de la madre estaban por debajo de los de la placenta y su concentración en tejido fetal era tres veces más bajo que en el tejido placentario, sugiriendo que el acumulo en la placenta era un sistema de protección para el feto. Resultados parecidos fueron obtenidos en un estudio previo llevado a cabo por Fang et al., (1977) en el que vieron como el DDT era fácilmente absorbido, transportado en la sangre, parte retenido y parte depositado en el feto de ratas preñadas.

Sea una u otra la teoría más acertada, la conclusión final es la misma: la placenta, a pesar de restringir la transmisión de los compuestos tóxicos circulantes en la sangre de la madre, aún permite el paso de los mismos produciéndose la exposición del embrión/feto. Prueba de ello es la presencia de estos compuestos en sangre de cordón, placenta y en sangre de recién nacido (Lackmann et al., 1999; Ribas-Fito et al., 2002; Shen et al., 2005), aún antes de que se haya producido la exposición alimentaria.

Por último, es importante destacar que en los estudios con ratas de Fang et al., (1977) y You et al., (1999), la ruta principal de exposición a pesticidas organoclorados fue la lactancia a pesar de que ambos estudios admiten la factibilidad de la ruta de exposición transplacentaria. En humanos, autores como Rogan et al., (1986a), Koopman-Esseboom (1994a; 1994b), Nair et al., (1996) y Karmaus et al., (2001a), también encontraron que cuantitativamente la principal fuente de exposición del hijo a pesticidas organoclorados era la lactancia, aunque la exposición durante la embriogénesis y periodo fetal pudo ser más grande debido a la particularidad del desarrollo prenatal (Rogan et al., 1986b; Yu et al., 1991; Jacobson & Jacobson, 1996; Dorea et al., 2001).

1.4.2. LA PLACENTA COMO BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN

Aunque la transferencia del pesticida organoclorado DDT de la madre al feto fue denunciada por primera vez en 1949 (Finnegan et al., 1949), pocos estudios han prestado atención al estudio de la presencia de pesticidas OCs en la placenta. Alrededor de veinte publicaciones han sido realizadas hasta la fecha, incluyendo trabajos realizados en la India (Saxena et al., 1980a; Saxena et al., 1981a; Saxena et al., 1981b; Siddiqui & Saxena, 1985; Siddiqui et al., 2003),

Oriente Medio (Polishuk et al., 1977), EE.UU. (O'Leary et al., 1970b; Cooper et al., 2001) y Europa (Eckenhansen et al., 1981; Bosse et al., 1996; Hura et al., 1999; Reichrtova et al., 1999; Falcon et al., 2004) y entre ellos tres estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, más recientemente (Cerrillo et al., 2005a; Olmos et al., 2006; López-Espinosa et al., 2006a). Ciertamente es que tampoco existen muchos estudios sobre la exposición transplacentaria a otros compuestos organoclorados, tales como PCBs, dioxinas, y dibenzofuranos (Schechter et al., 1996; Pereg et al., 2002; Wang et al., 2004) y aún menos frecuentes los que investigan la exposición transplacentaria a una mezcla de compuestos organoclorados, exceptuando dos estudios recientes de nuestro grupo de investigación (Olmos et al., 2006; López-Espinosa et al., 2006b).

A pesar de que la placenta no ha recibido la atención que merecía a la hora de determinar la exposición transplacentaria a contaminantes, algunos autores (Payan et al., 1995; Iyengar & Rapp, 2001; Kaiglova et al., 2001) han resaltado la utilidad de la placenta como material biológico para estudiar la exposición, ya que puede proporcionar información sobre distintos comportamientos: i) el grado de impregnación de la madre y ii) el nivel de exposición del feto. Además, la placenta es un espécimen biológico que no necesita un procedimiento invasivo para conseguir la muestra y es de fácil obtención (Iyengar & Rapp, 2001).

En este trabajo se eligió estudiar la exposición mediante la cuantificación de los pesticidas organoclorados en tejido placentario bajo la premisa conceptual de que este tejido es indicativo de los niveles circulantes en la madre y por tanto puede proporcionar información sobre la exposición del feto. Además, se utilizó el tejido placentario, por ser éste un tejido muestral abundante y de fácil recolección.

1.4.3. VULNERABILIDAD DEL EMBRIÓN/FETO A LA EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE)

Parece estar consensuado que la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal no tiene por qué ser de idéntico significado y repercusión sobre todos y cada uno de los individuos expuestos. De hecho, como se ha

indicado anteriormente, la edad del individuo en el momento de la impregnación por los contaminantes hormonales es crítica para la manifestación de las consecuencias enunciadas (Colborn y col., 1993). Destacan, como momento crítico en cuanto al efecto biológico entre todas las fases de la vida del individuo, las etapas embrionaria, fetal y la primera infancia.

Se cree que la exposición intrauterina tiene consecuencias de tal magnitud que difícilmente se sospecharía en estudios realizados sobre individuos adultos. Al menos así lo han demostrado la experimentación animal y algunos casos muy concretos de investigación sobre humanos (Bern, 1992). Varios factores explican que el embrión/feto sea más vulnerable a la exposición a compuestos químicos que los recién nacidos o niños:

1. La inmadurez de los mecanismos de detoxificación e inmunoprotección no se desarrollan completamente hasta después del nacimiento (Jacobson & Jacobson, 1996).

2. Los niños tienen reservorios de grasa que no poseen los fetos, y estos reservorios pueden absorber xenobióticos extrayéndolos del torrente circulatorio (Jacobson & Jacobson, 1996). El feto empieza a acumular grasa después de la semana 26 y el compartimento de tejido adiposo es relativamente pequeño, lo que limita la deposición de pesticidas organoclorados, resultando en una mayor concentración de estos compuestos en el cordón umbilical y depósitos en el hígado (Dorea et al., 2001). Los pesticidas en la circulación fetal pueden interaccionar con los tejidos en desarrollo y esto puede explicar eventos que tan sólo tienen una explicación cuando la exposición es fetal (Martínez et al., 1993; Dewailly et al., 2000; Gladen et al., 2000). Los pesticidas absorbidos postnatalmente, por ejemplo, desde la leche materna, pueden ir almacenados en el tejido adiposo del niño y no hacerse disponibles para la interacción metabólica con los receptores adecuados (Dorea et al., 2001).

3. El cerebro fetal puede ser más vulnerable a xenobióticos porque la barrera hemato-encefálica no es operativa hasta más avanzado el desarrollo (Jacobson & Jacobson, 1996).

4. Células en división y migración en el feto pueden ser especialmente sensibles al medio ambiente químico, mucho más que las células en niños (Jacobson & Jacobson, 1996).

Quizás, los dos ejemplos más dramáticos que evidencian la vulnerabilidad del embrión/feto a sustancias exógenas, son las malformaciones congénitas y varios déficits resultantes de la exposición prenatal a un fármaco, la talidomida y la exposición materna a una hormona sintética, dietilestilbestrol (DES), episodios ambos ocurridos durante el siglo XX y que terminaron para siempre con el mito de la existencia de una barrera placentaria impermeable.

La talidomida es el nombre genérico de un fármaco sintetizado por primera vez en Alemania en 1953, utilizada para prevenir las náuseas matutinas en el embarazo. Fue comercializada a partir de 1958 hasta que en 1961 fue retirada del mercado europeo y canadiense, cuando se publicaron los primeros artículos en los que se relacionaba la exposición en el embarazo temprano con diferentes malformaciones en los niños recién nacidos: pérdida o acortamiento de brazos y piernas (McBride, 1961). En el caso particular de la talidomida, el momento de la exposición parece ser más importante que la dosis. La ventana de vulnerabilidad a talidomida es pronto en el embarazo: 35 a 50 días después de la última menstruación, el periodo de la organogénesis. En la semana once el embrión ya está completamente formado y pasa a ser considerado feto, creciendo de forma paulatina hasta el nacimiento (Larsen, 1997; Carlson, 1999). El resultado final de la exposición a este producto farmacéutico fueron al menos 8000 niños identificados con este tipo de malformaciones (Annas & Elias, 1999).

El DES es una hormona sintética prescrita a mujeres embarazadas entre 1947 y 1971 para prevenir el aborto y que hoy se identifica como una causa de cáncer e infertilidad en la descendencia. Antes incluso de que se empezara a emplear como un antiabortivo ya existían estudios en ratones que referían mayor susceptibilidad para el cáncer de mama y deformidades en los órganos reproductivos de ratones recién nacidos (Geschickter, 1939; Greene, 1939). Incluso, estudios en humanos describieron en los años cincuenta, un incremento de riesgo de aborto por la exposición a esta hormona (Dieckmann et al., 1953). Aún así, la hormona fue utilizada como antiabortivo durante más de veinte años.

Como en el caso de la talidomida, el momento de la exposición es tan importante como la dosis (Mittendorf, 1995). Algunas de las malformaciones producidas por esta hormona son tan trágicas como las producidas por la talidomida (desórdenes en el sistema inmune, anormalidades en el tracto reproductivo, hipospadias y criptorquidias en los hijos; y úteros malformados, infertilidad y niños prematuros en las hijas), pero por supuesto el daño no es tan visible como en el caso de la talidomida (Steingraber, 2001).

Es preocupante el hecho del desconocimiento toxicológico de muchas sustancias químicas que puede afectar al desarrollo fetal, en gran parte porque no se ven signos precoces que nos adviertan de ello. Si nuestro objetivo prioritario es proteger el embrión/feto, no es aceptable esperar hasta comprender todo a cerca de cómo una sustancia química puede causar daño. El periodo embrionario/fetal es el periodo en el que hay una mayor susceptibilidad a la influencia de los compuestos orgánicos persistentes, por esta razón, las madres embarazadas y los recién nacidos deben ser considerados el grupo de más alto riesgo (Massey, 2002).

1.4.4. EXPOSICIÓN DEL NIÑO

El desarrollo no concluye una vez terminada la etapa prenatal (embrión y feto) ya que éste continúa durante la fase postnatal (recién nacido, niño y adolescente) hasta que el individuo alcanza la pubertad. Es precisamente esta época de desarrollo, cuando el individuo es más vulnerable a los factores ambientales como es la exposición a sustancias químicas tóxicas. Aunque las consecuencias a largo plazo de la exposición temprana no son bien conocidas, lo cierto es que las observaciones experimentales y los datos provenientes del mundo animal crean el clima apropiado para pensar que el asunto es, cuanto menos, digno de ser estudiado en profundidad.

1.4.4.1. Lactancia materna

La leche materna no es simplemente alimento para el niño sino que se trata de una complicada receta de ingredientes que ayudan y dirigen el desarrollo del niño (Massey, 2002). Pero la leche también puede ser el vehículo de

sustancias tóxicas. La leche humana está en lo más alto de la cadena alimentaria por lo que los contaminantes persistentes se acumulan y biomagnifican a través de la cadena trófica de los alimentos, a cuya cabeza estamos los humanos, y alcanzan a los lactantes que consumirán las mayores concentraciones de estos compuestos.

Una vez dentro del organismo de la madre, los compuestos organoclorados, al ser lipofílicos y persistentes, tienden a acumularse en los tejidos ricos en lípidos (Travis et al., 1988; Waliszewski et al., 2001). Durante la lactancia, la mayoría de la energía almacenada como grasa en el embarazo será utilizada para la síntesis de la leche. Los compuestos químicos acumulados en la grasa de la madre durante su vida son ahora movilizados con la grasa endógena, llevados a la sangre y excretados durante la lactancia (Niessen et al., 1984; Mes et al., 1984; Kanja et al., 1992; Jensen, 1996). Por esta razón, tanto la dieta materna como los depósitos movilizados son una aporte sustancial de pesticidas organoclorados para el niño (Dorea et al., 2001). Eckenhausen et al., (1981) publicaron un artículo en el que demostraron como durante la lactancia, aproximadamente el 30% del DDT almacenado en el organismo pasaba a la leche.

Existen pruebas que demuestran que la exposición a pesticidas es mayor en niños lactantes (Longnecker & Rogan, 2001) y las concentraciones de residuos se ven disminuidas en madres que dan de lactar (López-Carrillo et al., 2001). Karmaus et al., (2001a) sugirieron además que el número de hijos previos de una madre dada disminuye la exposición del nuevo hijo, debido a la limpieza de compuestos persistentes en cada lactancia previa. Teoría corroborada por estudios llevados a cabo en Noruega, Nueva York o la India en los que se detectaron mayores niveles de pesticidas OCs y PCBs en leche de mujeres primíparas que en la de multíparas (Skaare & Polder, 1990a; Nair et al., 1996). No obstante, no siempre se ha establecido la relación entre el número de embarazos y una menor carga endogénica de OCs, como es el caso del estudio llevado a cabo en Huelva por Martínez et al., (1993), si bien es cierto, que esta cohorte presentaba una escasa paridad previa, ya que tan sólo 10 madres tuvieron más de 2 partos, número mínimo de hijos a partir del cual se suele

mostrar la influencia. Eckenhausen et al., (1981) tampoco observaron diferencias en la concentración de pesticidas en la sangre de los niños, atendiendo a si estos habían tomado el pecho o biberón y tampoco vieron diferencias en los niveles de pesticidas en las sangres de las madres, atendiendo a si éstas habían dado el pecho o no.

Ninguna mujer tiene leche exenta de contaminantes, no importa su nivel de formación o económico, no importa lo lejos que viva de los lugares donde la contaminación tiene lugar, y no importa como de cuidadosa ella haya sido con la alimentación (Massey, 2002). Compuestos químicos retardantes de la llama, preservativos de la madera, metales pesados, plastificantes, lubricantes, resinas epoxi, fungicidas, pesticidas, entre otros muchos compuestos, se encuentran en la leche humana (Fitzgerald et al., 2001; Wang et al., 2004; Calafat et al., 2004; Sun et al., 2004; Ursinyova & Masanova, 2005; Chao et al., 2005; Fangstrom et al., 2005; Cerrillo et al., 2005a). Por ello, la contaminación de la leche humana es un buen indicador de la situación ambiental de una zona dada (Martínez et al., 1993).

Por otra parte, la leche de fórmula no está libre de compuestos químicos (Abraham et al., 1994; Cressey & Vannoort, 2003; Mortensen et al., 2005), como tampoco lo está el agua que se usa para mezclarla. Debe recordarse a este respecto el capítulo de esta introducción que presenta estudios llevados a cabo en agua potable en España demostrando que el agua del grifo utilizada por las madres para mezclar con la leche de fórmula, no está libre de contaminantes químicos (García-Repetto & Repetto, 1997; García et al., 1999b; Quintana et al., 2001; Navarro-Blasco & Varez-Galindo, 2005). Tampoco podemos olvidar el envase en el que la leche se prepara, ya que los biberones de plástico (especialmente los hechos con policarbonatos) liberan sustancias químicas que contaminan el líquido que contiene (leche, agua, jugo, etc.) (Mountfort et al., 1997; WWF European Toxic Program Report. April, 2000).

Las madres se enfrentan a una terrible paradoja. A causa de la contaminación interna, los beneficios de amamantar podrían ser contrarrestados con el riesgo de la exposición a sustancias tóxicas bioacumuladas (Massey, 2002). De hecho hay estudios que demuestran que los niveles de determinadas

sustancias xenobióticas en niños son debidos a la lactancia (Rogan et al., 1986a; Gallenberg & Vodcnik, 1989; Jacobson et al., 1989; Jensen & Slorach, 1991; Schantz et al., 1994; Nair et al., 1996; Boersma & Lanting, 2000; Karmaus et al., 2001a) y que la presencia durante la lactancia de estos compuestos puede contribuir a su estado de salud (Reichrtova et al., 1999; Barret, 2001). A pesar de ello, está demostrado que lactar es beneficioso para los niños (Brouwer et al., 1998; LaKind et al., 2000; Ribas-Fito et al., 2003). De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Academia Americana de Pediatría sobrepesaron los beneficios de la lactancia con el posible riesgo por la exposición a estos compuestos en la leche materna y concluyeron que los beneficios de la lactancia prolongada compensan las consecuencias de la exposición química (Brouwer et al., 1999).

Los niños amamantados adquieren ciertas ventajas con respecto a los alimentados por fórmula. La leche materna es una incomparable fuente de elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los niños, proporcionando factores inmunes que incrementan la resistencia a diabetes, alergia y asma (Waliszewski et al., 2002). Esto se ha podido ver en publicaciones de muy diferente origen y metodología. Rogan et al., (1987), estudiaron la presencia de algunos COPs, tales como PCBs y DDE en leche materna y sus consecuencias sobre el desarrollo del niño, destacando que los niños alimentados mediante leche de fórmula tenían una mayor frecuencia de otitis media y gastroenteritis. Estudios más recientes, confirmaron que la lactancia de larga duración estaba asociada positivamente con la mayor inteligencia en adultos (Mortensen et al., 2002). Este estudio también observó el beneficio de una larga lactancia reduce el posible impacto de exposición a p,p'DDE después de ajustar algunas variables socioeconómicas. Ribas-Fitó et al., (2003) opinan que un periodo de lactancia prolongado es beneficioso para el neurodesarrollo de los niños, contrarrestando el impacto potencial de la exposición a estas sustancias químicas a través de la leche materna. Teoría también sostenida por Anderson et al., (1999) que asociaron la lactancia con un mejor neurodesarrollo. En un estudio llevado a cabo en Alemania por Karmaus et al., (2001b), el DDE resultó ser un factor de riesgo para el asma y, al mismo tiempo, la lactancia era

un factor protector contra el asma. En un estudio posterior del mismo grupo de investigación (Karmaus et al., 2003), se volvió a ver que la lactancia conlleva un efecto protector contra el asma, pero no contra la aparición de otras enfermedades como hiper-reactividad bronquial, fiebre, eczema atópico. Llamativamente, el efecto protector era mayor cuando los niveles en sangre de DDE eran menores de 0.29 µg/L, definiéndose así el carácter ambivalente de este tipo de alimentación.

Sin embargo, no todos los estudios han podido asociar positivamente la lactancia materna con una mayor protección contra ciertas enfermedades o con mejoras en el neurodesarrollo de los niños. Tal es el caso del estudio llevado a cabo por Vreugdenhil et al., (2002) en el que, a pesar de que en este estudio se confirmó que los niños que tomaban leche preparada poseían habilidades cognitivas menores que aquellos que lactaban, sin embargo, las diferencias en la vulnerabilidad de los dos grupos estaban más probablemente relacionados con características de los padres y del hábitat que a los beneficios potenciales de la lactancia. Por último, en Nunavick (Ártico de Québec, Canadá), Dewailly et al., (2000) midieron los niveles de OCs en leche materna y de fórmula que era suministrada a niños Inuits y anotaron todas las enfermedades infecciosas sufridas por estos niños durante el primer año de vida, concluyendo que la exposición a OCs pueden constituir un riesgo para la aparición de otitis media. No pudiendo encontrar diferencias clínicas entre el tipo de leche que tomaban los bebés con respecto a parámetros inmunológicos.

1.5. FACTORES QUE CONDICIONAN Y CONSECUENCIAS DE LA EXPOSICIÓN MATERNO-INFANTIL A COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPS) DISRUPTORES ENDOCRINOS (DE)

1.5.1. LUGAR DE RESIDENCIA

Un importante número de estudios han sugerido que el lugar de residencia determina diferencias significativas en los niveles de residuos de pesticidas OCs cuando se investiga la exposición intrauterina. Así por ejemplo, Martínez et al.,

(1993) observaron que las madres onubenses residentes en la campiña y en las cercanías del polígono industrial químico, presentaban mayores niveles de diversos OCs que las residentes en la costa y la costa-campiña, sugiriendo como factor determinante el mayor empleo de estos compuestos en las zonas interiores más industrializadas y agrícolas. De igual manera, en la India, el lugar de residencia de la madre determinaba los niveles de pesticidas en el estudio del grupo de Siddiqui (Siddiqui et al., 1981; Saxena et al., 1981a). También, en otro estudio realizado en México, el principal factor que determinaba la exposición de las madres era el lugar de residencia. Así, las mujeres procedentes del área suburbana, mostraban mayores niveles de pesticidas en su organismo, coincidiendo con el uso más frecuente de los productos químicos en estas áreas (Waliszewski et al., 2000a).

La asociación entre lugar de residencia y exposición intrauterina no ha sido igualmente concluyente en todos los estudios. En el estudio canadiense de Rhainds et al., (1999), no se encontró una correlación positiva entre las concentraciones de DDE en sangre de cordón y el área de residencia, y este es un estudio más en una larga serie de trabajos que no pudieron concluir con tal asociación.

Otros estudios se han centrado en el estudio no de los niveles de compuestos encontrados en función del área de residencia, sino si el riesgo de varios defectos al nacer estaba aumentado o no significativamente con la cercanía de la vivienda de la madre a zonas donde se utilizaban pesticidas. Así, en EE.UU., un estudio de 700 mujeres demostró un incremento en el riesgo de muerte fetal debido a defectos al nacer entre niños cuyas madres vivían cerca de cultivos que fueron tratados con ciertos pesticidas (Bell et al., 2001a). El mayor riesgo fue encontrado entre las mujeres expuestas durante el primer trimestre del embarazo y en aquellas que vivían en una milla cuadrada en torno al lugar donde los pesticidas fueron usados (Bell et al., 2001a). En un estudio realizado en Minesota, el vivir cerca de campos rociados con pesticidas, incrementaba el riesgo de padecer defectos al nacer, incluso si no se trabaja en ellos (Garry et al., 1996). Además, en el oeste de Minesota, los niños concebidos en primavera, cuando el uso de pesticidas era mayor, poseían una mayor probabilidad de tener

defectos al nacer que aquellos concebidos en otro momento del año. Este patrón se mantenía tanto para las familias trabajando con pesticidas como para la población en general. Este patrón no se cumplía en el este de Minesota. Igualmente en comunidades agrícolas de Iowa, Nebraska, y Colorado donde los mismos pesticidas del estudio anterior se usaban, hubo muchas similitudes con los resultados obtenidos en Minesota. Por ejemplo, en Iowa, defectos tales como malformaciones en dedos de las manos o de los pies, brazos o piernas, fueron mayores en las comunidades donde bebían agua contaminada con el herbicida atrazina, pesticida prohibido en Europa pero aun en uso en Estados Unidos (Garry et al., 1996). Sin embargo, en diez condados de California, no se encontró asociación entre la proximidad residencial a lugares donde se aplicaban ciertos pesticidas y la muerte fetal (feto muerto o niño muerto como máximo 24 horas después de nacimiento) (Bell et al., 2001b).

En España, Ribas-Fito et al., (2003) asociaron la exposición transplacentaria a DDE y el retraso en el desarrollo mental y psicomotor a la edad de un año. En Almería, donde la agricultura intensiva favorece el uso de plaguicidas en invernaderos, se observó que el riesgo de padecer criptorquidias era mayor en varones residentes en áreas geográficas con elevados niveles de utilización de plaguicidas, si bien no se pudo establecer la relación de causalidad entre ambas variables (Parrón et al., 2005).

El uso de pesticidas en el interior de la vivienda donde habitan mujeres embarazadas, también ha sido asociado con defectos al nacer, cáncer y otros problemas. En California (EE.UU.), la exposición a pesticidas en la casa fue asociado positivamente con niños que nacieron muertos en el parto debido a anomalías congénitas (Pastore et al., 1997). También en este estado, la exposición transplacentaria a pesticidas usados por las madres en la casa para la desparasitación de animales, fue asociado con tumores cerebrales en los bebés (Pogoda & Preston-Martin, 1997). Por último, en Canadá, un incremento en el riesgo de padecer leucemia linfoblástica en niños, fue asociada con la exposición prenatal de sus madres a insecticidas usados en el interior de la casa o en el jardín (Infante-Rivard et al., 1999).

1.5.2. EXPOSICIÓN OCUPACIONAL DE LA MADRE

Muchos estudios epidemiológicos se han centrado también en el estudio de pesticidas OCs y el lugar de trabajo de las madres, donde la exposición, a menudo, es más alta que en la casa. La exposición ocupacional afecta fundamentalmente a trabajadores expuestos en aplicaciones terrestres y aéreas de estas sustancias en la agricultura, a aquellos que realizan trabajos agrícolas en zonas tratadas con pesticidas o próximas a ellas y a los que participan en su fabricación (García et al., 1998; Cocco, 2002). De especial interés es la exposición ocupacional a pesticidas en los invernaderos, ya que, al ser lugares cerrados, la contaminación ambiental de pesticidas es bastante elevada (Olea et al., 2003). Existen estudios que se centran en estudiar las curvas de disipación de algunos pesticidas, lindano y tres isómeros del endosulfán entre ellos, en el aire de los invernaderos (Vidal et al., 1997) y la absorción de este último en los films de plástico utilizados para cubrir los suelos agrícolas (Nerin et al., 1997). Es interesante hacer notar que este último trabajo demostró que una vez absorbido el endosulfán permanecía en el plástico sin sufrir ningún proceso de degradación, hecho que debe llamar la atención sobre el proceso de reciclado de plásticos y la manipulación laboral de este material contaminado.

Existen también estudios que han relacionado la exposición ocupacional de la madre a pesticidas OCs y defectos en el nacimiento de la descendencia. En Alemania, la exposición ocupacional de embarazadas que estaban expuestas a compuestos químicos preservativos de la madera, entre ellos el lindano, fue relacionado con bajo peso del recién nacido (Karmaus & Wolf, 1995). En Finlandia, los niños nacidos de mujeres empleadas durante su primer trimestre del embarazo en actividades agrícolas en las que se utilizaban pesticidas, tenían dos veces mayor riesgo de tener malformaciones en labios y paladar (Nurminen et al., 1995). En España, las mujeres empleadas en actividades agrícolas similares a las finlandesas mostraban tres veces mayor riesgo de tener niños con los mismos defectos al nacer y además, estos niños tenían un riesgo incrementado de presentar múltiples anomalías, entre ellas: fisuras orales y alteraciones en el sistema nervioso (García et al., 1999a).

También en España, se denunció el riesgo de padecimiento de criptorquidia o no-descendimiento testicular en niños nacidos en áreas de gran empleo de plaguicidas cuando se comparaba con municipios con un consumo significativamente menor y además la asociación entre orquidopexia y niveles de plaguicidas solía incrementarse cuando los niveles de plaguicidas se incrementaban (García-Rodríguez et al., 1996). Nuestro grupo de trabajo, inició en Octubre de 2000 un estudio epidemiológico prospectivo donde se reclutaron recién nacidos varones en el Hospital San Cecilio de Granada. De los 668 niños reclutados se seleccionó una subpoblación de casos y controles para hacer un estudio anidado y se estudiaron un total de 17 pesticidas en el tejido placentario de estos casos y controles. En este estudio, la dedicación de la madre a la actividad agrícola se comportó como un factor de riesgo para la malformación urogenital, aunque no se alcanzó la significación estadística (Olmos et al., 2006). En Dinamarca, los hijos de mujeres trabajadoras en invernaderos y huertos presentaron un mayor riesgo de criptorquidia aunque dicha asociación no fue encontrada en el caso de que los padres tuvieran la misma ocupación (Weidner et al., 1998). Investigaciones en Noruega encontraron una fuerte asociación entre espina bífida e hidrocefalia, criptorquidia e hipospadia, acortamiento de los miembros y el trabajo materno en huertos o invernaderos (Kristensen et al., 1997a). Por último, en otro estudio del mismo grupo de investigación, que investiga las causas de aparición de cáncer en la descendencia de madres expuestas, sugirió que la actividad en la horticultura y el uso de pesticidas se asociaba con mayor riesgo de cáncer a temprana edad, mientras que factores relacionados con la agricultura, fueron asociados con cánceres en la más tardía infancia y temprana adolescencia (Kristensen et al., 1996).

En EE. UU., en un estudio realizado por Pastore et al., (1997), se vio que la exposición ocupacional a pesticidas, especialmente durante los primeros meses del embarazo, tenía una clara asociación con la mortalidad prenatal (debido a anomalías congénitas, complicaciones en el desarrollo de la placenta, cordón y membranas, entre otras causas de muertes). En California, un estudio sugirió que las comunidades agrícolas, en particular las trabajadoras agrícolas presentaban un mayor riesgo de tener niños con acortamiento de los miembros

(Schwartz et al., 1986). En Carolina del Norte, un estudio sobre actividad laboral y prematuridad, bajo/moderadamente bajo peso al nacer, pequeño para la edad gestacional, nacimiento de niños muertos y muerte infantil, sugería que eran las trabajadoras textiles, seguidas de las trabajadoras con equipos eléctricos, las de mayor riesgo, mientras que las dependientas y profesoras eran las que presentaban menor riesgo de cualquiera de las complicaciones en el embarazo (Savitz et al., 1996).

1.5.3. EXPOSICIÓN OCUPACIONAL DEL PADRE

Los padres no están exentos de contribuir al riesgo de malformación neonatal debido a su actividad laboral y nivel de exposición. Así, no son infrecuentes los estudios que han mostrado una asociación entre la exposición del padre en el lugar de trabajo a determinadas sustancias químicas y determinados defectos al nacer. Por ejemplo, en China, uno de los factores de riesgo para la aparición de criptorquidismo en niños fue la exposición parental ocupacional a pesticidas (Wang & Wang, 2002). En un estudio en parejas canadienses en las que el padre mostraba una alta exposición ocupacional a pesticidas, la exposición fue asociada con el fracaso en la consecución a término del embarazo debido a abortos y nacimientos prematuros (Savitz et al., 1997). En Minesota, EE. UU., se detectó un incremento en el número de ciertas anomalías congénitas (circulatorias, respiratorias, urogenitales y muscoesqueléticas) en niños recién nacidos hijos de padres aplicadores de pesticidas (Garry et al., 1996). En Noruega, Kristensen et al., (1997b) comprobaron que la mortalidad prenatal entre niños de padres agricultores o dedicados a cualquier otro tipo de actividad, fue similar en ambos grupos, pero la proporción de abortos fue más alta en embarazadas cuya pareja era agricultor, llevando a pensar en la hipótesis de una asociación entre la exposición parental a pesticidas y las muertes prenatales. Posteriormente, también en la provincia de Granada, Rueda-Domingo et al., (2001) encontraron una asociación, que tendía a ser significativa, entre la ocupación del padre en agricultura y la aparición de criptorquidia en su hijo, concluyendo que el trabajo agrícola puede estar relacionada con la aparición de criptorquidia en el hijo. Por último, en el estudio

llevado a cabo en Granada y referido con anterioridad, al investigar la actividad laboral del padre, se demostró que el riesgo de malformación (criptorquidia y/o hipospadia) era mayor cuanto mayor era la exposición profesional de los padres (Olmos et al., 2006).

También existen estudios que han relacionado la exposición parental a pesticidas durante el embarazo con un aumento en el riesgo de que los hijos padezcan determinados tipos de cáncer, tales como: leucemia, neuroblastoma, tumor de Wilms, sarcoma de Edwing, linfoma de no Hodgkin, tumores cerebrales, cáncer de colon y recto y cáncer de testículo (Zahm & Ward, 1998). El Síndrome de Down, ha sido también asociado con la exposición paterna, entre otras sustancias, a pesticidas. Esta idea es patogénicamente plausible, teniendo en cuenta que se conoce que ciertas sustancias químicas son capaces de impedir que los cromosomas se separen adecuadamente durante la división celular, causa inmediata del Síndrome de Down (Olshan et al., 1989).

La hipótesis más convincente sobre el por qué el tipo de trabajo del padre puede ser un factor de riesgo para la aparición de defectos en el niño al nacimiento, es que los padres expuestos a estas sustancias traen al hogar estas sustancias en su ropa de trabajo y contaminan el medio en el que el embarazo se desarrolla. Por otra parte, la toxicología del semen, un área emergente de estudio puede eventualmente aclarar algunas de estas interacciones relativas a la cuestión de la exposición paterna a sustancias químicas y defectos en el nacimiento ligadas al daño genómico y epigenómico (Steingraber, 2001).

1.5.4. PREMATURIDAD

Un niño prematuro es aquel que nace al menos dos semanas antes del momento previsto. Aquellos que han estudiado el tema hablan de que el aumento en el número de nacimientos prematuros no puede ser debido a cambios en las prácticas médicas, o a la edad materna o al cuidado de la madre. Un tercio de los nacimientos prematuros son atribuidos a infecciones, las dos terceras partes restantes permanecen inexplicados (Nathanielsz, 1996).

Como el útero y la placenta son altamente susceptibles a la interferencia de las sustancias químicas disruptoras endocrinas, los estudios más recientes

se han centrado en la investigación de la exposición medioambiental a estas sustancias y su relación con la prematuridad. La primera publicación en la que se relacionó prematuridad con niveles de pesticidas organoclorados fue realizada en Florida (EE.UU) por O'Leary et al., (1970a). Se encontraron niveles de DDE más altos en la sangre de los niños prematuros que en los nacidos a término. Datos concordantes con los obtenidos en un estudio desarrollado en la India (Saxena et al., 1981b). En Jerusalén (Israel), Wasserman et al., (1982), encontraron que los niños prematuros tenían niveles más altos de PCBs y DDTs y sus metabolitos cuando se comparaban con los niños nacidos a término. En España, en la población de Flix y alrededores (Tarragona), los niveles más altos de los compuestos OCs en general estudiados no se asociaron significativamente con prematuridad o a las semanas de gestación, excepto para el caso del pp'DDE y prematuridad, aunque bien es cierto que los niños prematuros mostraron niveles más altos de todos los OCs en el nacimiento cuando se comparaban con los no prematuros (Ribas-Fito et al., 2002). De igual modo, en EE.UU., el grupo de Lognecker (2001) encontró en una cohorte establecida entre 1959 y 1966 una asociación positiva entre las concentraciones de DDE en sangre de madre, y la probabilidad de tener un niño prematuro siempre y cuando las concentraciones de DDE fueran mayores de 10 µg/l. Longnecker sugirió, que la posible falta de asociación entre prematuridad y niveles de DDE, observada en sangre en los estudios más recientes, se debía a que las concentraciones medias de este compuesto en la población actual estadounidense son menores a 10 µg/l, no dándose por tanto las condiciones ideales para la observación del efecto.

Sin embargo, no todos los estudios han encontrado una asociación positiva entre exposición y efecto. Así, en Brasil, Procianoy y Schvartsman (1981), que estudiaron la posible asociación entre la exposición transplacentaria a DDT y prematuridad, no encontraron diferencias entre los niveles de DDT entre madres que dieron a luz niños a término o prematuros; sin embargo, existía una diferencia significativa en los niveles de DDT en cordón umbilical entre los niños nacidos a término y los prematuros, y también entre los niveles en sangre neonatal en ambos grupos. Por último, en otro estudio en EE.UU., llevado a cabo

en Nueva York (Berkowitz et al., 1996), tampoco pudo asociarse la exposición a DDE o PCBs con la prematuridad, aunque los niveles más altos de DDE se encontraron en los casos de prematuridad.

1.5.5. BAJO PESO AL NACER Y RETARDO EN EL CRECIMIENTO FETAL INTRAUTERINO

Estrechamente relacionada con la duración del embarazo, está el peso del niño al nacer. El aumento rápido en la longitud del feto ocurre antes, en torno al quinto mes de embarazo, que el aumento rápido del peso, que empieza al final del octavo mes del embarazo. Así pues, en el séptimo mes de gestación un feto humano ha alcanzado casi su longitud definitiva pero tan sólo una parte de su peso final (Steingraber, 2001).

Según la OMS, se reserva la denominación de bajo peso al nacer para aquellos recién nacidos con menos de 2.500 gramos. Pero se puede describir el problema de otra forma, ya que muchos recién nacidos nacen pequeños para la edad gestacional, entendiendo como tal, niños cuyo peso está por debajo del percentil diez en la talla (bien por su peso, longitud o circunferencia de la cabeza) para una particular semana de gestación o con un peso y/o longitud al menos dos desviaciones estándar ($\leq -2DE$) por debajo de la media para la edad gestacional, basado en datos de una población de referencia. Concepto diferente a retardo en el crecimiento fetal intrauterino (IUGR) que se refiere a la disminución en la velocidad de crecimiento del feto (Lee et al., 2003).

Como en el caso de prematuridad, el aumento en la frecuencia de presentación de niños a término con bajo peso al nacer no tiene explicación. Se podría justificar, tan sólo en parte, por el incremento en el número de nacimientos múltiples. Sin embargo, entre los nacimientos de un solo niño, las tasas también se han incrementado. La frecuencia está aumentando también entre el grupo de madres que tenían un menor riesgo de dar a luz un niño pequeño para la edad gestacional, es decir, aquellas en el rango de edad de 20-34 años (Pew Environmental Health Commission, 1999). Ya que es bien conocido que alcohol, tabaco y drogas están asociados con bajo peso al nacer

(Day et al., 1990; Shu, 1995), los investigadores empiezan a sospechar que otros factores medioambientales pueden también jugar un papel etiológico.

Algunos estudios han establecido una asociación entre los niveles de determinados pesticidas organoclorados y bajo peso al nacer. El primer estudio en el que se demostró tal asociación, fue el llevado a cabo por O'Leary y sus colaboradores en Florida (EE. UU.) en 1970. Se compararon los niveles de DDT en el suero de recién nacidos con peso bajo y normal y encontraron niveles significativamente más altos en los niños más pequeños (O'Leary et al., 1970a). Posteriormente, en Hamburgo (Alemania) se llevó a cabo un estudio para investigar si la exposición a una mezcla de determinados preservativos químicos utilizados en madera (Policlorofenol, lindano y dibenzofuranos y dibenzo-p-dioxinas policloradas) se asociaba con bajo peso al nacer y menor talla en los niños de madres expuestas durante los tres primeros meses de embarazo. Los resultados demostraron una reducción significativa en el peso y en la talla en los recién nacidos de embarazadas expuestas. Estos resultados no pudieron ser explicados por las diferencias en las semanas de gestación, indicando que los efectos de los tóxicos, podrían resultar en una disminución significativa de talla y peso (Karmaus & Wolf, 1995). En un estudio de casos-contróles llevado a cabo en la India por Siddiqui et al., (2003), se vio que la exposición de mujeres embarazadas a determinados pesticidas OCs (α,γ HCH y p,p'DDE) podía incrementar el riesgo de retraso en el crecimiento intrauterino (IUGR). Un estudio alemán recogió una asociación entre la exposición prenatal a HCB y beta-HCH y bajo peso al nacer (Schade & Heinzow, 1998) y dos estudios estadounidenses publicados recientemente, han relacionado la exposición prenatal a DDE y bajo peso al nacer (Longnecker et al., 2001; Weisskopf et al., 2005). En España, en una población catalana altamente expuesta a HCB, la exposición intrauterina a este compuesto reducía el crecimiento longitudinal intrauterino (Ribas-Fito et al., 2002). En Granada, nuestro grupo de trabajo encontró una asociación entre el número de pesticidas por muestra de tejido placentario y el peso al nacer, siendo mayor el número de pesticidas en aquellas placentas de niños que nacieron con un menor peso (López-Espinosa et al., 2006a) .

También se han publicado numerosos artículos en los que no se ha podido establecer una asociación entre el peso al nacer, semanas de gestación, IUGR, perímetro cefálico y los niveles de determinados pesticidas organoclorados. Tal es el caso del estudio de Procianoy y Schwartsman en Brasil (1981), en el que los niveles de DDT en cordón umbilical estaban correlacionados negativamente con el peso al nacer de los niños; o el estudio llevado a cabo por Rogan et al., (1986b) en Carolina del Norte (EE.UU.), en el que no se vio una asociación entre peso al nacer o perímetro cefálico y niveles de PCBs o DDE en muestras de sangre de cordón y de placenta; o el estudio de Rhainds et al., en Québec (Canadá) en 1999, en el que no se vio una correlación positiva entre las concentraciones de DDE en sangre de cordón y peso al nacer (Rhainds et al., 1999). También en EE.UU., Lognecker et al., (2001), no pudieron establecer una asociación positiva entre las concentraciones de DDE en sangre materna y la probabilidad de tener un niño con pequeño tamaño para la edad gestacional. Tampoco en Groenlandia, Bjerregaard y Hansen (2000), encontraron asociación entre los OCs estudiados y peso al nacer o edad gestacional. En Alemania, Lackmann et al., (1999) no observaron una correlación entre concentraciones de HCB y peso al nacer, aunque sí una tendencia positiva entre concentración de HCB y las semanas de gestación de los recién nacidos. En España, Ribas-Fito et al., pudieron establecer una asociación positiva entre IUGR y los niveles de HCB en sangre de madre y de cordón, como ya se ha dicho con anterioridad, pero no pudieron establecer dicha asociación entre HCB y el peso al nacer o el tamaño de la circunferencia de la cabeza (Ribas-Fito et al., 2002). En Huelva, se describieron niveles mayores de pesticidas OCs entre los recién nacidos con mayor peso y perímetro cefálico al nacer, lo que soporta la idea, según sus autores, de a mayor peso del recién nacido, mayor reserva grasa capaz de almacenar los compuestos liposolubles (Martínez et al., 1993).

1.5.6. ABORTOS ESPONTÁNEOS

El aborto espontáneo, afecta aproximadamente al 15% de los embarazos; y es el responsable de más del 50% de todas las pérdidas del niño que ocurren durante el embarazo, incluyendo los embarazos que ocurren mediante una

preimplantación. La mayoría ocurren durante el primer trimestre del embarazo y son una consecuencia de las anomalías en el cariotipo fetal (Livingston & Poland, 1980; Korrick et al., 2001).

Aunque los compuestos organoclorados que entran en la circulación embrionaria a través de la placenta pueden afectar el desarrollo normal del embrión/feto resultando en desórdenes congénitos y a veces en abortos espontáneos (Nicolopoulou-Stamati & Pitsos, 2001), los datos epidemiológicos en humanos que tratan de establecer esta asociación son limitados y poco concluyentes.

En la India, Saxena et al., (1980a), detectaron niveles más altos de OCs en la sangre materna y en la placenta de madres con abortos espontáneos, seguidos de madres que dieron a luz niños prematuros y por último, niños a término. En un estudio alemán posterior, realizado por Gerhard et al., (1998), más del 20% de las mujeres con abortos repetidos tenían concentraciones más altas de OCs que la población de referencia. Un estudio realizado a un subgrupo de 30 mujeres chinas (15 casos y 15 controles) de un total de 412 mujeres trabajadoras textiles sin una exposición ocupacional a DDT, sugirió un incremento modesto en el riesgo de aborto espontáneo en asociación con los niveles en suero materno de DDE, aunque los resultados deberían ser considerados con cautela (Korrick et al., 2001). En Turquía durante 1955-1957, un grupo de mujeres resultó accidentalmente expuesto al pesticida HCB después de comer alimentos contaminados con este producto. En las embarazadas expuestas, se estableció una fuerte correlación entre las concentraciones de HCB en suero y el riesgo de aborto (Jarrell et al., 1998). Sin embargo, no todos los estudios han podido establecer dicha asociación. En EE.UU., la exposición gestacional a DDT, aparentemente no representaba un mayor riesgo de aborto (O'Leary et al., 1970c). En el sur de California, una población expuesta ocupacional y/o medioambientalmente a pesticidas, no mostró tener un riesgo incrementado de abortos espontáneos, al contrario, presentó un menor riesgo (Willis et al., 1993). Tampoco en Italia se encontró una correlación entre las concentraciones en suero de HCB y abortos espontáneos (Leoni et al., 1986).

1.5.7. MALFORMACIONES

Es sabido que los estrógenos tienen un papel importante en el sistema reproductor masculino. Ya que aunque los estrógenos son considerados hormonas reproductivas femeninas, ejercen una acción muy particular durante el desarrollo fetal masculino. Además, los tejidos de las gónadas masculinas, tienen receptores estrogénicos y tanto la diferenciación sexual masculina como la reproducción son dependientes de un equilibrio perfecto en el cociente andrógenos/estrógenos. Es, por tanto, fácil de entender, que el desarrollo testicular, la esteroidogénesis y otros aspectos reproductivos masculinos son susceptibles de ser alterados por los disruptores endocrinos xenoestrógenicos (Sharpe & Skakkebaek, 1993; Sharpe, 1995; Vidaeff & Sever, 2005).

En el año 2001, Skakkebaek y su grupo, publicaron un estudio en el que propusieron que algunos problemas de salud en el hombre tales como un incremento en la frecuencia de criptorquidia e hipospadias (John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Study Group, 1986; Campbell et al., 1987; Giwercman et al., 1993; Riley et al., 1998; Boisen et al., 2004), la pérdida de función testicular y la caída de la cantidad y calidad de espermatozoides en el hombre (Carlsen et al., 1992; Irvine, 1994; Skakkebaek & Keiding, 1994; Auger et al., 1995; Carlsen et al., 1995; Swan et al., 1997), el aumento de las tasas de cáncer testicular (Spitz et al., 1986; World Health Organization (WHO), 1991; Wilkinson et al., 1992; Adami et al., 1994; Forman & Moller, 1994) y el aumento en la tasa de infertilidad masculina (Swerdloff et al., 1985), junto con el aparente aumento de la reproducción asistida, eran manifestaciones de un cuadro con una base patofisiológica común a la que denominaron Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS). La propuesta del profesor Skakkebaek y su grupo, era que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo, variaciones sutiles de los niveles hormonales podían dar lugar a lesiones que conducían a disfunción orgánica y en última instancia, a enfermedad clínica. La hipótesis patogénica incluye como principal causa factores ambientales o de estilo de vida, entre los que se encuentran sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal, con mayor probabilidad de asociación causal que aquellos otros factores que suponen la acumulación de errores genéticos. Esto no excluye que

ciertas aberraciones cromosómicas junto con una mayor predisposición por la presencia de polimorfismos, específicos potencien el papel de los factores ambientales (Skakkebaek et al., 2001).

1.5.7.1. Criptorquidia

El término criptorquidia proviene de las raíces griegas *kryptos* (oculto) y *orchis* (testículo). En términos generales se considera que un testículo es criptorquídico cuando nunca ha estado en su situación normal en la bolsa escrotal ni se consigue desplazarlo a ella con la exploración física, pero se encuentra en el trayecto normal de descenso, siendo, por tanto, un descenso defectuoso o incompleto del testículo desde su origen retroperitoneal hasta su situación definitiva en el escroto. El concepto engloba situaciones que asocian una alteración en el descenso normal del testículo de una forma uni o bilateral. En general, la localización más frecuente del testículo no descendido es junto al cuello del escroto o inmediatamente por fuera del anillo inguinal externo (Huston et al., 1997).

La criptorquidia es uno de los problemas urológicos pediátricos más frecuentes (Berkowitz et al., 1995; Moller & Weidner, 1999), con una tasa al nacimiento de alrededor del 3-4% en recién nacidos a término y hasta del 30% en prematuros en los que el proceso de descenso normal aún no se ha completado (Garat, 1987; Kaplan, 1993); sin embargo, los testículos descienden en más del 50% de los casos entre las seis semanas y los tres meses de edad. En la población infantil a partir del año de vida (incluyendo pretérminos y recién nacidos a término) se considera una incidencia entre el 0.8% y el 1.1% (Garat, 1987). En adultos se ha descrito una incidencia aproximada del 0.7-1% (Garat, 1987; Berkowitz & Papiernik, 1993).

Los datos de diversas publicaciones, parecen indicar un incremento en el número de criptorquidias en las últimas décadas en países tales como Reino Unido, Dinamarca, o EE.UU. (Chilvers et al., 1984; Campbell et al., 1987; Paulozzi, 1999; Boisen et al., 2004), si bien los datos de aparición son muy variables y de difícil comparación. Además, son pocos los estudios que, usando idéntica definición y técnicas de exploración, ayudan a establecer variaciones

geográficas y/o temporales que permitan establecer hipótesis de exposición medioambiental (Olmos, 2005).

Tres causas diferentes de criptorquidismo han sido determinadas: genética, mecánica, y hormonal. Existe una predisposición genética para el desarrollo de criptorquidia, apareciendo en el 6% de los niños con padres criptorquídicos (Martinetti et al., 1992). Una de las causas de esta enfermedad es la aparición de hernias umbilicales, alteraciones en la musculatura abdominal y otros procesos, que tienden a disminuir la presión intraabdominal e impiden el descenso (Husmann & Levy, 1995). En cuanto a las causas hormonales, es necesario un eje hipotálamo-hipofisiario intacto para el normal descenso del testículo (Olmos, 2005).

Depue publicó un estudio en 1984 en el que hablaba sobre una asociación significativa entre el consumo de medicamentos con actividad estrogénica durante el embarazo y el riesgo de criptorquidismo (Depue, 1984). Normalmente, estos productos farmacéuticos con actividad estrogénica son suministrados en altas dosis, lo que hace que sus efectos sean más fácilmente observables. En cambio, los efectos producidos por la exposición ocupacional y medioambiental a disruptores endocrinos es más difícil de investigar, ya que la sobreexposición a sustancias DE que no poseen origen farmacológico no es usual (Myllynen et al., 2005) y pocos son los estudios dedicados a relacionar la posible asociación entre la exposición medioambiental y/o ocupacional y la aparición de criptorquidia (Olea et al., 1999).

Varios estudios de casos-contrroles anidados han informado sobre una posible relación entre los niveles de exposición intrauterina a pesticidas organoclorados y la aparición de criptorquidia y/o hipospadia en los recién nacidos en Noruega (Kristensen et al., 1997a), en Dinamarca (Weidner et al., 1999), en Alemania (Hosie et al., 2000) y en España (García-Rodríguez et al., 1996; Olmos, 2005). En la publicación realizada por García-Rodríguez y su grupo, en Granada, se observó una asociación entre orquidopexia y los niveles de pesticidas. Estos resultados eran compatibles con la asociación hipotética entre exposición a xenoestrógenos y la inducción de criptorquidismo, aunque los resultados debían ser evaluados con cautela. En el estudio de casos-contrroles

de niños que nacieron con hipospadia y/o criptorquidia, desarrollado por nuestro grupo de trabajo, los resultados mostraron un exceso significativo en el riesgo de aparición de criptorquidia en niños, en relación con la presencia de o,p´DDT, p,p´DDT, endosulfán-I, lindano y mirex, siendo mayor la frecuencia de presentación de estos compuestos entre niños con esta patología que en los controles. Cuando en lugar de la frecuencia, el análisis se centró en las concentraciones alcanzadas por cada pesticida en los niños afectados de la malformación y en sus controles apareados, se observó que para muchos de los pesticidas, las concentraciones medias eran superiores en las placentas de los individuos considerados casos (p,p´DDE, endosulfán-lactona, endosulfán-II, endosulfán-sulfato, suma de endosulfanes, dieldrín y lindano) que en las placentas de los controles. No obstante, la significación estadística se alcanzó tan sólo en el caso de estos dos últimos: dieldrín y lindano. Además, cuando se consideró conjuntamente la exposición a cualquier tipo de pesticida, se apreció una diferencia estadísticamente significativa entre el número de residuos cuantificados en las placentas de los individuos con criptorquidia y/o hipospadia y aquellos sin la malformación congénita (9.34 versus 6.97 pesticidas). Además, la estrogenicidad de la fracción cromatográfica correspondiente a los contaminantes medioambientales acumulados en el tejido placentario es un factor de riesgo para criptorquidia e hipospadia. De esta manera, frente a un 71% de estrogenicidad detectable en los extractos de placentas en los casos, se presentaban tan sólo un 55% de placentas de los controles con niveles detectables de estrogenicidad (Olmos, 2005). Además, como ya se ha visto en un apartado anterior, la ocupación de la madre (Weidner et al., 1998) y la ocupación del padre (Garry et al., 1996; Kristensen et al., 1997a; Wang & Wang, 2002), se asociaron con el riesgo de aparición de criptorquidia.

Sin embargo, en otros estudios, una asociación estadísticamente significativa entre exposición intrauterina a pesticidas organoclorados y la aparición de criptorquidia y/o hipospadia en los recién nacidos no fue encontrada. Tal es el caso de estudios realizados en EE.UU. (Longnecker et al., 2002) y en Colombia (Restrepo et al., 1990).

1.5.7.2. Hipospadia

La fusión de los pliegues uretrales y la canulación del glande del pene en el embrión se produce entre la octava y la catorceava semana de gestación, bajo la influencia de las hormonas androgénicas producidas por los testículos fetales (Moller & Weidner, 1999). La no fusión de dichos pliegues o la falta de una normal canulación del glande conduce a la aparición de hipospadias.

Los datos de aparición de hipospadias al nacimiento varían considerablemente en la literatura, desde 0.37 hasta 41 por cada 10.000 niños y son difíciles de comparar debido a las posibles diferencias en la valoración e inclusión de aquellos casos menos severos (Olmos, 2005).

Estudios en países como Hungría, Reino Unido, Suiza, España, Dinamarca y Finlandia, Nueva Zelanda, EE.UU. y Australia han demostrado un aumento en el número de casos de hipospadias (Matlai & Beral, 1985; Campbell et al., 1987; Giwercman et al., 1993; Paulozzi et al., 1997; Dolk, 1998; Riley et al., 1998; Nelson et al., 2005), sin embargo, estudios realizados en otras regiones de los países anteriormente citados como España, EE.UU., Finlandia, o Reino Unido (Virtanen et al., 2001; Carmichael et al., 2003; Martínez-Frias et al., 2004; Porter et al., 2005), no encontraron dichos incrementos.

Las causas de hipospadias, y las razones para el posible aumento en el número de casos, no han sido identificadas aunque existe un acuerdo en que están envueltos tanto factores genéticos como no genéticos. Dentro de los primeros, es frecuente observar familias de hipospádicos y aunque no se han logrado definir los mecanismos hereditarios, se han encontrado ciertas anomalías en los cromosomas sexuales (Paulozzi et al., 1997; Aschim et al., 2004). Con respecto a las causas no genéticas, una de las hipótesis es, que los contaminantes medioambientales se transfieren a través de la placenta y pueden bloquear la señal bioquímica que inicia la formación del tubo. Es sabido con certeza que la formación de la uretra, que tiene lugar entre la semana once y la catorce, depende de la secreción de testosterona desde los testículos del propio feto en desarrollo. Algunos compuestos sintéticos ampliamente distribuidos en el medio ambiente son capaces de interferir con esta hormona (Paulozzi et al., 1997; Moline et al., 2000).

Las etiologías de la criptorquidia y el hipospadias son compartidas en parte (Akre et al., 1999). Por eso no es de extrañar que, al igual que para el caso de criptorquidia, existe una asociación entre el trabajo de la madre en agricultura y tener un niño hipospádico (Garry et al., 1996; Kristensen et al., 1997a) o una asociación cercana a la significación estadística (Olmos, 2005). Y, también los niveles de pesticidas OCs en sangre de madre han sido asociados con un incremento en el riesgo de aparición de hipospadias (Longnecker et al., 2002), aunque no todos los estudios han sido capaces de demostrar dicha asociación (Bhatia et al., 2005).

1.5.7.3. Espina bífida y anencefalía

Ambas enfermedades son la consecuencia de defectos en el tubo neural, el cual se forma durante las primeras semanas del embarazo. La anencefalía conlleva la pérdida del cerebro y del cráneo y la espina bífida el no cierre de la columna vertebral. Existen razones para pensar que factores medioambientales pueden contribuir a este defecto. Sobre el 95% de los casos ocurren en familias sin historia previa de esta enfermedad. Se sabe que la dieta pobre en fósforo está asociada con defecto en este tubo neural, y la alteración de un gen encargado de cerrar el tubo neural puede resultar en anencefalía. También se sabe que la posibilidad de tener un niño con este problema es mayor en padres que trabajan con determinadas sustancias químicas, entre ellos los aplicadores de pesticidas. Pero, como la dieta, los genes y la exposición ocupacional interactúan para producir defectos en el tubo neural, la etiopatogenia de la enfermedad no es bien conocida (Brender & Suarez, 1990; Sever, 1995; Chen et al., 1996; Botto et al., 1999).

1.5.7.4. Efectos sobre el desarrollo del cerebro

El cerebro se desarrolla en el mes sexto del embarazo. Ambos, el cerebro y la espina dorsal se forman de las tres mismas capas. El cerebro luego añade una cuarta capa cuando las células migran desde dentro hasta fuera de la corteza (Carlson, 1999). Después del nacimiento, el cerebro continúa su

crecimiento durante 2 o 3 años. Por tanto, el sistema nervioso es vulnerable durante el periodo pre y postnatal (Spyker, 2000).

Exposiciones que producen efectos transitorios en el cerebro de los adultos, pueden producir pérdidas irreversibles en el feto (Krimsky, 2000). El cerebro del feto es más vulnerable debido a la falta de grasa corporal. El cerebro posee un 50% de grasa por peso seco, tras el nacimiento, las partes con grasa del cuerpo compiten con el cerebro por atraer sustancias liposolubles, pero durante la mayor parte del embarazo, el feto no posee grasa y engorda sólo durante el último mes del embarazo. Por esta razón, en el feto es más probable el depósito de sustancias liposolubles a nivel encefálico (Suzuki & Martin, 1994; Harry, 1994). Además, el feto es deficitario en los sistemas de detoxificación lo que contribuye a una mayor persistencia circulatoria de los tóxicos liposolubles (Steingraber, 2001).

Durante las primeras semanas de gestación algunas sustancias químicas pueden interferir con la hormona tiroxina (T_4), la cual es producida en la glándula tiroidea de la madre y es necesaria para el desarrollo normal del cerebro. Si la acción de la tiroxina es bloqueada, determinadas funciones cognitivas pueden verse afectadas, tales como la menor inteligencia, el retardo mental, o las anomalías en el comportamiento. Muchas de las sustancias consideradas como disruptoras endocrinas, son capaces de interactuar con la producción y transporte de la hormona T_4 , así como con el enzima que convierte T_4 en T_3 , o bien con la unión de T_3 al receptor. Los efectos adversos en el comportamiento y en la inteligencia debido a la exposición prenatal a pequeñas cantidades de disruptores endocrinos, es difícil de probar, pero tiene muy serias repercusiones sobre el desarrollo (Krimsky, 2000).

Nuestro conocimiento sobre el daño que las sustancias químicas producen en el cerebro es muy limitado. Parte de los problemas vienen por el hecho de que los experimentos con animales no siempre son extrapolables a lo que ocurriría en el cerebro de un recién nacido expuesto a una neurotoxina en particular. Los humanos nacen con un estado de desarrollo del cerebro mucho menor que otros mamíferos, por ejemplo los monos. Las diferencias hacen que la extrapolación en los resultados obtenidos en los experimentos con animales

sea difícil. La ventana de vulnerabilidad también es diferente. Y por supuesto, llevar a cabo experimentos con fetos humanos no es posible (Rodier, 1994). Sin embargo, existe información sobre exposición fetal humana, de forma no intencionada que puede ayudar a entender la gravedad del problema.

El impacto de las sustancias químicas en el neurodesarrollo ha sido estudiado en diversas cohortes, la mayoría de ellas centradas en la exposición a PCBs. En un estudio llevado a cabo por Jacobson y Jacobson (1996), la exposición intrauterina a PCBs en concentraciones ligeramente más altas que las de la población en general, debido al consumo de pescado contaminado procedente del Lago Michigan, fue asociado con un posible impacto en la función intelectual de niños. El grupo de mayor exposición intrauterina presentó una disminución en la capacidad de comprensión lectora y los peores resultados en la estimación del coeficiente intelectual. El estudio concluía diciendo que, aunque la exposición de la lactancia es cuantitativamente más importante que la transplacentaria, sólo se observaron déficits en relación con la exposición intrauterina, sugiriendo que el cerebro del feto en desarrollo era particularmente sensible a estos compuestos.

Con objeto de determinar si la exposición a PCBs, tanto transplacentariamente como a través de la lactancia, afectaba a los resultados del test de Bayle del desarrollo de niños de 6 a 12 meses de edad, se siguió el desarrollo mental de una cohorte de niños desde su nacimiento hasta el año de edad en Carolina del Norte, EE. UU. La exposición transplacentaria a PCBs se asoció con más bajos resultados psicomotores. El estudio de la relación entre exposición transplacentaria a PCBs y los resultados en el IDM (Índice de Desarrollo Mental) demostró objetivamente el efecto deletéreo de la exposición prenatal, pero no pudo asociar la exposición de la lactancia con ningún parámetro. (Gladden et al., 1988). Resultados similares a los de este estudio fueron encontrados por otros autores que relacionaron ligeras disfunciones neurológicas al nacer en aquellos niños que aun teniendo en su organismo niveles de PCBs dentro de la media se situaban en el rango superior (Jacobson et al., 1984b; Rogan et al., 1986b). También en el mismo sentido apuntan los estudios sobre el desarrollo mental y psicomotor de niños expuestos

transplacentariamente a PCBs debido al consumo por parte de las madres de comida contaminada. Tal es el caso de los niños japoneses con más bajos coeficientes intelectuales, apatía y languidez (Harada, 1976), niños taiwaneses con retraso y dificultades conductuales (Rogan et al., 1988) y bajos resultados para el test de Bayley y en la Escala de Inteligencia Wechsler (Rogan et al., 1987).

Para el caso particular de los pesticidas OCs, en un estudio se encontró una asociación entre la exposición a DDE y DDT e hiporeflexia neonatal en estos niños expuestos (Rogan et al., 1986b). En otro estudio posterior, se midió p,p'DDE, entre otros compuestos, en muestras de leche. Los niveles más altos fueron encontrados en madres que daban de mamar a niños con competencias neurológicas dañadas o una excitación inusual (Krauthacker et al., 1998). En el estudio realizado por Gladen et al., (1988) en Carolina del Norte, la exposición transplacentaria a DDE fue asociada con más bajos resultados psicomotores a los 6 meses, pero no a los 12 meses. En España, un estudio llevado a cabo por Ribas-Fito et al., (2003) en Flix y pueblos cercanos (Tarragona), estableció con éxito una asociación entre la exposición transplacentaria a DDE y retraso en el desarrollo mental y psicomotor a la edad de un año; asociación que no se pudo establecer para el caso del HCB. Sin embargo, en Oswego, Nueva York, los niveles de DDE en sangre de cordón fallaron a la hora de predecir la inteligencia de niños a los 12 meses de edad (Darvill et al., 2000).

Como se ha visto en las secciones anteriores, la exposición del niño durante el embarazo y lactancia a DE es un hecho probado y con un soporte observacional de cierta identidad. También se ha tenido la ocasión de referir algunas de las consecuencias derivadas de la exposición materno-infantil a través de algunos ejemplos de estudios que han comparado series de madres e hijos con diferentes hábitos alimentarios, incluida la lactancia.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente estudio se encuadra dentro de los objetivos planteados en el proyecto de investigación **“Increasing incidence of human male reproductive health disorders in relation to environmental effects on growth-and sex steroid-induced alterations in programmed development”** dirigido y llevado a cabo por un grupo multidisciplinar de clínicos, investigadores básicos y epidemiólogos de distintas instituciones, financiados por la Unión Europea (QLK4-1999-01422).

La presente Tesis Doctoral trata de contribuir al esclarecimiento del papel de los disruptores endocrinos como factor de exposición en la población infantil del sureste español.

El objetivo general de este estudio es:

Determinar el grado de exposición medioambiental a disruptores endocrinos (DE) de un grupo de madres e hijos a través del estudio de la placenta.

Los objetivos específicos son:

1.- Aplicar la metodología químico-analítica desarrollada por nuestro grupo de trabajo para la extracción de moléculas organocloradas DE en muestras de placenta.

2.- Determinar la frecuencia de presentación y los niveles medios de pesticidas organoclorados (OCs) en placenta para cada individuo.

3.- Determinar los valores de carga estrogénica total efectiva (TEXB) de las fracciones cromatográficas alfa y beta en placenta.

3.- Analizar la asociación entre las características antropométricas y sociodemográficas de los padres, historia reproductiva, características del embarazo y parto, hábitos alimentarios y medidas antropométricas del niño con los niveles y número de pesticidas en placenta y con la TEXB de las fracciones alfa y beta.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL PARA CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

3.1.1.1. Cámara fría y congeladores

Para el almacenamiento de reactivos y tampones se utiliza una cámara frigorífica (Pedro y López S.A.) con temperatura regulada a 4°C, además de frigoríficos y congeladores convencionales.

Para el almacenamiento de muestras se utiliza un congelador, marca Forma Scientific, con temperatura fijada a -86°C.

3.1.1.2. Pipetas automáticas

Para manipular los reactivos se usaron pipetas con succión y expulsión automática de fluido de la marca Tecnomar (Suiza), modelo R301. Para la realización de los ensayos químicos y bioquímicos se emplearon pipetas de volumen variable de 0-10 μl y 20-100 μl , modelo Microtransferpettor Digital Brand.

Para la preparación de las muestras se utilizó una micropipeta, marca Socorex Isba S.A. (Suiza), de volumen variable comprendido entre 0 y 100 μl .

3.1.1.3. Rotavapor

Para la desecación de las muestras a presión reducida y temperatura controlada se empleó un rotavapor Büchi R-300_R (Büchi, Italia).

3.1.1.4. Balanzas

Se usó una balanza de precisión Mettler 300 y H 35-AR, con capacidad de medición hasta la centésima y décima de miligramo, respectivamente.

3.1.1.5. Disolventes

Se utilizó n-hexano, metanol, 2-isopropanol, ácido clorhídrico y cloroformo, suministrados por Merck.

3.1.1.6. Compuestos químicos patrones

Como compuestos químicos patrones se utilizaron: lindano, aldrín, dieldrín, endrín, mirex, o,p´DDT, p,p´DDT, HCB, metoxicloro, endosulfán-I y endosulfán-II suministrados por Sulpeco (EE.UU.); o,p´DDD y p,p´diclorobenzofenona del Laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania); p,p´DDE, endosulfán-éter, endosulfán-lactona, endosulfán-diol y endosulfán-sulfato de Chem Service (EE.UU).

3.1.1.7. Otro material

Por último, se emplearon diversos equipos de laboratorio entre los que cabe destacar: pipetas de vidrio de diferente volumen, tubos de ensayo, embudos de vidrio, matraces, vidrios de reloj, poters, agitadores mecánicos y otros.

3.1.2. INSTRUMENTACIÓN QUÍMICO-ANALÍTICA

3.1.2.1. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), modelo Waters 501 Millipore, equipado con dos bombas y un inyector modelo U6K con capacidad de carga de 200 μ L. El detector Ultravioleta/Visible del mismo era del tipo Waters 490 Millipore, provisto del programa Millennium Chromatography Manager software.

3.1.2.2. Cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE)

Se trabajó con un cromatógrafo de gases: Varian-3350 (EE.UU) con detector de captura de electrones (^{63}Ni) y el sistema Millennium Chromatography Manager como software.

La columna utilizada fue una columna capilar de metil silicona, para cromatografía de gases (VF-5ms 30m x 0.25mm DF= 0.25 CP894415) de Quadrex (EE.UU).

3.1.2.3. Cromatógrafo de gases/masas (CG/EM)

Se trabajó con un cromatógrafo de gases/masas: Saturn Varian 2100T GC/MS Walnut Creek, CA (EE.UU) con inyector Varian 1177.

Se utilizó una columna de sílice para cromatografía de masas (VF-5ms 30 m x 0.25 DF=0,25 CP894415).

3.1.3. CULTIVOS CELULARES

3.1.3.1. Tests biológicos E-Screen y YES

I.- Incubadora de CO₂ para cultivos celulares

Se emplea una incubadora de CO₂ termoregulada que permite la regulación de la temperatura y la concentración de gases (aire y CO₂). Un ventilador mantiene homogénea la distribución de ambas variables en su interior. La humedad necesaria para contrarrestar la evaporación producida en su interior la proporciona un recipiente que contiene agua destilada.

Se utilizan estufas incubadoras REVCO ULTIMA y ASSAB (Estocolmo, Suecia) modelo T-304. Las experiencias de cultivo se llevan a cabo a la temperatura de $37.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$, en una atmósfera constituida por aire con 5% de CO₂ y 95% de humedad. La temperatura es regulada mediante un termostato electrónico cuya exactitud se sitúa en torno a $\pm 0.05^\circ\text{C}$. La regulación de la presión parcial de CO₂ se realiza mediante un sistema provisto de un sensor (el cual mide la conductividad térmica de la mezcla de gases) que permite detectar los cambios en la concentración de CO₂ siempre que estos sean superiores a un $\pm 0,1\%$. La saturación de la atmósfera con vapor de agua se logra al burbujear el CO₂, inyectado en la incubadora en dos cubetas llenas de agua destilada.

II.- Contenedor de nitrógeno líquido

Las líneas celulares tumorales establecidas utilizadas en este trabajo se almacenan en nitrógeno líquido a -173°C , utilizándose para ello un contenedor de nitrógeno líquido, marca Thermolyne Locator, modelo CY50900.

III.- Cámaras de flujo laminar

Para evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares se utilizan cabinas de flujo laminar vertical y/o horizontal (Flow Laboratories, Irvine, Escocia). Su funcionamiento se basa en hacer circular corrientes de aire con una velocidad máxima de 0.46 m/s a través de un sistema de filtros antes de entrar en la cabina de trabajo. La filtración del aire y el rendimiento del proceso de filtración (99.97 % de retención de todas las partículas mayores de 0,3 μm de

diámetro) garantiza el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

IV.- Microscopios

Para la observación de los cultivos celulares se empleó un microscopio invertido Olympus IMT/201, que a diferencia de los convencionales tiene localizado el tambor con los objetivos debajo de la platina porta-muestras y la iluminación incide por la parte superior. El microscopio está dotado de tres objetivos de diferentes aumentos (x10 x20 y x40) y de un ocular con posibilidad de aplicación de un dispositivo fotográfico con contraste de fases.

V.- Recuento celular

Para el recuento de elementos celulares en suspensión se utilizaron los aparatos siguientes:

1. *Cámara de Neubauer o hemocitómetro convencional.*
2. *Contador automático de células:* Para algunos experimentos de proliferación celular se usó un contador de células Coulter Counter, modelo ZM (Coulter Electronics, Hialeah, FL, Estados Unidos) para el análisis automatizado del número de núcleos presentes en las suspensiones celulares estudiadas.
3. *Lector de placas de densidad óptica:* Para algunas experiencias de proliferación celular se empleó conjuntamente con lo anterior un lector densitométrico (Titertek Multiskan modelo MK11, ICN, Flow) que mide de forma automática la coloración existente en las placas de cultivo (en nuestro caso de 96 pocillos con fondo plano).

VI.- Lector de placas

Para las experiencias de proliferación celular en el ensayo YES, se empleó un lector de platos Labsystem Multiskan Multisoft que mide de forma automática la coloración existente en las placas de cultivo.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

3.2.1.1. Población potencialmente elegible

Con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos, en Octubre de 2000 se inició en el Hospital Clínico San Cecilio de Granada un estudio epidemiológico observacional con objeto de investigar la frecuencia de presentación y concentración de 17 pesticidas organoclorados bioacumulados en el tejido placentario, sangre de cordón y sangre de madre, así como la exposición a disruptores endocrinos mediante la estimación de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) en mujeres que venían a dar a luz al hospital.

La cohorte quedó constituida, por un total de 668 varones recién nacidos, que fueron reclutados gracias a la actuación del Servicio de Ginecología del Hospital Clínico San Cecilio.

El estudio incluía toma de muestras biológicas, exploración clínica y encuestas en el curso del seguimiento del recién nacido hasta los 6 meses de edad:

-En el momento del parto: tejido placentario, sangre de la madre y sangre de cordón umbilical. Se realizó una encuesta de los 0 meses a los padres y el examen físico al niño.

-A los tres meses: sangre del niño y leche materna. Se pasó una encuesta de los 3 meses a la madre y se le hizo el examen físico al niño.

-A los seis meses: se realizó a la madre la encuesta de los 6 meses sobre la salud de su hijo.

3.2.1.2. Población de estudio

De la población reclutada en la cohorte fueron seleccionados 308 sujetos, para la presente Tesis Doctoral, ya que cumplían los requisitos necesarios:

1.- Consentimiento informado: los padres del niño fueron informados de los objetivos y procedimientos del estudio para solicitar su participación. La colaboración en el estudio significaba responder al cuestionario, consentir que se extrajera información de su historia clínica y acceder a la toma de muestras de sangre de la madre, sangre de cordón umbilical y placenta.

2.- Disponibilidad del cuestionario realizado a la madre.

3.- Disponibilidad del examen físico del niño.

4.- Disponibilidad de las muestras biológicas descartándose aquellos individuos que, por razones ajenas a la voluntad del investigador o al personal clínico, no se pudo obtener la muestra biológica para su procesamiento o bien hubo una pérdida de las muestras biológicas, por fallos puntuales en el proceso de transporte, identificación y almacenamiento.

3.2.2. MUESTRAS ANALIZADAS

Atendiendo a las razones anteriormente expuestas, el tamaño final de la población fue de 308 sujetos, de los cuales se poseía toda la información necesaria para llevar a cabo este estudio: principalmente la encuesta a los padres a los cero meses y la presencia de muestras biológicas en el momento del parto (tejido placentario y sangre de cordón umbilical).

Para la realización del presente estudio se contó con las siguientes fuentes de información:

1. La recogida de datos se realizó mediante un cuestionario epidemiológico (Anexo I) llevado a cabo por un encuestador entrenado, el cual contactó con las madres tras su ingreso en el hospital, para confirmar su participación y responder, durante su estancia en el centro, a una entrevista personal estructurada cuyas secciones serán comentadas más adelante. La encuesta epidemiológica aportó información sobre características antropométricas, sociodemográficas, reproductivas, dieta y hábitos de vida.

2. Historia clínica del niño y de la madre, que aportó información sobre tipo de parto y características antropométricas del recién nacido.

3. Examen físico del niño, que aportó información sobre su salud.

4. Resultados de los análisis químicos de tejido placentario y el ensayo biológico de las mismas muestras de placenta.

3.2.3. METODOLOGÍA QUÍMICO ANALÍTICA

3.2.3.1. Extracción de las muestras

De los distintos procedimientos de extracción, el más utilizado habitualmente se basa en la separación por cromatografía de adsorción en columna, utilizando distintos adsorbentes (alúmina, carbón activado, sílica gel, sephadex, etc., o mezcla de ellos) y eluyentes como éter de petróleo, éter etílico, hexano, etc. Esta metodología permite eliminar prácticamente la totalidad de las sustancias interferentes. En este trabajo, para la extracción de los xenoestrógenos a partir de las muestras de tejido placentario, se desarrolló una metodología basada en el método descrito por Okond´ahoka (Okonda`Ahoka et al., 1984) modificado y validado por nuestro grupo de trabajo (Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004; Olmos et al., 2006; López-Espinosa et al., 2006a). El método de extracción es el siguiente:

1. Se deseca alúmina Merck 90 durante 4 horas a 600°C.
2. Se pesan 2 g de alúmina y se ajusta a un grado de hidratación del 5%.
3. Se rellena una columna de vidrio Pyrex, de 6 mm de diámetro interno para cromatografía, con la alúmina preparada.
4. Se pesan 0.4 g de la muestra de tejido placentario, mantenida hasta su procesamiento a una temperatura de -86°C.
5. Dicha alícuota de tejido placentario se homogeniza en un homogenizador de pistón con 1 mL de hexano.
6. Se vierte el extracto orgánico sobre la parte superior de la columna de cromatografía de vidrio Pyrex.
7. Se añaden 20 mL de hexano a través de la columna y el eluido se recoge en un matraz de fondo redondo.
8. El proceso se repite cuatro veces (1.6 gramos de placenta)
9. El eluido se concentra en el rotavapor hasta un volumen final de 1 mL, cuidando de no llegar a sequedad.

10. El extracto obtenido se deseca completamente en corriente de nitrógeno.

3.2.3.2. Determinación de lípidos totales

Para expresar los niveles de residuos químicos por gramo de grasa se procedió a la determinación de los lípidos totales de cada una de las muestras por un método gravimétrico previa extracción líquido-líquido con una mezcla compuesta por cloroformo:metanol:ácido clorhídrico (Capilla, 1979).

El método de determinación es el siguiente:

1. Se pesa 0.1 g de la muestra, de iguales características a la utilizada para determinar el residuo químico, y se trituran en un homogeneizador con 10 mL de la mezcla extractora de composición cloroformo:metanol:ácido clorhídrico en una proporción de 200:100:1.

2. El extracto se distribuye en tubos con tapón de teflón, se añade 5 mL de ácido clorhídrico 0.1M y tras agitar vigorosamente se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

3. La capa etérea se trasvasa a un matraz previamente tarado y a la capa acuosa se le añade 5 mL de la mezcla extractora y se vuelve a centrifugar recogiendo de nuevo la capa etérea. Los disolventes se evaporan a presión reducida en el rotavapor a 50°C y la humedad se elimina en estufa. Se deja enfriar los matraces en el desecador y se pesan estos con los lípidos extraídos.

4. La cantidad de materia grasa que tiene la muestra viene definida por la siguiente expresión:

$$\% = \frac{P_2 - P_1}{P_0}$$

P_2 = peso en gramos del matraz seco.

P_1 = peso en gramos del matraz con la materia grasa.

P_0 = peso en gramos del tejido placentario.

3.2.3.3. Purificación de las muestras mediante HPLC

De acuerdo con los trabajos precedentes de nuestro grupo de investigación, se aplicó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa eficaz para la separación de moléculas organocloradas con actividad estrogénica de compuestos hidrosolubles (hormonas naturales y aditivos y monómeros de plásticos como los bisfenoles y alquilfenoles) que permitió diferenciar la actividad hormonal de diferentes compuestos presentes en la misma muestra (Brotons, 1994; Valenzuela, 1996; Rivas et al., 2001; Olmos et al., 2006). Se utilizó, para ello, el cromatógrafo líquido de alta resolución Watters modelo 501 Millipore (detectores UV-visible Watters modelo 490 Millipore: longitud de onda 280 nm, sensibilidad o rango (AUFS): 0.1; tiempo de salida (sec): 0.3).

- La fase móvil está constituida por dos fases: Fase A: n-hexano; Fase B: n-hexano-metanol-isopropanol (40:45:15 v/v/v).
- El programa de gradiente está basado en el método de Medina (Medina & Sherman, 1986) con algunas modificaciones.
- Volumen de inyección y loop: 200 µl.
- Procesador de datos: Millennium Chromatography Manager Software

Las ventajas más importantes que presenta este procedimiento en relación con los métodos convencionales son su mayor rapidez, mejor eficacia y precisión, la capacidad para monitorizar las condiciones cromatográficas y la posibilidad de automatizar los análisis. El residuo seco procedente de la extracción se resuspende en 800 µl de hexano utilizándose 200 µl del mismo en cada inyección (4X200 µl). Los extractos eluyen mediante un gradiente de concentraciones con la fase móvil a un flujo de 1.0 mL/min. Las condiciones de trabajo son: t = 0 min, 100% fase A; t = 17 min, 60% fase A; t = 25 min, 100% fase B; t = 32 min, 100% fase A.

Las fracciones obtenidas se identificaron como:

1. Fracción alfa que se colecta durante los 11 primeros minutos y contiene los compuestos organohalogenados.
2. Fracción x que se colecta entre los minutos 11 y 13

3. Fracción beta que se colecta entre los minutos 13 y 25 y contiene las hormonas naturales y otros compuestos no halogenados tipo alquilfenoles y bisfenoles.

Cada una de estas fracciones se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno con sumo cuidado para evitar posibles pérdidas. La fracción alfa se disuelve en 1 mL de hexano del que se separan dos alícuotas: 0.9 mL se ensayan en el test biológico y 0.1 mL, que tras desecarse de nuevo, se marcan con el patrón interno definido (p,p'-diclorobenzofenona) y se inyectan en el cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE) para la identificación y cuantificación de los compuestos químicos investigados.

3.2.3.4. Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE)

El método utilizado para determinar el residuo de pesticidas organoclorados fue la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE). Ello se debe a que las moléculas de los mismos contienen en su estructura átomos de cloro y responden muy bien a dicho detector. Las condiciones de trabajo fueron: DCE a 300°C; inyector a 250°C; Programa: T^a inicial 130°C (1 min); 20°C/min hasta 150°C; 10°C/min hasta 200°C; 20°C/min hasta 260°C (20 min). El gas portador fue nitrógeno a un flujo de 30 mL/min y el gas auxiliar nitrógeno a un flujo de 40 mL/min. El volumen de inyección fue 1 µL.

Con objeto de que el análisis cromatográfico fuese cuantitativo se siguió el método del patrón interno. Para ello, se seleccionó un compuesto químico cuyas características analíticas permitieran un comportamiento similar al de las moléculas a analizar, con un tiempo de retención situado en el punto intermedio del cromatograma realizado con las sustancias problema, con una elevada calidad analítica y un grupo de pureza superior al 99 %. La reproducibilidad para el patrón interno 4,4'-diclorobenzofenona (DCBF) fue excelente y la curva de calibrado ($y = 3 \cdot 10^6 x + 3 \cdot 10^6$) tuvo un ajuste $R^2 = 0.992$. El tiempo de elución de la DCBF en el cromatograma fue de 10.167 minutos.

La determinación de los límites de detección de los compuestos a estudiar se estableció de acuerdo con la propuesta de Long y Winefordner (1983). Por

último, para la realización de las curvas de calibrado y el cálculo del factor de respuesta se utilizó la técnica del patrón interno de acuerdo con la metodología descrita anteriormente por nuestro grupo (Rivas, 1999). Los valores del ajuste lineal de los datos experimentales pusieron de manifiesto la precisión del método desarrollado.

Los tiempos de retención de los 17 compuestos químicos analizados se muestran a continuación, junto con los correspondientes parámetros que definen las curvas de calibrado, coeficientes de correlación (R^2) y límite de cuantificación de los pesticidas organoclorados en cromatografía de gases.

Compuesto químico	TR (min.)	Curva de calibrado	R^2	Límite de cuantificación (ng/ml)
o,p' DDT	12.365	$y = 6.883 x + 0.073$	$R^2 = 0.982$	1.0
p,p' DDT	13.100	$y = 6.607 x + 0.011$	$R^2 = 0.996$	1.0
o,p' DDD	11.629	$y = 3.256 x + 0.175$	$R^2 = 0.981$	1.0
p,p' DDE	11.501	$y = 7.405 x + 0.199$	$R^2 = 0.973$	1.0
Metoxicloro	14.455	$y = 1.518 x + 0.084$	$R^2 = 0.998$	1.0
Mirex	16.544	$y = 2.224 x + 0.114$	$R^2 = 0.991$	1.0
Lindano	8.318	$y = 5.619 x + 0.321$	$R^2 = 0.918$	0.5
4.1.1.1.1.1 HCB	7.782	$y = 10.83 x + 0.067$	$R^2 = 0.983$	0.5
Aldrín	10.068	$y = 0.189 x - 0.074$	$R^2 = 0.953$	1.0
Endrín	12.150	$y = 0.197 x - 0.036$	$R^2 = 0.970$	3.0
Dieldrín	11.725	$y = 7.411 x + 0.197$	$R^2 = 0.950$	1.0
E-I	11.250	$y = 9.957 x + 0.072$	$R^2 = 0.994$	0.5
E-II	12.335	$y = 5.600 x + 0.267$	$R^2 = 0.989$	2.0
E-éter	9.105	$y = 2.689 x + 0.543$	$R^2 = 0.974$	0.1
E-lactona	10.604	$y = 4.716 x + 0.349$	$R^2 = 0.978$	0.1
E-diol	10.946	$y = 0.269 x - 0.273$	$R^2 = 0.856$	0.5
E-sulfato	13.122	$y = 7.222 x + 0.109$	$R^2 = 0.980$	0.5

E=Endosulfán. TR=Tiempo de retención.

3.2.3.5. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

Todas las determinaciones cromatográficas basadas en la técnica de cromatografía de gases con detector de captura de electrones fueron confirmadas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Las condiciones de trabajo del CG/EM fueron: Temperatura del horno: 50°C (2min),

30°C/min hasta 185°C (1 min), 2°C/min hasta 250°C y a 30°C/min hasta 300°C (5 min); Temperatura del inyector: 250°C; flujo del inyector: 1ml/min; Temperatura de la trampa de iones del espectrómetro de masas 200°C; Temperatura del colector 50°C; Temperatura de la línea de transferencia 280°C; Voltaje de modulación axial 3.8 volts; gas portador helio (pureza 99.999%) y volumen de inyección 2 µL.

A continuación se presentan los tiempos de retención.

Pesticida	Tiempo de retención (min)
o,p' DDT	24.433
p,p' DDT	26.996
o,p' DDD	21.925
p,p'DDE	21.504
Metoxicloro	31.482
Mirex	34.633
Lindano	11.741
HCB	10.892
Aldrín	15.999
Endrín	23.102
Dieldrín	21.755
E-I	20.084
E-II	23.880
E-éter	13.332
E-lactona	14.409
E-diol	23.500
E-sulfato	26.554
DCBF (PI)	16.559

E=Endosulfán.

3.2.4. METODOLOGÍA BIOLÓGICA

3.2.4.1. Test biológico E-Screen

I.- Líneas celulares

Se utilizó la línea celular de cáncer humano MCF-7. Esta línea fue establecida por Soule y colaboradores (1973) a partir de un carcinoma de mama humano. Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuido a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo (Horwitz et al., 1978) que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos (Lippman et al., 1986). La línea celular MCF-7 presenta, además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre los cuales se encuentran los andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D3, hormonas tiroideas, prolactina, insulina, calcitonina y factores estimuladores del crecimiento celular (Lippman et al., 1986).

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

II.- Experimentos de proliferación celular: Test E-Screen

El test E-Screen se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Soto (Soto et al., 1992) y modificada por Villalobos (Villalobos et al., 1995). Las células MCF-7 en confluencia son tripsinizadas y alícuotas de esta suspensión se siembran en placas de 24 pocillos a concentraciones iniciales de 20.000-40.000 células por pocillo en medio de mantenimiento, medio mínimo esencial con sales de Earle y con rojo fenol, DMEM (+RF), suplementado con el 5% de suero bovino fetal. Una vez que las células se adhieren al soporte plástico de la placa (generalmente 24-48 horas) se retira el medio de mantenimiento y se añade medio experimental desprovisto de rojo fenol y suplementado con el 10% de suero humano desprovisto de estrógenos, CDHuS. El estradiol 17- β y las alícuotas de las fracciones alfa y beta se añaden al medio de cultivo. El ensayo

finaliza a las 144 horas de subcultivo (fase exponencial) tras la aspiración del medio y la fijación de las células para la aplicación de la técnica de la sulforrodamina-B, pudiendo, finalmente, compararse la proliferación celular inducida por el estradiol y las alícuotas de las fracciones alfa y beta.

III.- Evaluación de la estrogenicidad de los extractos de tejido placentario: fracciones alfa y beta

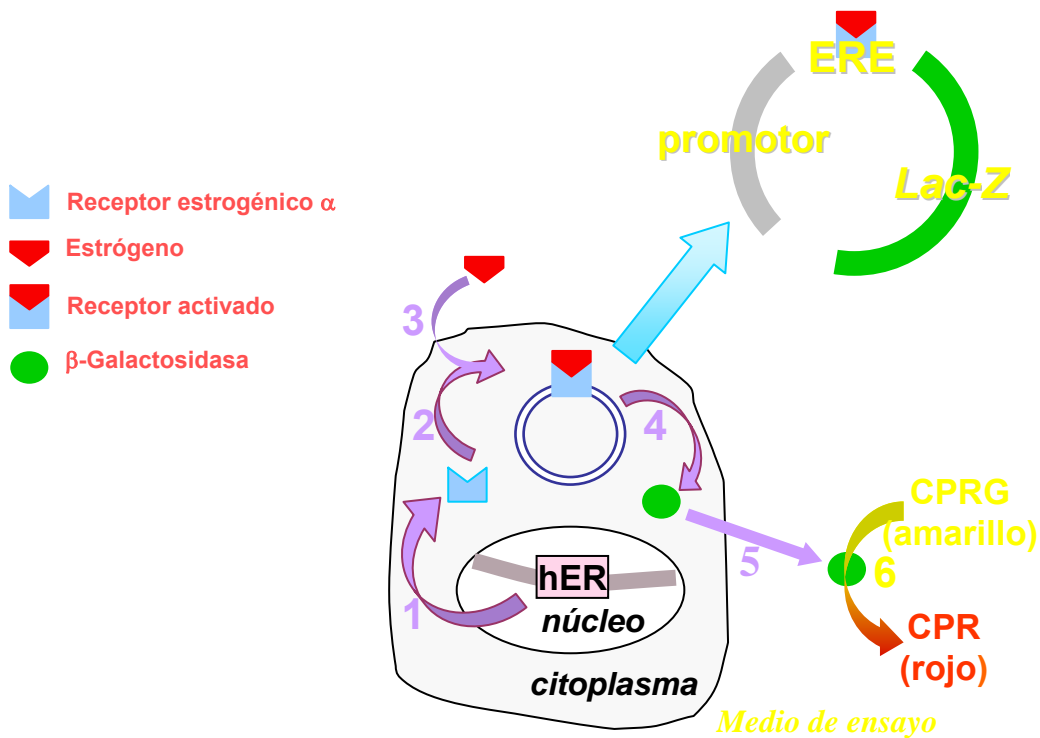
Las fracciones cromatográficas alfa y beta obtenidas por cromatografía líquida preparativa se ensayaron en el ensayo biológico E-Screen para determinar la carga hormonal correspondiente a cada fracción. Para ello, los extractos secos y duplicados de ambas fracciones se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo experimental suplementado con el 10% CDHuS y se agitaron con un vortex durante, al menos 5 minutos. Posteriormente las fracciones se esterilizaron con filtro de tamaño de poro de 0.22 μm y se realizaron diluciones en medio de cultivo 1:1, 1:5 y 1:10 con objeto de poder asegurarse que efectos tóxicos de las muestras no enmascararan actividades estrogénicas o antiestrogénicas. Las diluciones obtenidas se sometieron, finalmente, al test junto a grupos celulares no tratados (control) y a grupos celulares expuestos a estradiol-17 β a concentración 10^{-10} pM.

La actividad biológica de las muestras de tejido placentario extraídas y testadas en el ensayo E-Screen permiten cuantificar el efecto hormonal estrogénico y pueden ser transformada en *unidades equivalentes de estradiol* (Eeq), es decir, en la concentración de estradiol que produciría un efecto proliferativo similar. Este concepto ha sido referido como carga estrogénica total efectiva (TEXB) (Rivas et al., 2001), ya que asigna un valor de estrogenicidad a las muestras biológicas y convierte un marcador de exposición en un marcador de equivalencia biológica y de efecto biológico (Olea et al., 2002). En este estudio nos referiremos a la TEXB alfa o beta según nos refiramos a una u otra de las fracciones cromatográficas antes referidas.

3.2.4.2. Test biológico YES

I.- Levaduras transfectadas con el receptor estrogénico humano

El YES fue desarrollado por el departamento de genética de investigaciones de Glaxo Ltd. para la identificación de sustancias químicas estrogénicas que interactúen con el hER α (receptor estrogénico humano alfa) y fue descrito por primera vez por Routledge y Sumpter (1996). En este sistema, la secuencia del DNA del hER α fue integrado dentro del primer cromosoma de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). El hER α integrado se expresa en la levadura (1) y es capaz de unirse al elemento de respuesta estrogénico (ERE) que forma parte de un promotor híbrido que se encuentra en el plásmido. Este también contiene el gen portador Lac-Z, por lo que tras la unión se provoca la expresión del plásmido (2). La activación del receptor (3), por la unión de un ligando, causa la expresión del gen portador Lac-Z (4), el cual produce la enzima β -galctosidasa. Este enzima es secretado dentro del medio (5), donde actúa para convertir el substrato cromogénico clorofenol rojo- β -galactopiranosida (CPRG), que de amarillo (color inicial) pasa a rojo clorofenol (color final), cuya absorción es medida en el lector apropiado.



II.- Evaluación de la estrogénicidad de los extractos de tejido placentario: fracciones alfa y beta

El test YES fue llevado a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Routledge y Sumpter (1996a). De forma resumida, 50 mL de medio de crecimiento fueron incubados con 125 μ l de 10 \times stock de levaduras concentrado y dejado crecer durante toda la noche en un agitador orbital a 28°C hasta turbidez (absorbancia a 640 nm de 1.0). El medio de ensayo está constituido por 50 mL de medio de crecimiento, clorofenol rojo- β -D-galactopiranosidasa (10 mg/L, CPRG, Boehringer Mannheim, East Sussex, UK) y 2 mL del cultivo de levaduras que se han incubado durante toda la noche.

Los extractos secos de las fracciones alfa y beta, purificadas mediante el HPLC son diluidas en etanol. Alícuotas de 200-400 μ l de las diluciones son transferidas a placas de 96 pocillos, con fondo plano y se deja evaporar. Todas las placas incluyen una fila de controles de etanol y una fila de medio de ensayo

sin levaduras (blancos). A cada pocillo exceptuando los blancos, se le añade un volumen de 200 µl del medio de ensayo que contiene las levaduras. Para minimizar la evaporación durante el tiempo de incubación, la fila más externa de las placas, donde no hay muestras a testar, se rellenan con agua destilada.

Las placas son selladas con cinta de autoclave y agitadas vigorosamente durante 2 minutos en un agitador antes de incubar a 32°C en una caja humidificada durante 72 h. Durante este periodo son agitadas en dos ocasiones, a las 24h y a las 71h. Las placas son leídas espectrofotométricamente a 540 nm (color) y 620 nm (turbidez) usando un lector de placas Labsystem Multiskan Multisoft. Los datos en las gráficas se corrigen por turbidez y la expresión de *Lac-Z* en los controles que tan sólo contienen etanol

$$\text{Absorbancia corregida} = \text{test}_{540\text{nm}} - \text{test}_{620\text{nm}} + \text{control}_{620\text{nm}} - \text{control}_{540\text{nm}}$$

Los ensayos se hacen por duplicado y los experimentos se repiten dos veces para cada muestra.

3.2.5. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO

El análisis epidemiológico de la información recabada por medio del cuestionario, del examen físico de los recién nacidos, el análisis químico y el ensayo biológico del tejido placentario, se centró fundamentalmente en:

1. Describir las características de la población de estudio
2. Describir los niveles/número de pesticidas organoclorados y carga estrogénica de las fracciones alfa y beta de los tejidos placentarios
3. Estudiar la relación entre los niveles de pesticidas organoclorados o de la carga estrogénica y algunas variables de los padres y del recién nacido
4. Estimar el riesgo asociado a la presencia en placenta de determinados niveles de pesticidas y carga estrogénica de las fracciones alfa y beta.

3.2.5.1. Variables de la madre

I.- Variable edad

- *Edad de la madre en el parto*: Variable cuantitativa continua. Esta variable se recategorizó posteriormente en las siguientes categorías para realizar el análisis estadístico: ≤ 32 y > 32 años.

II.- Variables referentes a las características antropométricas

- *Peso antes del embarazo*: variable cuantitativa continua expresada en Kg.
- *Peso en la última visita durante el embarazo registrada*: variable cuantitativa continua expresada en Kg.
- *Ganancia de peso durante el embarazo*: variable cuantitativa continua, recodificada para el análisis estadístico en dos categorías (≤ 12 Kg y > 12 Kg)
- *Índice de masa corporal o de Quetelet (IMC)*: variable cuantitativa continua calculada dividiendo el peso de la mujer en Kg antes del embarazo entre la talla en m al cuadrado. Se recategorizó posteriormente en dos categorías teniendo en cuenta como valor de corte la media (< 25 y ≥ 25 Kg/m²).

III.- Variables referentes a las características sociodemográficas

- *Estado civil*: Variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: casada/ conviviendo con su pareja/ soltera.
- *Municipio de residencia durante el embarazo*: variable categórica nominal policotómica, con tantas posibles categorías como municipios figuran en el censo correspondiente a la provincia de Granada. Esta variable se recategorizó posteriormente, en los siguientes grupos: municipios rurales (aquellos con menos de 10.000 habitantes)/ municipios urbanos (aquellos con más de 10.000 habitantes).
- *Escolaridad de la madre*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: sin estudios o estudios primarios/ medios (BUP) o formación profesional (FP)/ diplomatura o estudios superiores.
- *Actividad laboral*: variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como profesiones afines. Posteriormente fue recodificada en tres categorías:

hogar/ agricultura/ otros para el análisis bivariado y en dos: agricultura/otros, para el análisis multivariado.

- Percepción de la exposición a productos químicos durante el trabajo: variable categórica dividida en dos grupos: sí/no.

IV.- Variables referentes a las características reproductivas de la madre

- *Edad de la menarquia*: variable cuantitativa continua expresada en años completos.
- *Paridad*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: primípara y multípara.
- *Número de hijos*: variable cuantitativa continua.
- *Utilización de anticonceptivos hormonales*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Tratamiento de infertilidad*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Tiempo en que deja los anticonceptivos hasta que se queda embarazada*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: menos de dos meses/ 2-4 meses/ 5-6 meses/ 7-9 meses/ 10-12 meses/ 1-2 años/ más de 2 años.
- *Presencia de enfermedades durante el embarazo*: variable categórica nominal policotómica con las categorías: sí/no.
- *Pérdida de líquido amniótico*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Nauseas y/o vómitos*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Hiperémesis (vómitos patológicos)*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Hemorragia vaginal*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no. Esta variable se recategorizó por trimestres (primer trimestre/ segundo trimestre/ tercer trimestre).
- *Consumo de fármacos durante el embarazo*: variable categórica nominal policotómica con las categorías: sí/no.

- *Suplementos dietéticos durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Consumo de ácido fólico durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Consumo de hierro durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Consumo de calcio durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Consumo de otros suplementos dietéticos durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.

V.- Variables referentes a los hábitos de consumo de alcohol, tabaco y otro tipo de drogas

- *Consumo de alcohol*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Consumo de drogas*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Consumo de tabaco*: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: no fumador/ fumador.
- *Percepción de exposición al tabaco*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.

VI.- Variables referentes al estilo de vida y hábitos alimentarios

- *Consumo de comida ecológica*: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.
- *Frecuencia de consumo de comida ecológica*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: rara vez/ 1-3 veces al mes/ diariamente o varias veces a la semana.
- *Empleo de recipientes de plástico*: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.
- *Empastes blancos puestos durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las siguientes categorías: sí/no.

- *Uso de cosméticos durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Parte del cuerpo en el que uso los cosméticos*: variable nominal policotómica con las siguientes categorías: todo el cuerpo/ brazos y piernas/ parte superior del cuerpo/ parte inferior del cuerpo/ sólo barriga/ varias.
- *Frecuencia de uso de cosméticos*: variable nominal policotómica con las siguientes categorías: diariamente/ más de una vez a la semana/ más de una vez al mes/ menos de una vez al mes o rara vez.
- *Tratamiento del pelo durante el embarazo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Tipos de tratamiento utilizados*: variable policotómica con las siguientes categorías: mechas/ tinte o champú colorante/ permanente o ondulación/ varios.
- *Semana de gestación del tratamiento del pelo*: variable categórica nominal dicotómica con las categorías: sí/no.
- *Frecuencia de consumo de yogurt*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de queso fresco*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de queso añejo*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de huevos*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de legumbres*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de ensalada*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.

- *Frecuencia de consumo de vegetales verdes frescos*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de otros vegetales*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de conservas de vegetales*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de fruta fresca*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de zumo de fruta fresca*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de zumo de fruta en tetrabrik*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de frutos secos*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de aves (pollo, pavo)*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de carne*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de hígado*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.

- *Frecuencia de consumo de pescado blanco*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de pescado azul*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de marisco*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de pescado en conserva*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de carne en conserva*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de judías guisadas*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de alubias en conserva*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al día.
- *Frecuencia de consumo de comida orgánica o de cosecha propia*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al días.
- *Frecuencia de consumo de chocolate*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: nunca/ 1-3 veces al mes/ 1-3 veces semana/ 4-6 veces semana/ una o más veces al días.
- *Consumo de agua durante el embarazo*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: ninguno/1-3vasos diarios/más de tres vasos diarios.

3.2.5.2. Variables del padre

I.- Variable edad

- *Edad del padre*: Variable cuantitativa continua. Esta variable se recategorizó posteriormente en las siguientes categorías: ≤ 34 y >34 años.

II.- Variables referentes a las características sociodemográficas

- *Escolaridad del padre*: variable categórica nominal policotómica con las siguientes categorías: sin estudios o estudios primarios/ medios (BUP) o formación profesional (FP)/ diplomatura o estudios superiores.
- *Actividad laboral*: variable categórica nominal policotómica con tantas categorías como profesiones afines. Posteriormente fue recodificada en tres categorías: trabajo manual, agricultura y otros.
- *Percepción de la exposición a productos químicos durante el trabajo*: variable categórica dividida en dos grupos: sí/no

3.2.5.3. Variables del niño

I.- Características antropométricas

- *Peso al nacimiento*: variable cuantitativa continua expresada en gramos. Se utilizaron las categorías: <2500 ó ≥ 2500 g para el análisis estadístico.
- *Índice ponderal neonatal (IP)*: variable cuantitativa continua expresada en gramos. Para el análisis estadístico se utilizaron las categorías: <25 ó ≥ 25 g/cm³.
- *Perímetro cefálico*: variable cuantitativa continua expresada en gramos. Se utilizaron las categorías: <35 ó ≥ 35 g/cm³ en el análisis estadístico.
- *Longitud*: variable cuantitativa continua expresada en gramos.
- *Perímetro torácico*: variable cuantitativa continua expresada en gramos.

II.- Características del parto

- *Edad gestacional*: variable cuantitativa continua expresada en semanas. Se establecieron las siguientes categorías para el análisis bivariado: < 37 semanas/ 37-39 semanas/ >39 semanas, y para el análisis multivariado: < 37 semanas y ≥ 37 semanas.

- *Tipo de parto*: variable categórica nominal policotómica en la que se recogían las siguientes categorías: espontáneo/cesárea/instrumental.
- *Estación de año*: variable categórica nominal policotómica en la que se recogían las siguientes categorías: primavera/ verano/ otoño/ invierno.

3.2.5.4. Variables del análisis químico

- *Concentración de cada uno de los 17 pesticidas analizados en el tejido placentario*: variable cuantitativa continua expresada en ng/gramo de placenta y ng/g lípido, obtenida para los pesticidas analizados: o,p'DDT, p,p'DDT, o,p'DDD, p,p'DDE, metoxicloro, mirex, lindano, hexaclorobenceno (HCB), aldrín, endrín, dieldrín, endosulfán-I, endosulfán-II, endosulfán-éter, endosulfán-lactona, endosulfán-diol y endosulfán-sulfato. En el caso del DDT se calculó la suma de las concentraciones del compuesto y sus metabolitos halladas en la muestra, expresándose el resultado en ng DDE/g placenta o ngDDE/g lípido. Igualmente se hizo con endosulfán y metabolitos, expresando la suma como ng endosulfán-I/g placenta o ng endosulfán-I/g lípido.
- *Presencia o ausencia de cada uno de los 17 pesticidas analizados en el tejido placentario*: considerando como presente si el valor del pesticida cuantificado era igual o mayor al límite de cuantificación (\geq LC) o ausente si se encontró por debajo del mismo ($<$ LC).

3.2.5.5. Variables del análisis biológico

- *Niveles de carga estrógenica total efectiva (TEXB) de alfa y beta*: variable cuantitativa continua expresada en Eeq pM/mL de cultivo, Eeq pM/g placenta y Eeq/pM g lípido.
- *Presencia o ausencia de carga estrógenica total efectiva (TEXB) de alfa y beta en el tejido placentario*: considerando como presente si la TEXB en las fracciones alfa y beta tenía un valor igual o superior al límite de cuantificación (\geq LC) o ausente si se encontró por debajo del mismo ($<$ LC).

3.2.5.6. Análisis de datos

I.- Análisis univariado

Para las variables cuantitativas continuas se obtuvieron sus parámetros de tendencia central (media, mediana y moda) y de dispersión (valores mínimo, máximo y desviación típica). Para las variables categóricas se obtuvo la proporción de cada categoría con respecto al total de sujetos, excluyéndose los casos con valores faltantes.

II.- Análisis bivariado

En el estudio de las posibles asociaciones entre las distintas variables de la encuesta y los niveles de pesticidas/TEXB y número de pesticidas por muestra, la estrategia de análisis dependió del tipo de variable utilizada:

- *Presencia o no de algún pesticida en la muestra de tejido placentario de cada sujeto del estudio:* en este caso se construyeron las tablas de contingencia para estimar la existencia de diferencias significativas en la proporción de sujetos con presencia ($\geq LC$) o ausencia ($< LC$) de pesticidas y las variables cualitativas o cuantitativas categorizadas de la encuesta.
- *Concentración de cada pesticida y niveles de TEXB en las muestras estudiadas:* cuando los valores de los pesticidas, de TEXB de las fracciones alfa o beta y las variables de la encuesta fueron consideradas como cuantitativas, el test aplicado fue el test de correlación de Spearman. En el caso de que las variables de la encuesta fueran cualitativas o cuantitativas categorizadas y los niveles de TEXB y pesticidas se consideraron como cuantitativas, se utilizó el test de Mann-Whitney (2 categorías) o el test de Kruskal-Wallis (más de dos categorías).
- *Número de pesticidas por muestra de tejido placentario:* En este caso se utilizó el test de Spearman o de Pearson en función de si la variable cuantitativa de la encuesta, tenía una distribución normal o no, ya que el número de pesticidas por muestra sí poseía dicha distribución normal. Además, se utilizó la prueba de Levene (2 categorías) o el test ANOVA de un factor (más de dos categorías), cuando la variable de la encuesta era cualitativa o cuantitativa categorizada.

- *VARIABLES DE LA ENCUESTA ENTRE SÍ:* Se utilizó el test de Pearson o Spearman, dependiendo de si las variables continuas tenían una distribución normal o no, respectivamente. Si una de las variables era cuantitativa con distribución normal y la otra cualitativa o cuantitativa categorizada, los tests utilizados fueron la prueba de Levene (dos categorías) o ANOVA de un factor (más de dos categorías); y si una de las variables era cuantitativa con distribución no normal y la otra cualitativa o cuantitativa categorizada, se utilizaron los tests de Mann-Whitney (dos categorías) o Kruskal-Wallis (tres categorías). Por último, si ambas variables eran cualitativas o cuantitativas categorizadas, se utilizaron las tablas de contingencia.

En el caso de los pesticidas, los valores por debajo del LC se sustituyeron por un valor igual a la mitad del LC y para el caso de la TEXB de la fracción alfa y beta se sustituyeron por el valor de la concentración mínima de estradiol necesaria para producir un efecto proliferativo significativo diferente del observado en las células control (1 fmol/mL).

En todos los tests utilizados, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

III.- Análisis multivariado

En este caso, se estudiaron las posibles asociaciones entre todas las variables de la encuesta (cualitativas o cuantitativas categorizadas) y los niveles de pesticidas, TEXB y número de pesticidas (variables cuantitativas dependientes). El test aplicado en todos los casos fue el test ANOVA de dos vías.

En este test se consideró que la correlación era estadísticamente significativa a nivel $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

IV.- Aplicaciones informáticas

Los datos procedentes de las encuestas epidemiológicas fueron introducidos en una base de datos SPSS (versión 12) junto con los datos procedentes del análisis de las muestras biológicas de tejido placentario.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

Como se ha indicado en la sección de Material y Métodos, la población objeto de estudio estaba constituida por varones nacidos en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, en el período comprendido entre Octubre de 2000 y Junio de 2002. Durante este período se reclutaron un total de 668 niños de los 4455 varones nacidos. De esta cohorte fueron elegidos 308 sujetos, atendiendo a las condiciones anteriormente seleccionadas en el apartado de material y métodos (aprobación por parte de los padres a participar en el estudio, disponibilidad del cuestionario, examen físico y muestra biológica de placenta).

Todas las madres fueron informadas del objeto del estudio, de la colección de las muestras biológicas y del examen físico que se realizaría al niño y firmaron un consentimiento informado. La investigación fue aprobada por el

Comité de Ética del Hospital. La confidencialidad de los datos se mantuvo en todo momento, separando la información recogida de los datos de identificación de cada participante, de acuerdo con la legislación al respecto sobre protección de datos.

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ANÁLISIS UNIVARIADO

En primer lugar, se presenta la información obtenida en el cuestionario epidemiológico pasado a las 308 madres reclutadas en el momento del parto, con objeto de investigar, posteriormente, los posibles factores determinantes de la concentración de compuestos organoclorados en muestras de tejido placentario y la exposición a disruptores endocrinos xenoestrogénicos.

A continuación, se muestran las secciones que recogen los datos estadísticos descriptivos para cada una de las características epidemiológicas de la población de estudio. En el caso de las variables cuantitativas se estima la media, la desviación estándar, la mediana, el máximo y el mínimo para cada una de ellas. Para las variables cualitativas se calcula el valor de N y el porcentaje de frecuencia, y algunas de ellas se categorizan según el número de valores que pueden tomar y que serán utilizadas posteriormente en el análisis estadístico.

4.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

A continuación se muestran los datos referentes a las madres que han sido obtenidos en el análisis de las encuestas.

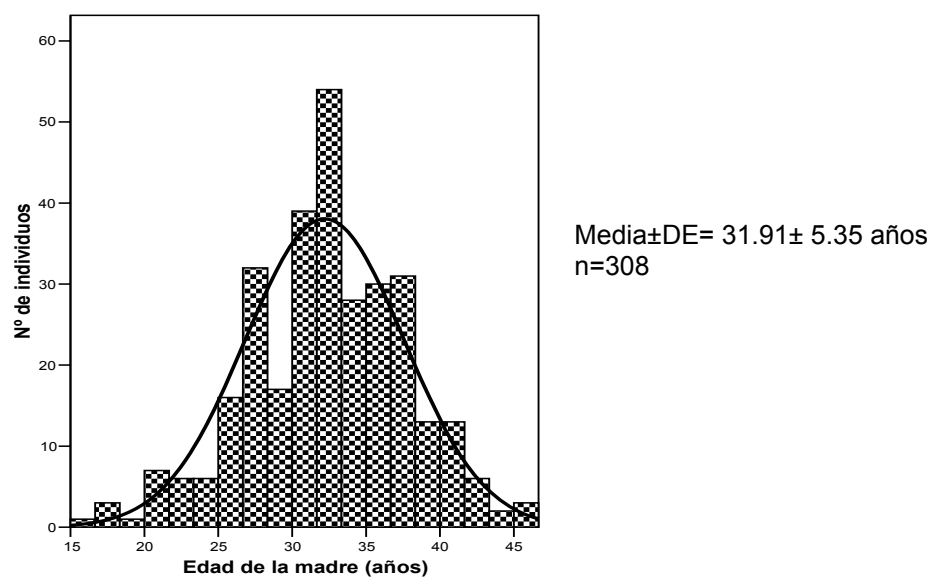
4.2.1.1. Edad

La edad media de las madres del estudio en el momento del parto fue de aproximadamente 32 años ($DE \pm 5.35$), con un mínimo de 16 y un máximo de 46 años. El valor de la media fue el punto de corte seleccionado para el análisis estadístico. La variable se recodificó en 2 categorías.

Edad (años)	Media \pm DE	Mediana	N	%
	31.91 \pm 5.35	32.00		
< 20			5	1.62
20-26			35	11.36
27-30			71	23.05
31-35			117	37.99
> 35			80	25.98
Total			308	100

Edad (años)	N	%
≤ 32	153	49.8
> 32	155	50.2
Total	308	100

La gráfica siguiente muestra el histograma de número de individuos por edades para las 308 mujeres enroladas en el estudio. Como se puede observar, la distribución es normal.



4.2.1.2. Características antropométricas

I.- Peso antes del embarazo

Esta variable recoge el peso de la madre justo antes del embarazo. El valor medio fue de 61.63 Kg (DE \pm 11.07), con un rango de valores entre 40 y 112.50 Kg.

Peso (Kg)	Media \pm DE	Mediana	N	%
	61.63 \pm 11.07	60.00		
< 55			82	26.62
55-60			81	26.30
61-68			66	21.43
> 68			79	25.65
Total			308	100

II.- Peso al final del embarazo

La media obtenida fue de 75.00 Kg (DE \pm 11.46), con un rango de valores entre 52 y 120 Kg.

Peso (Kg)	Media \pm DE	Mediana	N	%
	75.00 \pm 11.46	74.00		
< 67			90	29.22
67-74			81	26.30
75-82			75	24.35
\geq 83			62	20.13
Total			308	100

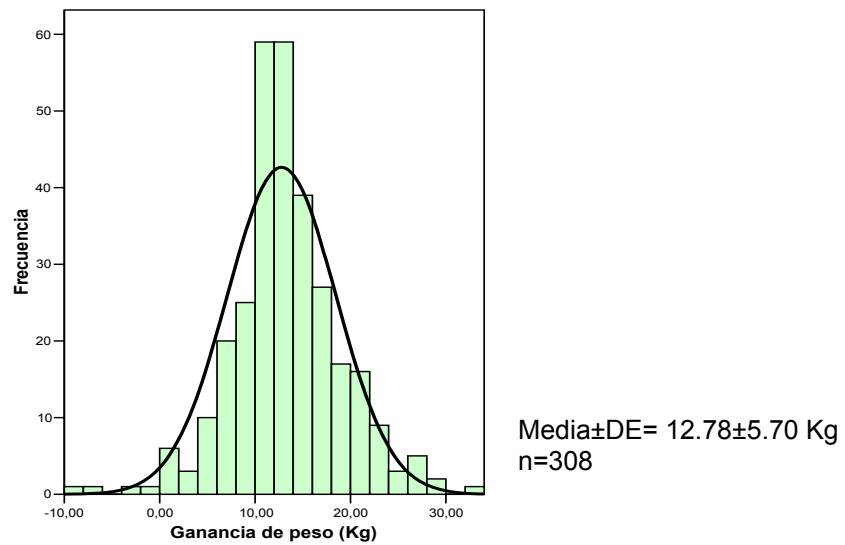
El incremento medio del peso durante el embarazo fue de 12.78Kg, con un valor mínimo de -10Kg y un valor máximo de 34Kg.

Ganancia de peso (Kg)	Media ± DE	Mediana	N	%
	12.78±5.70	12.00		
< 1			9	2.92
1-7			23	7.48
>7-12			95	30.84
>12-20			153	49.68
>20			20	9.08
Total			308	100

La variable se recodificó en dos categorías para el análisis estadístico y el punto de corte seleccionado fue la media (12Kg).

Ganancia de peso (Kg)	N	%
≤ 12	157	50.97
> 12	151	49.03
Total	308	100

La gráfica siguiente muestra el histograma del número de individuos en cada nivel de ganancia de peso para las 308 mujeres incluidas en el estudio. Como podemos observar, esta variable sigue una distribución normal.

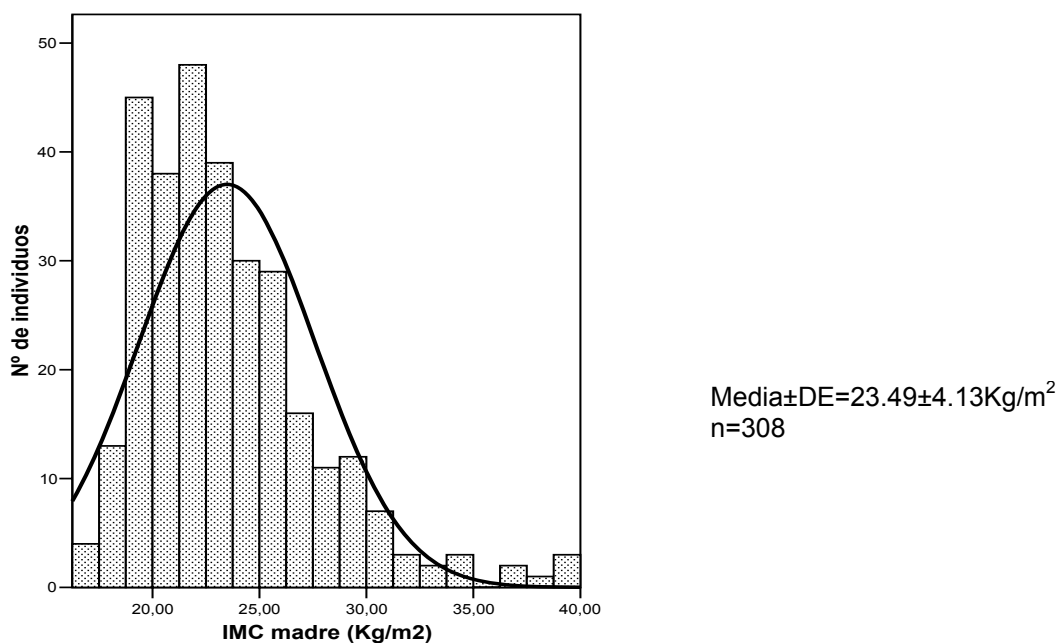


III.- Índice de masa corporal (IMC)

La variable cuantitativa IMC fue calculada dividiendo el peso de la mujer antes de quedarse embarazada, en Kg, entre la talla en metros elevada al cuadrado (Kg/m^2). La media (23.49 ± 4.13) Kg/m^2 está dentro de los valores de IMC que considera la Organización Mundial para la Salud (OMS) como normales.

IMC (Kg/m^2)	Media ± DE	Mediana	N	%
	23.49 ± 4.13	22.59		
< 20.70			82	26.62
20.70-23.05			85	27.60
≥23.05-25.71			63	20.45
>25.71			78	25.33
Total			308	100

La gráfica siguiente muestra el histograma de número de individuos en cada nivel de IMC para las 308 mujeres incluidas en el estudio.



En la siguiente tabla se muestra la distribución de madres según su IMC cuando se toma como referencia los rangos de IMC adoptados por la OMS (Organización Mundial de la Salud). Como podemos observar, el 62.9% de las madres de nuestro estudio se engloban en el rango correspondiente a peso normal. El 22.29% de las madres presentaban sobrepeso y un 6.91% obesidad.

IMC según la OMS (Kg/m ²)	N	%
Bajo peso (≤ 18.99)	24	7.9
Normal (19-24.99)	194	62.9
Sobrepeso (25-29.99)	69	22.29
Obesidad, Clase I (30-34.99)	15	4.9
Obesidad, Clase II (35-35.99)	6	2.01
Total	308	100

4.2.1.3. Características sociodemográficas

A continuación se presentan algunas características sociales, educativas y laborales de la población de estudio.

I.- Estado civil

La mayoría de las mujeres del estudio estaban casadas (91,5%), por tanto, su distribución no era normal.

Estado civil	N	%
Casada	282	91.55
Convive con pareja	25	8.12
Soltera	1	0.33
Total	308	100

II.- Lugar de residencia

Para categorizar esta variable, se consideró como área rural aquellas poblaciones con un número de habitantes menor de 10.000 y área urbana aquellas poblaciones con igual o más de 10.000 habitantes.

Lugar de residencia	N	%
Rural (<10000)	128	41.56
Urbana (≥10000)	180	58.44
Total	308	100

III.- Nivel de estudios

La mayoría de las madres reclutadas poseían estudios primarios, solamente el 3.9 % admitió no tener estudios de ningún tipo y un 17.6% declaró tener estudios universitarios. Para el análisis estadístico, estas categorías se recodificaron en tres grupos: Sin estudios o estudios primarios, medios y superiores.

Nivel de estudios	N	%
Sin estudios	12	3.9
Primarios	153	49.5
Medios	53	17.3
Formación profesional	36	11.7
Diplomatura	41	13.4
Licenciatura	13	4.2
Total	308	100

IV.- Actividad laboral actual

La mayoría de las madres reclutadas se dedicaban a las tareas domésticas (38,3%) o a tareas de tipo administrativo (22.7%). En la categoría de profesional liberal se han incluido las siguientes profesiones declaradas: traductora, profesora, abogada, guía, música y economista.

En muchos estudios epidemiológicos se ha relacionado la ocupación de los padres, específicamente en actividades agrícolas, con altos niveles de compuestos organoclorados detectados en las muestras biológicas de los niños, así como malformaciones genéticas en los niños, bajo peso al nacer, nacimientos prematuros y abortos, entre otros. Por eso, esta variable se ha recalculado en tres categorías: hogar, agricultura y otras. Sólo el 4,9% de las madres participantes en el estudio se dedicaban a las actividades del campo.

Actividad laboral actual	N	%
Administración	70	22.7
Agricultura	15	4.9
Autónoma	4	1.3
Hogar	118	38.4
Hostelería	23	7.5
Limpieza	26	8.4
Peluquería	10	3.2
Sanitaria	17	5.5
Profesional Liberal	25	8.1
Total	308	100

Actividad laboral actual	N	%
Hogar	95	30.8
Agricultura	15	4.9
Otras	198	64.3
Total	308	100

V.- Percepción de la exposición a productos químicos

Esta variable recoge la percepción que las madres tenían de haber estado expuestas a compuestos químicos durante el embarazo. En su mayoría (88.3%), las madres no tenían percepción de haber estado expuestas a ningún tipo de compuesto químico, solamente un 11.7% declaró estar expuesta a productos químicos tales como pesticidas, desinfectantes, productos de limpieza, productos fitosanitarios y productos usados en la peluquería.

Percepción de exposición a productos químicos	N	%
Sí	36	11.7
No	272	88.3
Total	308	100

4.2.1.4. Características reproductivas de la madre

A continuación se muestran los datos referentes a la historia ginecológica y reproductiva de las participantes.

I.- Edad de menarquia

La edad media de la primera menstruación fue de 12 años y 7 meses (DE ± 1.50), con un mínimo y un máximo de 9 y 17 años respectivamente. El 20.5% de las madres tuvo su primera menstruación antes de los 11 años.

Edad de menarquia (años)	Media \pm DE	Mediana	N	%
	12.67 \pm 1.50	13.00		
≤ 11			63	20.5
12 – 13			156	50.6
≥ 14			89	28.9
Total			308	100

La figura siguiente muestra el histograma de distribución de las madres en función de la edad de menarquia. La distribución de valores para esta variable es normal.



II.- Paridad

Esta variable clasifica a las mujeres según el número de niños nacidos vivos y/o de niños nacidos muertos (abortos) previos al reclutamiento. Si el niño reclutado es el primer niño nacido vivo, sin antecedentes previos de otros embarazos la madre se clasifica como primípara, en todos los demás casos la madre se clasifica como múltipara.

Paridad	N	%
Primípara	142	46.1
Múltipara	166	53.9
Total	308	100

La mayoría de las mujeres múltiparas, habían estado embarazadas una vez (73.50%) con anterioridad.

Embarazos previos	N	%
1	122	73.50
2	32	19.27
3	7	4.22
>3	5	3.01
Total	166	100

III.- Métodos anticonceptivos

Esta variable recoge la utilización de algún método anticonceptivo, entre los que se incluyen: dispositivo intrauterino (DIU), anticonceptivos orales (ACO), diafragma, gel, cremas, espumas, y/o método de la temperatura basal, en algún momento de la vida reproductiva de la mujer. En nuestra población de estudio, el 47.1% de las madres declaró haber usado alguno de estos métodos.

Uso de anticonceptivos	N	%
Sí	145	47.1
No	163	52.9
Total	308	100

IV.- Tratamiento de infertilidad

Sólo el 6.1 % se había sometido a tratamiento de infertilidad.

Tratamiento de infertilidad	N	%
Sí	5	1.6
No	303	98.4
Total	308	100

4.2.1.5. Antecedentes clínicos

A continuación se muestran las variables que hacen referencia a los problemas surgidos durante el embarazo (pérdida de líquido amniótico, náuseas, vómitos, hemorragia vaginal) así como al consumo de medicamentos y suplementos dietéticos en su transcurso.

I.- Problemas durante el embarazo

El 62.0% de las madres tuvo algún problema durante el embarazo. Las incidencias más frecuentes dentro de estas 191 mujeres fueron náuseas (51.9%) y vómitos (48.4%).

Problemas durante el embarazo	N	%
Sí	191	62.0
No	117	38.0
Total	308	100

Tipo de problema	N	%
Pérdida líquido amniótico	19	6.2
Náuseas	160	51.9
Vómitos	149	48.4
Hemorragia vaginal	43	14.0
Total	191	100

II.- Consumo de fármacos mientras intentaba quedarse embarazada

La mayor parte de las mujeres reclutadas no tomó ninguna medicación mientras intentaba quedarse embarazada.

Consumo de fármacos	N	%
Sí	19	6.2
No	289	93.8
Total	308	100

III.- Consumo de fármacos durante el embarazo

El 42.5% de las mujeres encuestadas afirmó haber tomado alguna medicación durante la gestación.

Consumo de fármacos	N	%
Sí	131	42.5
No	177	57.5
Total	308	100

IV.- Consumo de suplementos dietéticos

A las madres se les preguntó si habían tomado ácido fólico, hierro, calcio u otro tipo de preparado vitamínico durante el embarazo. La mayor parte de las mujeres reclutadas afirmaron tomar algún tipo de preparado vitamínico.

Suplementos dietéticos	N	%
Sí	260	84.4
No	48	15.6
Total	308	100

Los suplementos dietéticos más habituales fueron ácido fólico (62.2%) e hierro (53.1%).

Tipo de suplemento	N	%
Ácido Fólico	199	62.2
Hierro	169	53.1
Calcio	54	17.0
Otros preparados vitamínicos	13	4.1

4.2.1.6. Hábitos de consumo de alcohol, tabaco y otro tipo de drogas.

A continuación se muestran los datos obtenidos en el análisis de las encuestas referentes al consumo de alcohol, tabaco y otros tipos de drogas.

I.- Consumo de alcohol durante el embarazo

Sólo 2 mujeres del estudio declararon haber consumido alcohol en exceso (estar ebria) durante el embarazo.

Consumo de alcohol	N	%
Sí	2	0.7
No	306	99.3
Total	308	100

II.- Consumo de drogas durante el embarazo

Ninguna de las mujeres afirmó haber consumido drogas sintéticas o marihuana durante el embarazo.

III.- Consumo de tabaco durante el embarazo

El 27.6% de las mujeres reclutadas fumaron durante el embarazo y un 59.7% reconocieron haber estado expuestas de forma pasiva al humo del tabaco.

Consumo de tabaco	N	%
Sí	85	27.6
No	223	72.4
Total	308	100

Exposición pasiva al humo del tabaco	N	%
Sí	172	59.7
No	136	40.3
Total	308	100

4.2.1.7. Estilo de vida y exposición durante el embarazo.

Se muestran a continuación los datos obtenidos en el análisis de las encuestas referentes al estilo de vida de las madres durante el embarazo.

I.- Vegetarianismo

Sólo siete de las madres encuestadas se consideraban vegetarianas, cuatro de ellas consumían frutas y verduras, pescado y aves de corral; y las tres restantes consumían frutas y verduras, huevos y leche.

II.- Consumo de comida ecológica

El 26.6 % de las madres declaró haber consumido durante el embarazo comida ecológica, destacando el consumo de frutas y verduras ecológicas. Y solamente un 37% por cierto de estas mujeres (N=82) consumía estos productos diariamente.

Consumo comida ecológica	N	%
Sí	82	26.6
No	226	73.4
Total	308	100

Frecuencia consumo comida ecológica	N	%
Diariamente/ varias veces semana	30	37.0
1-4 veces al mes	32	38.3
Rara vez	20	24.7
Total	82	100

Dentro de nuestro interés por conocer las vías de exposición durante el embarazo a diferentes compuestos químicos, se incluyó en la encuesta epidemiológica una serie de preguntas con el objeto de investigar la exposición intrauterina a compuestos químicos a través de empastes dentales puestos a las madres, el uso de recipientes de plástico para microondas y el uso de cosméticos.

III.- Empleo de recipientes de plástico para calentar la comida en el microondas

Casi la mitad de las mujeres reclutadas (46.8%) usaron recipientes de plástico para calentar la comida en el microondas.

Empleo recipientes de plástico en microondas	N	%
Sí	144	46.8
No	164	53.2
Total	308	100

IV.- Empastes dentales blancos

Solamente a 23 mujeres se les puso un empaste dental blanco durante el embarazo.

Colocación de un empaste dental blanco	N	%
Sí	23	7.5
No	285	92.5
Total	308	100

V.- Empleo de cosméticos

Un 82.1% de las mujeres reclutadas usaron algún cosmético durante el embarazo.

Uso de cosméticos durante el embarazo	N	%
Sí	253	82.1
No	55	17.8
Total	308	100

Las tablas siguientes recogen el tipo de cosmético empleado, la parte del cuerpo en la que se aplicó y la frecuencia con que fueron usados. Estas tablas se han calculado sobre las 253 mujeres que declararon usar cosméticos durante el embarazo. La mayor parte de las mujeres usaron, principalmente, crema (65.61%). El concepto “varios” se emplea para englobar a aquellas mujeres que usaban de forma conjunta varios cosméticos a la vez como crema y loción, crema y aceite, entre otros.

Tipo de cosmético	N	%
Crema	166	65.61
Loción	3	1.19
Aceite	21	8.30
Varios	63	24.91
Total	253	100

La mayoría de las mujeres que usaron cosméticos durante el embarazo, se los aplicaron por todo el cuerpo (73.52%), los usaban diariamente (81.42%), y sólo el 3.16 % de las mujeres declararon haberlos usado rara vez o menos de una vez al mes.

Parte del cuerpo en la que usó los cosméticos	N	%
Todo el cuerpo	186	73.52
Parte superior del cuerpo	25	9.88
Parte inferior del cuerpo	4	1.58
Sólo barriga	19	7.51
Brazos y/o piernas	2	0.79
Varias	17	6.72
Total	253	100

Frecuencia uso cosméticos	N	%
Diariamente	206	81.42
Mas de una vez a la semana	34	13.44
Mas de una vez al mes	5	1.98
Menos de una vez al mes/rara vez	7	3.16
Total	252	100

La encuesta recogía preguntas referentes al tratamiento del pelo durante el embarazo (mechas, tintes, permanente, champú colorante). La mayoría de las madres contestaron afirmativamente haberse sometido a algún tipo de tratamiento (66.2%). Entre el grupo de mujeres (n=204) que afirmó haber recibido algún tipo de tratamiento del pelo, el tinte fue el tratamiento más frecuentemente recibido (40.2%).

Tratamiento del pelo	N	%
Sí	204	66.2
No	104	33.8
Total	308	100

Tipo de tratamiento	N	%
Mechas	44	21.6
Tinte/Champú colorante	124	60.8
Permanente-ondulada	10	5.0
Varios	26	12.6
Total	204	100

4.2.1.8. Resultados obtenidos referentes a aspectos relacionados con la dieta.

A continuación se muestran los datos obtenidos en el análisis de las encuestas en lo referente a hábitos alimentarios, expresando el consumo de cada grupo de alimentos como frecuencia diaria, semanal y mensual (diariamente, veces/semana, veces/mes y nunca). De forma sucesiva se presentan los resultados correspondientes a productos lácteos, vegetales, frutas, huevos, carnes, pescado y conservas.

A la vista de los resultados obtenidos en el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, que han sido recogidos en las tablas que vienen a continuación, se puede deducir que los hábitos nutricionales de la población de estudio siguen las pautas de la dieta habitual de la región y se pueden considerar próximas a las recomendaciones de la dieta mediterránea.

En el caso de los lácteos, la frecuencia de consumo recomendada es de 2 a 3 raciones al día. En nuestro estudio, el 62% de las mujeres consumía a diario yogurt y solamente un 7.8 % lo hacía de forma esporádica (1-3 veces/mes) y un 6.8% no tomaba nunca yogurt. Con respecto al consumo de quesos, éste era menor, sobre todo el consumo de queso añejo, ya que el 29.7% de la población de estudio declaró no hacerlo nunca y un 23.7% de las madres declaró no tomar nunca queso fresco.

Productos lácteos	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Yogurt	21	6.8	24	7.8	53	17.2	19	6.2	191	62
Queso fresco	73	23.7	39	12.5	78	25.4	49	15.8	69	22.6
Queso añejo	92	29.7	40	12.9	75	24.4	50	16.1	51	16.8

La frecuencia adecuada para el consumo de vegetales y hortalizas debe ser diaria. Un 86.1% de las madres encuestadas afirmó tomar ensaladas a diario, siendo los vegetales congelados los menos consumidos por ellas, un 58.5% de las embarazadas declaró no hacerlo o consumir de 1-3 veces/mes vegetales congelados.

La frecuencia de consumo recomendada para las legumbres debe ser de 2-3 raciones/semana, esto se cumple en nuestras mujeres, ya que el 18.4% de las madres consumía legumbres diariamente, un 40.1% las tomaba de 4-6 veces/semana y un 40.1% de 1-3 veces/semana.

Vegetales	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Legumbres	1	0.4	3	1.1	124	40.1	124	40.1	56	18.4
Ensalada	4	1.4	4	1.4	19	6.1	15	5.0	266	86.1
Veg. verdes frescos	17	5.4	19	6.5	73	24.0	103	33.3	96	30.8
Vegetales frescos	25	8.2	25	8.2	83	26.9	95	30.8	80	25.8
Veg. congelados	81	26.2	99	32.3	95	30.8	26	8.2	7	2.5

Siguiendo las recomendaciones de la dieta mediterránea, la frecuencia de consumo adecuada para la fruta debe ser diaria, y esto coincide con los

resultados de la encuesta, ya que la mayor parte de la población de estudio tomaba a diario frutas (86.0%).

Frutas	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Frutas	3	1.1	11	3.6	19	6.1	10	3.2	265	86.0
Zumo fruta fresca	76	27.3	28	9.0	36	11.8	43	14.0	125	38.0
Zumo fruta envasada	95	30.8	47	15.4	71	22.9	36	11.8	59	19.0
Frutos secos	71	23.0	92	29.9	106	34.5	23	7.6	16	5.0

En cuanto al consumo de aves y carnes (cerdo, ternera) el 77.8% y el 71.79% de las mujeres encuestadas afirmó tomar carne de una a tres veces a la semana respectivamente, ajustándose a las recomendaciones establecidas por la dieta mediterránea.

Las vísceras se recomienda que no se consuman más de 2 veces al mes y el 57.7% de las mujeres de nuestro estudio afirmó no consumirlas nunca, un 14% de 1-3 veces/mes, y solamente un 26.2% tomaba este tipo de alimento entre una y tres veces a la semana.

Carnes	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Aves	7	2.2	7	2.2	240	77.8	49	16.1	5	1.8
Carne:cerdo, ternera	20	6.5	28	9.0	221	71.7	37	12.2	2	0.7
Hígado	178	57.7	47	14.0	81	26.2	2	0.7	0	0.0

La mayor parte de las mujeres de nuestro estudio afirmó haber tomado pescado blanco y azul principalmente de 1-3 veces por semana (78.5% y 76.3%, respectivamente). En este caso, las mujeres deberían consumir algo más de pescado para ajustarse a las recomendaciones, ya que el consumo mínimo debe ser de 4 raciones a la semana.

Pescado	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Pescado blanco	13	4.3	18	5.7	242	78.5	32	10.4	3	1.1
Pescado azul	12	3.9	29	9.3	235	76.3	30	9.7	2	0.7
Marisco	95	30.8	149	48.4	57	18.6	7	2.2	0	0

En cuanto a los alimentos proteicos, se ha encontrado que un 85.6% de las madres tomaba huevos de 1 a 3 veces por semana, ajustándose a la recomendación de 3 raciones a la semana.

Alimentos proteicos	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Huevos	9	2.9	9	2.9	263	85.6	22	7.2	5	1.4

En cuanto a las conservas, un 43.9%, un 98.2% y un 51.4% de las mujeres encuestadas declaró no consumir nunca pescado, carne y vegetales en conserva, respectivamente.

Conservas	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Pescado	135	43.9	61	19.8	100	32.4	9	2.9	3	1.1
Carne	303	98.2	2	0.7	2	0.7	1	0.4	0	0.0
Vegetales	158	51.4	70	23.0	61	19.8	11	3.6	8	2.2

Otros productos mencionados en la encuesta como productos ecológicos o conservas no fueron consumidos de forma frecuente por este grupo de estudio; por otra parte, alimentos frutivos tales como dulces, chocolate, cacao fueron tomados de forma desigual por la población de estudio.

Otros alimentos	Nunca		1-3 veces al mes		1-3 veces semana		4-6 veces semana		Todos los días	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Product. ecológicos	116	37.8	34	11.2	78	25.2	44	14.4	36	11.5
Chocolate	88	28.7	64	20.8	57	18.6	42	13.6	57	18.3

Otra de las preguntas fue el número de vasos de agua diarios durante el embarazo. Sólo 3 de ellas declararon no beber agua diariamente.

Consumo de agua en el embarazo	N	%
Ninguno	3	0.97
1-3 vasos diarios	51	16.56
Mas de 3 vasos diarios	254	82.47
Total	308	100

4.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL PADRE

Se presentan a continuación algunas de las características de interés para este estudio referentes al padre, que se obtuvieron a través de los cuestionarios. En todas las variables falta un dato debido a que una madre era soltera.

4.2.2.1. Edad

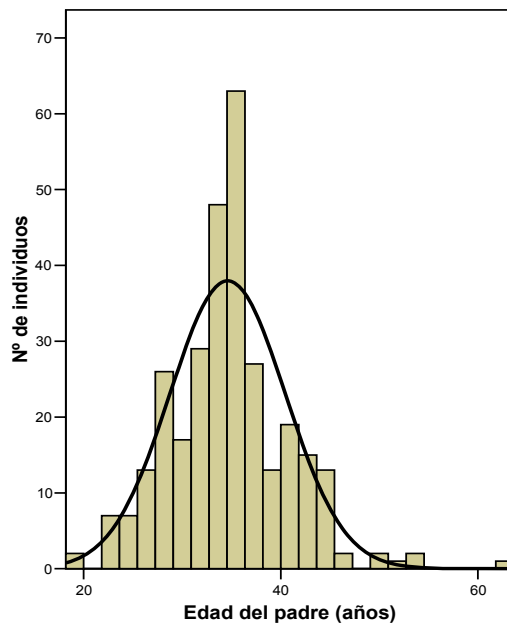
La edad media de los padres incluidos en el estudio fue de 34 años ($DE \pm 5.86$), con un mínimo y un máximo de 19 y 62 años respectivamente.

Edad (años)	Media \pm DE	Mediana	N	%
	34.60 \pm 5.86	35.00		
<25			13	4.23
25-29			41	13.35
30-35			149	48.55
36-40			61	19.87
41-45			34	11.07
>45			9	2.93
Total			307	100

La variable se recodificó en 2 categorías, tomando como punto de corte la media.

Edad (años)	N	%
≤ 34	145	46.91
> 34	162	53.09
Total	307	100

La gráfica siguiente muestra el histograma de número de individuos por edades de los padres.



Media \pm DE=34.60 \pm 5.86años
n=307

4.2.2.2. Características sociodemográficas

I.- Nivel de estudios

Al igual que ocurría con las madres, más de la mitad de los padres tenían estudios primarios (52.44%), un 7.17% no tenía estudios, y un 17.92% de los padres poseía estudios superiores (licenciatura o diplomatura). En el análisis estadístico la variable nivel de estudios se recodificó en 3 categorías (Sin estudios-primarios/ medios/superiores).

Nivel de estudios	N	%
Sin estudios	22	7.17
Primarios	161	52.44
Medios	19	6.19
Formación profesional	50	16.28
Diplomatura	16	5.22
Licenciatura	39	12.7
Total	307	100

II.- Actividad laboral

Las ocupaciones más frecuente eran la construcción (21.50%), el trabajo de tipo administrativo (16.94%) y la hostelería (12.38%).

Actividad laboral actual	N	%
Construcción	66	21.50
Limpieza	1	0.33
Campo	22	7.17
Administrativo	52	16.94
Hostelería	38	12.38
Sanitario	8	2.61
Profesión Liberal	27	8.79
Autónomo	10	3.26
Mecánico, conductor	22	7.17
Pintor	21	6.84
Metalurgia	16	5.21
Otros	24	7.8
Total	307	100

En la categoría de profesional "liberal" se han incluido las siguientes profesiones declaradas: traductor, profesor, abogado, guía, músico y economista. En la categoría de "otros" se han incluido las siguientes profesiones: portero, pensionista, supermercado, trabajo temporal, carnicero y panadero.

Debido a que muchos estudios epidemiológicos han relacionado la ocupación de los padres, específicamente en actividades agrícolas con malformaciones congénitas, esta variable se ha recalculado en tres categorías (agricultura, trabajo manual y otras). Dentro de la variable “trabajo manual”, han sido incluidos trabajos tales como: carpintero, mecánico, albañil, pintor y carnicero, entre otras. Y dentro del grupo “otros”, se han incluido trabajos tales como administrativo, sanitario, abogado, autónomos etc. La mayoría de los padres de nuestro estudio (92.9%) tenían una actividad laboral diferente a la agricultura, al igual que ocurría con las madres.

Actividad laboral actual	N	%
Agricultura	22	7.1
Trabajo manual	127	41.2
Otros	158	51.7
Total	307	100

III.- Percepción de la exposición a productos químicos

Por último, esta variable refleja la percepción que las madres de nuestro estudio tenían sobre la exposición o no de sus maridos a compuestos químicos, ya que el cuestionario se pasó a la madre durante la hospitalización por parto y el padre pudo no estar presente cuando se hizo la entrevista. En la mayor parte de los casos (83.39%) no se tenía percepción de una exposición laboral paterna. Los productos químicos a los que los padres estaban expuestos eran: acero inoxidable, ácidos, barniz, butano, cemento, desengrasantes, disolventes, fertilizantes y pesticidas, lejía, amoniaco, PVCs, sosa cáustica, yeso, sulfatos, retardantes de llamas, silicona, pegamentos, gasolina, disolventes y desinfectantes y por último la radiación gamma.

Percepción de la exposición a productos químicos	N	%
Sí	51	16.61
No	256	83.39
Total	307	100

4.2.3. CARACTERÍSTICAS DEL NIÑO

Se presentan a continuación las variables de interés para el estudio recogidas en el momento de inclusión de los recién nacidos en el grupo objeto de estudio. Para algunas de las variables, el número de datos recopilados fue menor de 308, por faltar esa información en la encuesta.

4.2.3.1. Características antropométricas

I.- Peso al nacer

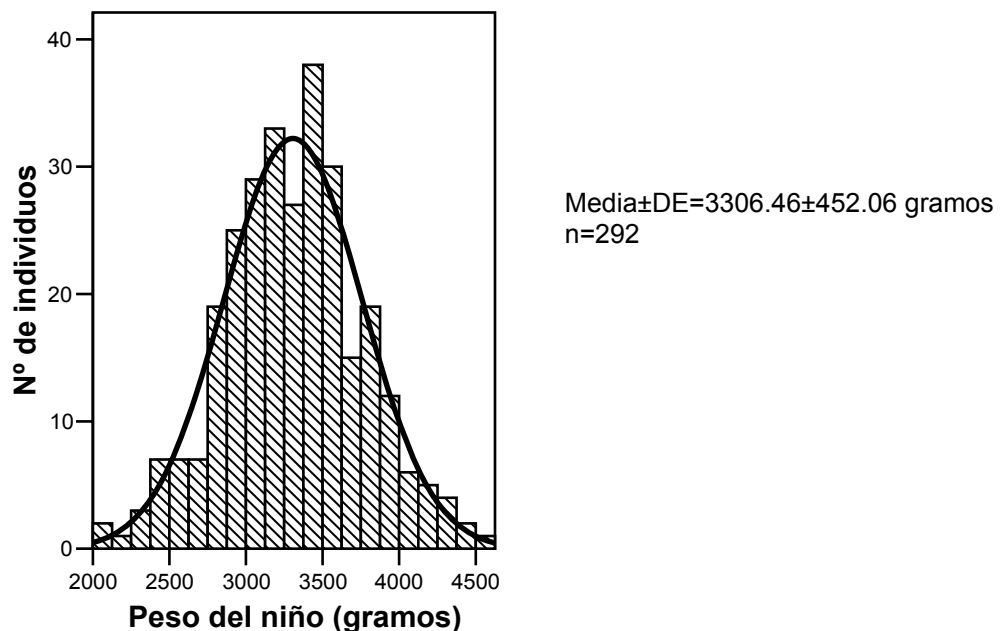
El peso medio de los recién nacidos se situó en torno a los 3306 g (n=292) con un mínimo de 2000 gr y un máximo de 3300 gr.

Peso del niño (gramos)	Media ± DE	Mediana	N	%
	3306.46±452.06	3300.00		
< 2500			12	4.11
2500-3000			60	20.5
>3000-4000			205	70.21
>4000			15	5.18
Total			292	100

A su vez, esta variable se categorizó en bajo peso (peso inferior a 2500g) y peso normal (≥ 2500 g), según la clasificación dada por la OMS. Tan sólo 13 niños nacieron con bajo peso.

Peso del niño (gramos)	N	%
< 2500	12	4.11
≥ 2500	280	95.89
Total	292	100

El histograma siguiente muestra la distribución de valores para la variable peso al nacer. Como podemos observar, esta distribución es normal.



II.- Índice ponderal en el momento del parto

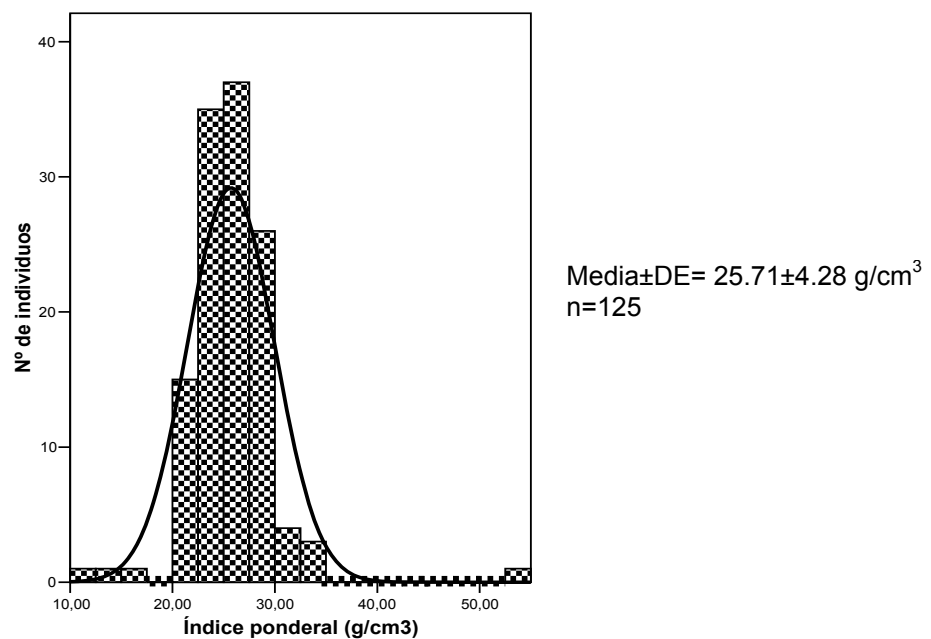
La media del índice ponderal (IP) en el momento del parto fue de 25.71 ± 4.28 g/cm³, con un valor mínimo de 11.92 g/cm³ y un valor máximo de

54.84 g/cm³. Para el análisis estadístico, el IP fue dividido en dos categorías (<25 g/cm³ y ≥ 25g/cm³).

Índice ponderal (g/cm ³)	Media	± DE	Mediana	Mínimo	Máximo
	25.71	4.28	25.48	11.92	54.84

Índice ponderal (g/cm ³)	N	%
< 25	54	43.2
≥25	71	56.8
Total	125	100

El histograma siguiente muestra la distribución de valores para la variable con distribución normal IP.



III.- Longitud, perímetro torácico y perímetro cefálico

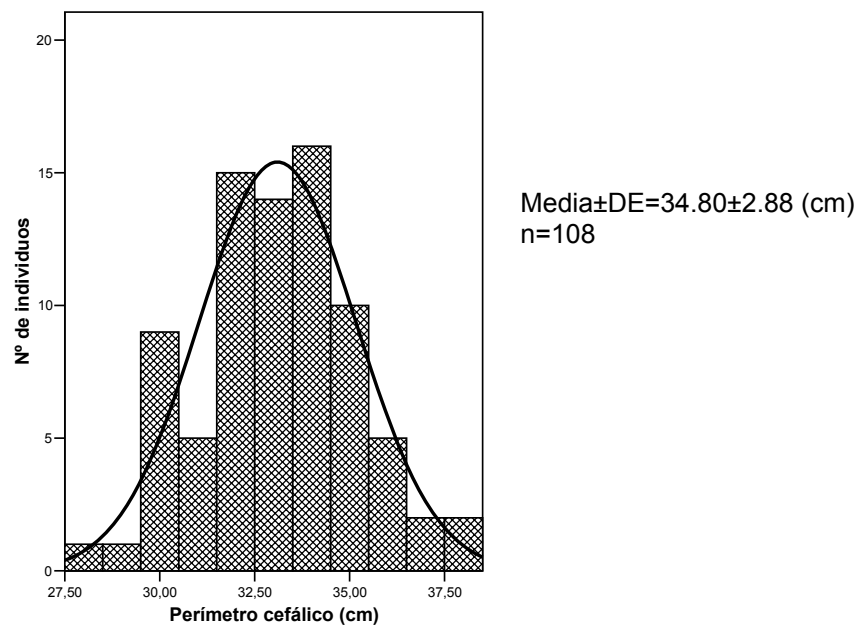
A continuación se muestran los valores medios para la talla de los niños, perímetro cefálico y torácico, así como el rango de dichas medidas antropométricas.

	Media	± DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Longitud (cm)	50.77	2.88	50.50	40.00	63.00
Perímetro cefálico (cm)	34.80	1.29	35.00	32.00	38.00
Perímetro torácico (cm)	33.18	2.06	33.00	28.00	38.00

Para el análisis estadístico, el perímetro cefálico fue dividido en dos categorías, (<35 ó ≥ 35cm), considerado 35 cm como el valor normal, por debajo del cual los niños tienen un perímetro cefálico pequeño.

Perímetro cefálico (cm)	N	%
< 35	40	37.00
≥35	68	63.00
Total	108	100

En la gráfica siguiente se muestra la distribución de valores para la variable perímetro cefálico. Dicha distribución es normal.



4.2.3.2. Características del parto

I.- Edad gestacional

La mayoría de los niños (95.4%) nacieron con una edad gestacional por encima de 37 semanas (259 días) con un rango comprendido entre 31 (220 días) y 42 (294 días) semanas de gestación. Estos datos fueron calculados para 281 recién nacidos, ya que para el resto no se pudo conseguir dicha información.

Edad gestacional	Media	\pm DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Semanas	39.38	1.49	40	31	42
Días	275.71	10.38	280	220	294

Para el análisis bivariado, esta variable se codificó en tres categorías (32-37 semanas; >37-39 semanas; y >39 semanas), y para el multivariado se recodificó en dos categorías, <37 ó \geq 37 semanas, criterio establecido para considerar un recién nacido prematuro.

Edad gestacional (semanas)	N	%
32- 37	13	4.6
>37-39	112	39.9
> 39	156	55.5
Total	281	100

Además, en este estudio se ha tratado de aislar a aquellos niños cuyo peso al nacer es pequeño en función de las semanas de gestación con las que nacieron. No existe un consenso sobre el criterio a seguir, y se considera indistintamente que un niño es pequeño para la edad gestacional cuando su peso está por debajo del percentil 10%, 5% ó 3%, o cuando su peso está al menos dos desviaciones estándar por debajo de la media ($\leq -2DE$) para la edad gestacional, basado en datos derivados de la población de referencia (Lee et al., 2003).

En este trabajo, se han considerado como criterios válidos, el considerar que un niño es pequeño para la edad gestacional si su peso es menor al percentil 5% y también si la desviación estándar de su peso estaba dos veces por debajo del peso medio ($\leq -2DE$) para su edad gestacional (valor que corresponde prácticamente a considerar el percentil 3% como válido), basado en datos de una población de referencia.

En el primer caso, se ha utilizado como referencia la tabla del estudio de De Doubilet y colaboradores (1997b), en la que se estableció el nivel del percentil del peso para cada edad gestacional, tabla utilizada por los pediatras del Hospital Clínico San Cecilio para la determinación de niños pequeños para la edad gestacional.

En función de esta tabla, un total de 6.7% de los niños de este estudio nacieron con pequeño peso para la edad gestacional.

La tabla del estudio de De Doubilet y colaboradores, viene recogida a continuación.

Edad gestacional (semanas)	Percentil de peso (gramos)						
	5%	10%	25%	50%	75%	90%	95%
25	450	490	564	660	772	889	968
26	523	568	652	760	885	1016	1103
27	609	660	754	875	1015	1160	1257
28	707	765	870	1005	1162	1322	1430
29	820	884	1003	1153	1327	1504	1623
30	947	1020	1151	1319	1511	1706	1836
31	1090	1171	1317	1502	1713	1928	2070
32	1249	1338	1499	1702	1933	2167	2321
33	1422	1519	1696	1918	2169	2421	2587
34	1608	1714	1906	2146	2416	2687	2865
35	1804	1919	2125	2383	2671	2959	3148
36	2006	2129	2349	2622	2927	3230	3428
37	2210	2340	2572	2859	3177	3493	3698
38	2409	2544	2786	3083	3412	3736	3947
39	2595	2735	2984	3288	3622	3952	4164
40	2762	2904	3155	3462	3798	4127	4340
41	2900	3042	3293	3597	3930	4254	4462
42	3002	3142	3388	3685	4008	4322	4523
43	3061	3195	3432	3717	4026	4324	4515

Tamaño para la edad gestacional	N	%
Pequeño	18	6.7
Normal	251	93.3
Total	269	100

Además, se ha construido otra tabla con las semanas de gestación y el peso de los 18 niños, referida en la tabla anterior.

Niño	Semanas	Peso	Niño	Semanas	Peso
1	38	2230	10	40	2750
2	40	2070	11	39	2390
3	41	2490	12	39	2360
4	39	2000	13	42	2930
5	41	2660	14	40	2690
6	40	2350	15	40	2760
7	39	2570	16	39	2360
8	39	2510	17	40	2560
9	41	2890	18	40	2490

Para calcular el número de niños que se desvían de su peso normal, considerando que sea aceptable el peso medio \pm 2DE, se ha transformado la distribución normal de los pesos en otra variable con media igual a 0 y desviación estándar igual a 2. De manera que, al utilizar la ecuación:

$$Z = \frac{X - \bar{m}}{\sigma}$$

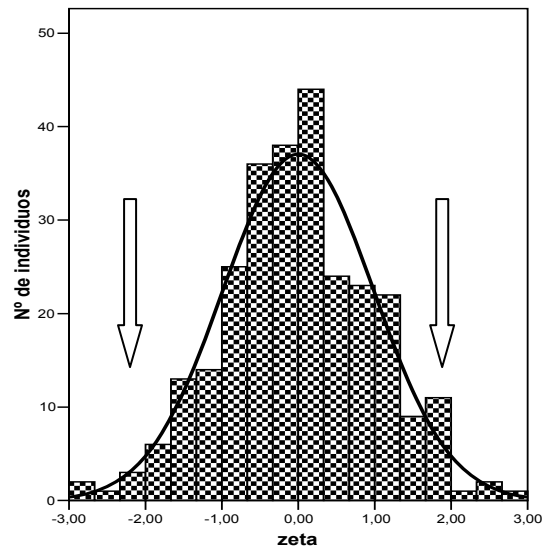
\bar{X} = Peso del niño

\bar{m} = Peso medio para cada semana de gestación

σ = Desviación típica del peso medio para cada semana de gestación

Tendremos que todos los valores positivos que estén por encima de 2 serían correspondientes a niños con peso grande para su edad gestacional, y

por debajo o igual a 2, recién nacidos con bajo peso para su edad gestacional. Según este criterio, solamente 6 niños tenían bajo peso para la edad gestacional (concretamente los niños 1-6 recogidos en la tabla anterior). A continuación se recoge la representación gráfica de la distribución de los valores de zeta.



II.- Terminación del parto

El parto fue espontáneo en el 72.5% (N=208) de las madres para las que se pudo recoger esta variable (n=287), necesitando asistencia instrumental tan sólo un 15.7% (N=45). El porcentaje de cesáreas recogido en nuestro estudio no superó el límite del 15 por ciento de cesáreas aconsejado por la Organización Mundial de la Salud.

Terminación del parto	N	%
Espontáneo	208	72.5
Cesárea	34	11.8
Instrumental	45	15.7
Total	287	100

III.- Estación del año

En relación con la estación del año en que nacieron los niños se observa que hay una proporción de nacimientos discretamente superior en primavera (n=93) y verano (n=110), en detrimento del otoño (n=56) y el invierno (n=49).

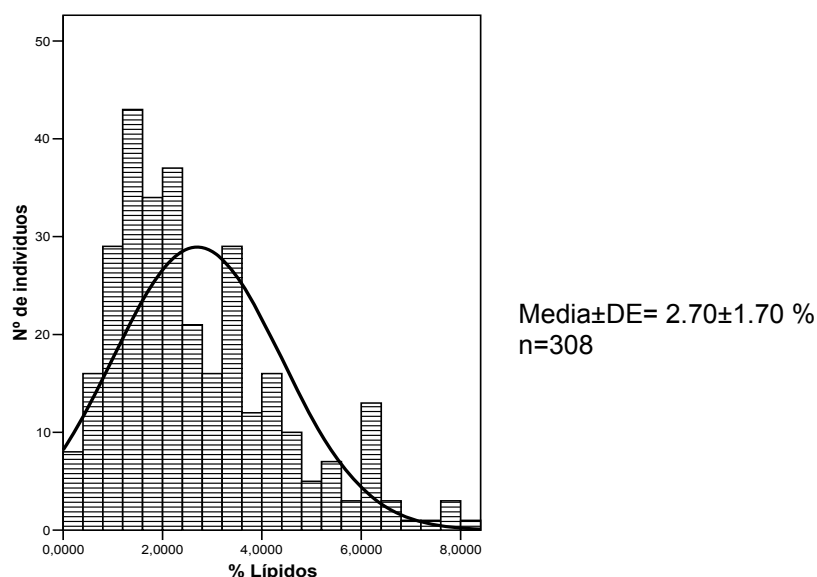
Estación del año	N	%
Primavera	93	30.2
Verano	110	35.7
Otoño	56	18.2
Invierno	49	15.9
Total	308	100

4.3. NIVELES DE PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ANÁLISIS UNIVARIADO

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia y el nivel de pesticidas organoclorados cuantificados en las 308 muestras de tejido placentario de los recién nacidos participantes. Los apartados 4.3.1.1.- 4.3.1.4. recogen el N y la frecuencia de detección de los distintos grupos de pesticidas en las muestras de tejido placentario, la media aritmética, su correspondiente desviación estándar, mediana, valores mínimo y máximo de los niveles de los compuestos estudiados. Los valores se expresan en ng/g de placenta y en ng/g de lípido. El contenido medio de lípidos por muestra fue de $2.70 \pm 1.70\%$, con un valor mínimo de 0.15% y un valor máximo de 8.23%, como podemos ver en la tabla siguiente.

Lípidos	Media	±DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Lípidos en muestra	0.05	0.04	0.39	0.0025	0.5527
% de lípidos	2.70	1.70	2.27	0.1467	8.2315

El histograma siguiente muestra la distribución de valores para la variable % de lípidos.



El apartado 4.3.1.5., recoge los valores estadísticos descriptivos, para la variable número de pesticidas en las muestras de tejido placentario. Por último, el apartado 4.3.1.6. recoge las correlaciones existentes entre los niveles de distintos pesticidas en muestras de tejido placentario (ng/g placenta y ng/g lípido), calculadas mediante el test de correlación de Spearman.

4.3.1. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO

4.3.1.1. Resultados estadísticos para los valores de DDT y metabolitos en tejido placentario

Las tablas recogidas a continuación, muestran los resultados estadísticos para niveles de DDT y metabolitos en tejido placentario. Más del 50% de las placentas presentaron residuos de o,p´DDT y o,p´DDE y más del 45% de las mismas presentaban residuos de p,p´DDT y o,p´DDD. Dentro de este grupo, el compuesto detectado más frecuentemente fue el p,p´DDE (92.7%) y también resultó ser el más frecuente de entre los 17 pesticidas analizados. Las concentraciones medias de esta familia variaban entre 0.54 ± 0.84 ng/g placenta (que corresponde a 13.28 ± 34.08 ng/g lípido) para el o,p´DDT y 2.79 ± 3.77 ng/g placenta (92.29 ± 155.76 ng/g lípido) para el caso del p,p´DDE. También se ha considerado los datos estadísticos descriptivos de la suma de DDT y metabolitos, referidos a DDE, alcanzándose un valor medio de 5.54 ± 5.68 ng/g placenta (189.04 ± 277.83 ng/g lípido).

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
o,p´ DDT	161	52.3	0.54	0.84	0.5	6.98
p,p´ DDT	139	46.0	0.77	1.46	0	8.78
o,p´ DDD	150	48.7	1.59	3.10	0	25.34
p,p´ DDE	286	92.7	2.79	3.77	1.62	28.29
Σ DDTs	301	97.7	5.54	5.68	3.85	37.87

DE= desviación estándar.

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
o,p' DDT	161	52.3	13.28	34.08	0.5	292.20
p,p' DDT	139	46.0	27.16	92.93	0	1066.99
o,p' DDD	150	48.7	50.11	132.13	0	1588.28
p,p' DDE	286	92.7	92.29	155.76	8.38	1250.45
Σ DDTs	301	97.7	189.04	277.83	101.69	2337.41

DE= desviación estándar.

4.3.1.2. Resultados estadísticos para los valores de endosulfán-I, endosulfán-II y metabolitos en tejido placentario

La tabla muestra los datos estadísticos descriptivos de los niveles de endosulfán-I y -II y sus metabolitos detectados en tejido placentario. Cuatro pesticidas de esta familia, fueron detectados en más del 50% de las placentas (endosulfán-I, endosulfán-éter, endosulfán-diol y endosulfán-sulfato). De entre estos compuestos el detectado con mayor frecuencia y el más abundante fue el endosulfán-diol que se halló en un 62.1%, con un valor medio de 4.15 ± 5.02 ng/g placenta, que expresado en base lipídica corresponde a 156.73 ± 298.77 ng/g lípido. También resultó ser el pesticida que presentaba mayores concentraciones de entre los 17 pesticidas analizados. Dentro de este grupo, el compuesto detectado con una menor frecuencia fue el endosulfán-II (30.8%) y el endosulfán-éter fue el que se detectó en una concentración menor (0.17 ± 0.41 ng/g placenta que expresado en base lipídica se convierte en 6.83 ± 23.34 ng/g lípido). Se han considerado además los datos estadísticos descriptivos de la suma de endosulfán y metabolitos, referidos a endosulfán I, resultando que cerca del 96% de los recién nacidos estaban expuestos a través del tejido placentario a endosulfán, con una media de 7.02 ± 8.33 ng/g placenta (260.38 ± 471.48 ng/g lípido).

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
E-I	167	54.2	0.59	1.28	0.25	11.16
E-II	95	30.8	0.48	1.20	0	12.90
E-éter	155	50.3	0.17	0.41	0.1	4.67
E-lactona	108	35.1	0.97	3.43	0	27.31
E-diol	191	62.1	4.15	5.02	3.36	26.23
E-sulfato	157	51.0	0.83	2.25	0.25	31.66
Σ Endos	295	95.7	7.02	8.33	4.76	59.03

E=Endosulfán. DE= desviación estándar.

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
E-I	167	54.2	19.87	50.07	0.25	355.72
E-II	95	30.8	8.64	35.55	0	370.72
E-éter	155	50.3	6.83	23.34	0.1	256.78
E-lactona	108	35.1	36.17	183.19	0	2733.82
E-diol	191	62.1	156.73	298.77	66.22	3014.63
E-sulfato	157	51.0	28.39	70.01	0.25	623.42
Σ Endos	295	95.7	260.38	471.48	113.77	4410.00

E=Endosulfán. DE= desviación estándar.

4.3.1.3. Resultados estadísticos para los valores de aldrín, endrín y dieldrín en las muestras de tejido placentario

Tal y como se muestra en este apartado, cada uno de los componentes del grupo de los ciclodienos, estaban presentes en las muestras de placenta en una frecuencia inferior al 50%. El endrín fue el compuesto más frecuentemente detectado en las muestras de tejido placentario (34.1%), seguido muy de cerca por el aldrín (27.8%). El endrín también resultó ser el compuesto más abundante

dentro de este grupo, ya que su valor medio en tejido placentario era de 1.01 ± 1.98 ng/g placenta (22.93 ± 66.70 ng/g lípido), superior a los niveles del resto de pesticidas englobados en este grupo.

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
Aldrín	87	27.8	0.31	0.83	0	7.86
Endrín	105	34.1	1.01	1.98	0	12.29
Dieldrín	62	20.2	0.28	0.93	0	9.58

DE= desviación estándar.

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
Aldrín	87	27.8	7.56	32.24	0	323.91
Endrín	105	34.1	22.93	66.70	0	574.83
Dieldrín	62	20.2	9.67	37.16	0	300.47

DE= desviación estándar.

4.3.1.4. Resultados estadísticos para los valores de lindano, mirex, metoxicloro y HCB en tejido placentario

La tabla de este apartado muestra los datos correspondientes al resto de pesticidas analizados. El lindano fue el pesticida más frecuente (74.8%) y el hexaclorobenceno (HCB) el que presentó valores más elevados de media (0.53 ± 1.16 ng/g placenta que corresponde a 15.41 ± 46.46 ng/g lípido).

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
HCB	128	41.7	0.53	1.16	0	9.54
Lindano	230	74.8	0.39	0.51	0.25	3.62
Mirex	76	24.8	0.31	0.76	0	6.14
Metoxicloro	94	30.5	0.42	1.31	0	10.41

HCB= Hexaclorobenceno. DE= desviación estándar.

Pesticidas	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
HCB	128	41.7	15.41	46.46	0	373.71
Lindano	230	74.8	12.28	31.87	0.25	245.67
Mirex	76	24.8	13.59	64.15	0	844.21
Metoxicloro	94	30.5	16.31	71.85	0	985.23

HCB= Hexaclorobenceno. DE= desviación estándar.

4.3.1.5. Resultados estadísticos sobre el número de pesticidas detectados en tejido placentario

También se ha determinado el número de pesticidas detectado en cada una de las muestras de tejido placentario. El 100% de las muestras analizadas contenía al menos un pesticida en cantidades cuantificables. La media del número de pesticidas detectados en las muestras de tejido placentario era de 7.61 (rango: 1-15).

	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Número de pesticidas	7.61	2.95	8.00	1	15

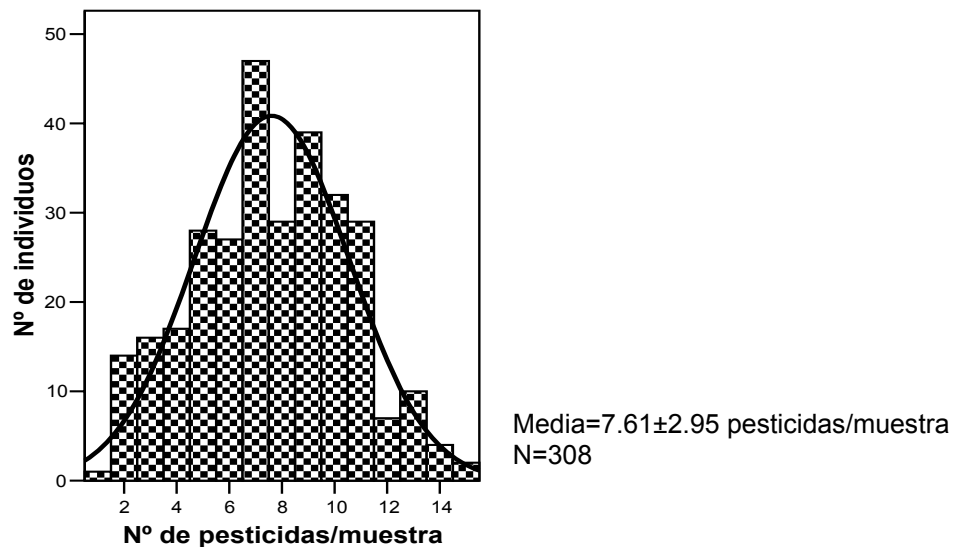
DE= desviación estándar

La tabla y la figura siguientes muestran la distribución de la población en función del número de residuos de pesticidas detectados en muestras de tejido placentario.

Nº pesticidas	Media ±DE	N	%
	7.61±2.95		
1		1	0.3
2		14	4.6
3		16	5.3
4		17	5.6
5		29	9.4
6		27	8.9
7		48	15.6
8		30	9.6
9		40	12.9
10		33	10.6
11		30	9.6
12		7	2.3
13		10	3.3
14		4	1.3
15		2	0.7
16		0	0.0
17		0	0.0
Total		308	100

DE: Desviación estándar

Como podemos ver en la figura, la distribución del número de pesticidas es normal.



4.3.1.6. Correlación entre niveles de pesticidas detectados en muestras de tejido placentario

Se ha estudiado mediante la aplicación del test de Spearman, la relación existente entre los niveles de distintos pesticidas en muestras de tejido placentario expresadas en ng/g de placenta y ng/g lípido. En las tablas siguientes se exponen los resultados de dicho análisis.

Destaca de forma significativa la asociación encontrada entre los pesticidas y sus metabolitos. Cuando los valores medios son expresados en ng/g placenta, aparecen asociaciones estadísticas entre Σ DDTs, p,p'DDT ($\rho=0.413$, $p<0.001$), o,p'DDT ($\rho=0.403$, $p<0.001$), o,p'DDD ($\rho=0.557$, $p<0.001$) y p,p'DDE ($\rho=0.707$, $p<0.001$); p,p'DDT, o,p'DDT ($\rho=0.276$, $p<0.001$), p,p'DDE ($\rho=0.264$, $p<0.001$) y o,p'DDD ($\rho=0.207$, $p<0.001$); o,p'DDT, p,p'DDE ($\rho=0.222$, $p<0.001$) y o,p'DDD ($\rho=0.307$, $p<0.001$); y además, aparece una tendencia a la significación estadística entre p,p'DDD y p,p'DDE ($\rho=0.95$, $p=0.099$).

En lo que respecta a los isómeros α y β del endosulfán, identificados en esta memoria como endosulfán-I y endosulfán-II, existe una relación estadísticamente significativa entre ambos ($\rho=0.264$, $p=0.001$). Además, el endosulfán-I está estadísticamente asociado con los metabolitos endosulfán-éter

($\rho=0.151$, $p=0.009$) y endosulfán-diol ($\rho=0.251$, $p<0.001$). Este último, también está estadísticamente asociado de forma significativa con el endosulfán-lactona ($\rho=0.251$, $p<0.001$). Igual que en el caso de la familia de DDTs, la Σ Endosulfanes está estadísticamente asociado con todos los metabolitos: endosulfán-I ($\rho=0.384$, $p<0.001$), endosulfán II ($\rho=0.218$, $p<0.001$), endosulfán-éter ($\rho=0.144$, $p=0.012$), endosulfán-lactona ($\rho=0.436$, $p<0.001$), endosulfán-diol ($\rho=0.818$, $p<0.001$), y endosulfán-sulfato ($\rho=0.263$, $p<0.001$). Por último, existe una tendencia a la significación estadística entre los pesticidas endosulfán-II y endosulfán-lactona ($\rho=0.101$, $p=0.080$).

Por último, existe una asociación entre aldrín y su compuesto de metabolización dieldrín ($\rho=0.148$, $p=0.01$), así como entre dieldrín y endrín ($\rho=0.159$, $p=0.006$).

Cuando los niveles de pesticidas son expresados en ng/g lípido, todas las asociaciones estadísticas anteriores se mantienen, y la tendencia a la significación para el caso de p,p'DDE y p,p'DDD se convierte en una asociación estadísticamente significativa ($\rho=0.117$, $p=0.041$).

Las asociaciones estadísticas significativas entre compuestos y sus metabolitos, viene a reforzar la fuerte asociación entre los compuestos de uso comercial y su producto de transformación y/o degradación.

	Aldrin	Endrín	Dieldrin	E-éter	E-lactona	E-diol	E-sulfato	E-I	E-II	o,p' DDT	p,p' DDT	o,p' DDD	pp' DDE	Lindano	HCB	Mirex	Metox.	ΣDDTs	ΣEndos
Aldrin	0.164	0.010**	0.183	0.639	0.550	0.130	<0.001**	<0.001**	0.003**	0.018	0.440	0.005**	0.007**	<0.001**	0.743	0.016*	0.030*	<0.001**	
Endrín		0.006**	0.081 ⁺	0.774	0.058 ⁺	0.694	0.010**	0.086 ⁺	<0.001**	0.636	<0.001**	0.004**	0.189	0.021*	0.345	0.353	<0.001**	0.051 ⁺	
Dieldrin			0.145	0.226	0.452	0.425	0.035 ⁺	0.407	0.021*	0.352	0.587	0.105	<0.001**	0.194	0.930	0.263	0.232	0.245	
E-éter				0.867	0.147	0.994	0.009**	0.446	0.103	0.832	0.265	0.163	0.044*	0.006**	0.042*	0.064 ⁺	0.065 ⁺	0.012*	
E-lactona					<0.001**	0.170	0.119	0.080 ⁺	0.952	0.071 ⁺	0.636	0.401	0.083 ⁺	0.795	0.022*	0.058 ⁺	0.809	<0.001**	
E-diol						0.301	<0.001**	0.572	0.016**	0.141	<0.001**	0.035*	0.094 ⁺	0.913	<0.001**	0.345	0.013*	<0.001**	
E-sulfato							0.665	0.398	0.134	<0.001**	0.335	<0.001**	0.651	0.041*	0.250	<0.001**	0.717	<0.001**	
E-I								0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.010**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	
E-II									0.769	0.004**	0.008**	<0.001**	0.004**	0.029*	0.048*	0.001**	<0.001**	<0.001**	
o,p' DDT										<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.003**	0.007**	0.251	<0.001**	<0.001**	
p,p' DDT											<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.012*	<0.001**	0.919	<0.001**	<0.001**	
DDD												0.099 ⁺	0.325	0.429	0.002**	0.450	<0.001**	0.001**	
DDE													0.014*	<0.001**	0.093 ⁺	0.060	<0.001**	<0.001**	
Lindano														<0.001**	<0.001**	0.002**	0.023*	<0.001**	
HCB															0.869	0.001**	<0.001**	<0.001**	
Mirex																0.003**	0.030*	<0.001**	
Metoxicloro																	0.033*	0.002**	
Σ DDTs																			<0.001**
Σ Endos																			<0.001**

Ng/g placenta. Se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (†).

	Aldrín	Endrín	Dieldrín	E-éter	E-lactona	E-diol	E-sulfato	E-I	E-II	o,p'DDT	p,p'DDT	DDD	DDE	Lindano	HCB	Mirex	Metox.	ΣDDTs	Σendos
Aldrín		0.159	0.009**	0.083	0.410	0.181	0.190	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.009**	0.269	0.012*	0.002**	<0.001**	0.456	0.018*	0.012*	<0.001**
Endrín			0.016*	0.407	0.742	0.099 ⁺	0.632	0.010*	0.069 ⁺	<0.001**	0.473	<0.001**	0.063 ⁺	0.097 ⁺	0.026*	0.329	0.402	<0.001**	0.171
Dieldrín				0.110	0.233	0.188	0.521	0.039*	0.330	0.019*	0.243	0.851	0.110	<0.001**	0.313	0.925	0.253	0.290	0.216
E-éter					0.513	0.005**	0.633	0.005**	0.849	0.072 ⁺	0.948	0.366	0.081 ⁺	0.008**	0.006**	0.035*	0.118	0.005**	<0.001**
E-lactona						<0.001**	0.255	0.125	0.065 ⁺	0.672	0.128	0.384	0.401	0.023*	0.876	0.029*	0.032*	0.781	<0.001**
E-diol							0.699	<0.001**	0.718	0.025*	0.308	<0.001**	0.004**	0.002**	0.164	<0.001**	0.140	<0.001**	<0.001**
E-sulfato								0.881	0.341	0.072 ⁺	<0.001**	0.330	<0.001**	0.978	0.111	0.101	<0.001**	0.005**	<0.001**
E-I									<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.004**	<0.001**	<0.001**	<0.001**
E-II										0.980	0.004**	0.003**	<0.001**	0.001**	0.016*	0.051 ⁺	0.002**	<0.001**	<0.001**
o,p'DDT											<0.001**	<0.001**	0.001**	<0.001**	0.004**	0.032*	0.273	<0.001**	<0.001**
p,p'DDT												<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.024*	<0.001**	0.997	<0.001**	0.002**
DDD													0.041*	0.225	0.217	0.001**	0.290	<0.001**	0.002**
DDE														0.018*	<0.001**	0.275	0.032*	<0.001**	<0.001**
Lindano															0.001**	<0.001**	0.002**	0.017*	<0.001**
HCB																0.761	<0.011**	<0.001**	<0.001**
Mirex																	0.005**	0.146	<0.001**
Metoxicloro																		0.043*	0.004**
Σ DDTs																			<0.001**
Σ Endos																			

Ng/g lípido. Significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (†).

4.4. ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL Y/O TÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO MEDIANTE EL ENSAYO E-SCREEN. ANÁLISIS UNIVARIADO

La exposición al efecto continuado de compuestos químicos con actividad hormonal estrogénico se ha investigado en este trabajo mediante la cuantificación de la estrogenicidad de los extractos tisulares en el ensayo biológico E-Screen. Para ello se procedió al análisis detallado de la actividad hormonal de las dos fracciones cromatográficas obtenidas, identificadas como alfa y beta y correspondientes a la elusión cromatográfica de los xenoestrógenos organohalogenados (fracción alfa) y otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas (fracción beta). En ambos casos se estimó la actividad correspondiente a la fracción completa (1:1) y diluida en medio experimental a un quinto (1:5) y un décimo (1:10) para la totalidad de las muestras.

4.4.1. CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia y la carga estrógenica total efectiva (TEXB) en las 308 muestras de tejido placentario de los recién nacidos participantes. Los apartados 4.4.1.1. y 4.4.1.2. recogen el N y la frecuencia de positividad, así como, la media aritmética, su correspondiente desviación estándar, mediana, valores mínimo y máximo de la carga estrógenica total efectiva de las fracciones alfa y beta, expresadas en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido.

El último apartado (4.4.1.3.), recoge las correlaciones entre las fracción alfa y la beta expresadas en las tres unidades de estudio (Eeq pM/mL de medio

de cultivo, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido), calculadas mediante el test de Spearman.

4.4.1.1. Resultados estadísticos para la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa.

Alrededor de 3 de cada 4 de los extractos de placentas fueron estrogénicos cuando la fracción alfa del HPLC fue testada mediante el ensayo E-Screen (71.4%), con un valor medio de 3.84 ± 9.73 Eeq (pM)/g placenta (equivalente a 177.07 ± 398.60 Eeq (pM)/g lípido).

TEXB-Fracción Alfa						
	Frecuencia(\geq LC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
	220	71.4				
Eeq pM/mL			6.18	13.41	0.80	91.63
Eeq pM/g plac.			3.84	9.73	0.47	111.50
Eeq pM/g lipid.			177.07	398.60	17.73	3041.69

DE= Desviación estándar. Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de la media y mediana están expresados en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta y Eeq pM/g lípido.

4.4.1.2. Resultados estadísticos para la carga estrogénica total efectiva en la fracción beta

En el caso de la fracción beta, un 84.7% de los extractos presentaban estrogénicidad medible mediante el ensayo E-Screen, con un valor medio de 22.82 ± 64.48 Eeq pM/g placenta (equivalente a 1190.97 ± 2603.31 Eeq pM/g lípido).

TEXB-Fracción Beta						
	Frecuencia(\geqLC)		Media	DE	Mediana	Máximo
	N	%				
	260	84.7				
Eeq pM/mL			35.56	70.43	5.08	353.30
Eeq pM/g plac.			22.82	64.48	3.02	912.41
Eeq pM/g lipid.			1190.97	2603.31	107.38	17588.62

DE= Desviación estándar. Los valores de equivalentes de estradiol fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación obtenidos en la curva dosis-respuesta de estradiol. Los valores de la media y mediana están expresados en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta y Eeq pM/g lípido.

4.4.1.3. Correlación entre la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa y en la fracción beta en muestras de tejido placentario

Se ha estudiado mediante la aplicación del test estadístico de correlación Rho de Spearman la relación existente entre la carga estrogénica total efectiva (TEXB) en la fracción alfa y en la fracción beta.

Los valores de la TEXB en la fracción alfa, expresados en Eeq (pM)/mL, Eeq (pM)/g placenta, y Eeq (pM)/g lípido, fueron asociados significativamente con los valores de TEXB en la fracción beta expresados en las mismas unidades ($\rho=0.328$, $p<0.001$; $\rho=0.340$, $p<0.001$; $\rho=0.325$, $p<0.001$, respectivamente). En la tabla siguiente se exponen los resultados de dicho análisis.

	Fracción Alfa			Fracción Beta		
		Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL		<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**
Eeq(pM)/g plac.		<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**
Eeq(pM)/g lípido		<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**

La correlación es estadísticamente significativa a nivel $p\leq 0.01$ (**).

4.5. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LA ENCUESTA Y LA EXPOSICIÓN A PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS BIVARIADO

4.5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

4.5.1.1. Edad

La edad se ha considerado en muy diversas publicaciones como uno de los mayores determinantes de la concentración de xenobióticos bioacumulados en los tejidos corporales, encontrando una relación positiva entre el incremento de los niveles de estos compuestos recibidos por el bebé, y el incremento en la edad de las madres. Por esta razón, en este estudio se ha intentado ver la relación existente entre los niveles de pesticidas, así como la carga estrogénica total efectiva (TEXB) de las fracciones alfa y beta de las muestras de tejido placentario y la variable edad de las madres.

Mediante el test de correlación de Spearman, se relacionó la variable continua edad de la madre con los niveles de pesticidas organoclorados y con los valores de TEXB de la fracción alfa y beta. También, se construyeron tablas de contingencia para comparar la presencia/ausencia de pesticidas o TEXB de la fracción alfa y beta (considerando como presente o ausente aquel pesticida o fracción con un valor \geq o $<$ del límite de cuantificación [LC]) y la variable edad de la madre según sea esta ≤ 32 ó > 32 años. Además, la edad de la madre como variable dicotómica (≤ 32 ó > 32 años) se relacionó con los niveles de pesticidas organoclorados y con los valores de carga estrogénica total efectiva (TEXB) de la fracción alfa y beta (Test de Mann-Whitney).

Para el caso de la variable número de pesticidas detectados en las muestras de tejido placentario, se utilizó el test de correlación de Pearson, ya que tanto el número de pesticidas como la edad de la madre tienen una distribución normal.

Además, se relacionó la edad de la madre, con otras variables de la encuesta, tales como el índice de masa corporal (IMC), número de hijos, semanas de gestación (Test de Spearman), ganancia de peso, peso, perímetro cefálico, índice ponderal (IP), (Test de Pearson), paridad y hábito tabáquico (ANOVA, prueba de Levene), y nivel educacional y trabajo actual (Test ANOVA de un factor).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la edad de la madre y pesticidas organoclorados

Según el test de correlación de Spearman, las concentraciones de los pesticidas organoclorados p,p'DDT, endosulfán-II y hexaclorobenceno (HCB) (ng/g lípido) en tejido placentario, mostraron una relación estadísticamente significativa con la edad. Esta correlación era positiva para el caso del p,p'DDT, es decir, a mayor edad, mayores niveles de este pesticida, y negativa para el caso de endosulfán-II y HCB (a mayor edad, menores niveles de estos pesticidas en tejido placentario). Además, los pesticidas endosulfán-diol y mirex tendían a la asociación estadística con la edad de la madre, con mayores niveles de estos pesticidas en madres de mayor edad.

Pesticidas	Edad de la madre			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	P	ρ	P
o,p' DDT	0.044	0.443	0.022	0.706
p,p' DDT	0.159	0.006**	0.152	0.008**
o,p' DDD	-0.015	0.794	-0.017	0.766
p,p' DDE	-0.024	0.672	-0.022	0.704
ΣDDTs	-0.078	0.175	-0.054	0.349

Pesticidas	Edad de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.036	0.537	0.015	0.792
E-II	-0.113	0.049*	-0.114	0.048*
E-éter	-0.043	0.453	-0.032	0.576
E-lactona	0.009	0.879	0.004	0.951
E-diol	0.018	0.064⁺	0.104	0.100⁺
E-sulfato	-0.076	0.191	-0.091	0.113
Σ Endos	0.078	0.174	0.064	0.266

E=Endosulfán

Pesticidas	Edad de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	-0.020	0.731	-0.023	0.693
Endrín	-0.009	0.879	-0.009	0.877
Dieldrín	-0.026	0.656	-0.028	0.624

Pesticidas	Edad de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	-0.106	0.066⁺	-0.115	0.046*
Lindano	0.074	0.202	0.047	0.420
Mirex	0.106	0.067⁺	0.102	0.076⁺
Metoxicloro	0.059	0.303	0.064	0.266

HCB= Hexaclorobenceno

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre la presencia (\geq LC)/ausencia ($<$ LC) del pesticida p,p' DDT y la edad de la madre y una tendencia a la asociación estadística para el caso del endosulfán-sulfato. De todas las madres con niveles detectables de p,p' DDT en su tejido placentario (n=140), un 57.86% tenían edad $>$ 32 años. Por edades, mayor número de madres con edad menor o igual a 32 años, no poseían p,p' DDT en su tejido placentario (56.44%), mientras que en el grupo de las de edad $>$ 32 años, un mayor número tenían en su tejido placentario este compuesto (53.28%). Para el caso del endosulfán-sulfato, 154 mujeres presentaban este compuesto en su tejido, de las cuales, un 54.54% tenían una edad \leq 32 años. Por edades, un mayor número de madres con edad \leq 32 años presentaban este compuesto (54.55%), mientras que un mayor número de madres con una edad superior a 32 años no lo poseían (45.45%).

Pesticidas	\geq LC	Edad de la madre		χ^2	P
		\leq 32 años	$>$ 32 años		
o,p' DDT	Sí	76	82	0.326	0.568
$\rho = -0.033$	No	74	70		
p,p' DDT	Sí	59	81	6.499	0.011*
$\rho = -0.147$	No	92	71		
p,p' DDD	Sí	68	79	1.333	0.248
$\rho = -0.066$	No	82	73		
p,p' DDE	Sí	139	141	0.001	0.974
$\rho = -0.002$	No	11	11		
ΣDDTs	Sí	148	147	1.318	0.251
$\rho = 0.065$	No	5	5		

Pesticidas	≥LC	Edad de la madre		χ^2	P
		≤32 años	>32 años		
E-I	Sí	79	84	0.152	0.696
$\rho = -0.023$	No	70	68		
E-II	Sí	49	44	0.490	0.484
$\rho = 0.040$	No	101	108		
E-éter	Sí	76	76	0.013	0.908
$\rho = 0.007$	No	74	76		
E-lactona	Sí	55	51	0.321	0.571
$\rho = 0.033$	No	95	101		
E-diol	Sí	75	79	0.379	0.538
$\rho = 0.039$	No	42	52		
E-sulfato	Sí	84	70	2.989	0.084⁺
$\rho = 0.004$	No	66	82		
ΣEndos	Sí	146	143	1.941	0.164
$\rho = 0.080$	No	4	9		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Edad de la madre		χ^2	P
		≤32 años	>32 años		
Aldrín	Sí	44	40	0.342	0.558
$\rho = 0.034$	No	106	112		
Endrín	Sí	51	52	0.001	0.969
$\rho = -0.002$	No	99	100		
Dieldrín	Sí	34	27	1.126	0.289
$\rho = 0.061$	No	116	125		

Pesticidas	≥LC	Edad de la madre		χ ²	P
		≤32 años	>32 años		
HCB ρ= 0.073	Sí	68	82	1.599	0.206
	No	58	94		
Lindano ρ= 0.027	Sí	114	112	0.215	0.643
	No	36	40		
Mirex ρ= -0.065	Sí	33	117	1.283	0.257
	No	42	110		
Metoxicloro ρ= 0.004	Sí	46	46	0.008	0.939
	No	104	106		

HCB=Hexaclorobenceno.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, se halló una asociación significativa entre la edad de la madre y los niveles de p,p´DDT, y endosulfán-sulfato (ng/g lípido), con mayores niveles medios de p,p´DDT y endosulfán-sulfato en madres de edad >32 y ≤32 años, respectivamente.

Pesticidas	U	Edad de la madre		P
		Medias(±DE)		
		≤32 años	>32 años	
o,p´DDT: ng/g placenta	10941.000	0.96(2.92)	0.69(0.72)	0.519
	ng/g lípido	11269.000	37.94(239.46)	12.89(34.01)
p,p´DDT: ng/g placenta	9536.500	1.38(5.08)	1.48(4.02)	0.007**
	ng/g lípido	9568.000	40.32(219.57)	41.25(139.41)
o,p´DDD: ng/g placenta	9568.000	2.07(4.58)	2.18(4.59)	0.505
	ng/g lípido	11021.000	44.30(132.38)	53.80(127.18)
p,p´DDE: ng/g placenta	10936.000	3.45(6.15)	3.26(6.87)	0.540
	ng/g lípido	10686.000	106.13(171.58)	100.12(211.64)
ΣDDTs: ng/g placenta	10934.500	7.20(9.35)	7.04(10.46)	0.539
	ng/g lípido	10873.500	272.42(543.61)	214.79(345.86)

Madres con edad ≤32años N=153 y >32años N=155.

Pesticidas	U	Edad de la madre		P	
		Medias(\pm DE)			
		≤ 32 años	> 32 años		
E-I:	ng/g placenta	10632.000	0.88(2.95)	0.73(1.34)	0.336
	ng/g lípido	10872.500	23.46(77.15)	22.89(53.21)	0.464
E-II:	ng/g placenta	10799.500	0.84(0.90)	1.22(4.26)	0.328
	ng/g lípido	10755.500	11.69(35.43)	15.78(95.22)	0.294
E-éter:	ng/g placenta	11119.000	0.22(0.52)	0.17(0.24)	0.692
	ng/g lípido	11137.500	7.64(28.37)	6.14(16.98)	0.712
E-lactona:	ng/g placenta	11103.000	1.09(3.47)	1.39(5.35)	0.650
	ng/g lípido	10999.000	40.44(240.05)	45.37(151.49)	0.535
E-diol:	ng/g placenta	7353.500	3.96(5.08)	4.84(5.69)	0.572
	ng/g lípido	7595.500	147.81(246.18)	171.44(344.60)	0.901
E-sulfato:	ng/g placenta	10145.000	1.00(2.84)	0.89(1.98)	0.078⁺
	ng/g lípido	9945.000	34.54(56.32)	33.90(92.76)	0.042*
ΣEndos :	ng/g placenta	11327.500	7.08(8.69)	8.66(14.15)	0.924
	ng/g lípido	11119.000	263.73.(443.70)	301.96(564.63)	0.711

E=Endosulfán. Madres con edad ≤ 32 años N=153 y > 32 años N=155.

Pesticidas	U	Edad de la madre		P	
		Medias(\pm DE)			
		≤ 32 años	> 32 años		
Aldrín:	ng/g placenta	11121.500	0.48(0.67)	0.50(0'85)	0.641
	ng/g lípido	11070.000	6.03(34.98)	9.70(29.28)	0.581
Endrín:	ng/g placenta	11264.000	2.05(5.17)	1.45(1.77)	0.831
	ng/g lípido	11272.500	36.89(107.22)	18.41(48.29)	0.842
Dieldrín :	ng/g placenta	10830.500	0.56(1.19)	0.47(0.85)	0.284
	ng/g lípido	10780.500	11.11(31.68)	9.60(42.89)	0.244

Madres con edad ≤ 32 años N=153 y > 32 años N=155.

Pesticidas	U	Edad de la madre		P	
		Medias(\pm DE)			
		≤ 32 años	> 32 años		
HCB:	ng/g placenta	10438.000	1.12(3.02)	0.70(1.63)	0.156
	ng/g lípido	10331.000	54.77(317.35)	13.46(44.79)	0.115
Lindano:	ng/g placenta	11067.000	0.48(0.77)	0.41(0.39)	0.652
	ng/g lípido	11220.000	14.23(35.42)	11.65(28.37)	0.809
Mirex:	ng/g placenta	10690.500	0.61(1.90)	0.66(1.66)	0.217
	ng/g lípido	10592.500	13.16(51.40)	19.40(85.20)	0.170
Metoxicloro:	ng/gplacenta	11283.000	0.75(1.56)	0.82(2.20)	0.849
	ng/g lípido	11314.000	15.91(52.45)	20.85(95.32)	0.888

HCB=Hexaclorobenceno. Madres con edad ≤ 32 años N=153 y > 32 años N=155.

II.- Relación entre la edad de la madre y el número de pesticidas por muestra

Según el test de correlación de Pearson, la asociación entre el número de pesticidas encontrados en las muestras de tejido placentario y la edad de la madre no era significativa.

Variable	Edad de la madre	
	r	P
Número de pesticidas	0.019	0.773

III.- Relación entre la edad de la madre y la TEXTB de la fracción alfa y beta

Según el test de correlaciones de Spearman, los niveles de carga estrogénica total efectiva de alfa estaban significativamente relacionados con la edad de las madres: a mayor edad, mayores valores de carga estrogénica en el tejido placentario.

TEXB	Edad de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Alfa	0.124	0.033*	0.137	0.018*
Beta	0.048	0.410	0.065	0.264

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre presencia de TEXB (valor por encima del LC) o no presencia (valor por debajo del LC) de estrogenicidad en la fracción beta y la edad de la madre, considerando como muestras con valor por encima del LC, aquellas con un valor igual o superior a 10^{-13} Eeq pM/g placenta. Del total de mujeres con un valor medible de TEXB en la fracción beta, un 52.6% tenían una edad >32años.

TEXB	\geq LC	Edad de la madre		χ^2	P
		\leq 32 años	>32 años		
Alfa	Sí	105	114	1.094	0.315
$\rho= 0.060$	No	48	40		
Beta	Sí	123	137	4.346	0.037*
$\rho= -0.019$	No	30	17		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al estudiar si existen diferencias significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en la fracción alfa/ beta de madres con edad \leq 32, con respecto a las que tienen una edad >32 años, ha aparecido una diferencia estadísticamente significativa para ambas fracciones, siendo mayores los valores medios de TEXB de la fracción alfa y beta en aquellos tejidos placentarios de madres con mayor edad, aunque para el caso de beta la diferencia entre los niveles medios es mínima (Test de Mann-Whitney).

TEXB	U	Edad de la madre		P
		Medias(\pm DE)		
		≤ 32 años	> 32 años	
Alfa: Eeq pM/g plac.	9121.00	3.44(11.74)	5.09(10.20)	0.009**
Eeq pM /g lípido	9091.00	130.37(335.54)	228.53(472.16)	0.006**
Beta: Eeq pM/g plac.	9358.50	20.30(80.27)	20.80(38.20)	0.012**
Eeq pM /g lípido	9300.00	931.54(2302.83)	1262.26(2703.06)	0.009**

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Madres con edad ≤ 32 años N=153 y > 32 años N=155.

IV.- Relación entre la edad de la madre y otras variables de la encuesta

Según el test de Spearman, existía una relación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el IMC antes de quedarse embarazada, con mayores IMC en madres de mayor edad. Como era de esperar, existía una asociación estadística entre la edad y el número de hijos (incluyendo el niño nacido durante este estudio), con mayor número de hijos a más edad, y tendencia a una asociación estadística negativa entre la edad y las semanas de gestación (mayor edad, menos semanas de gestación).

Variables	Edad de la madre	
	ρ	P
IMC antes	0.140	0.014*
Número de hijos	0.367	<0.001**
Semanas gestación	-0.106	0.075⁺

Según el test de Pearson, existía una relación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y la ganancia de peso, siendo esta última menor en madres de mayor edad.

Variables	Edad de la madre	
	r	P
Ganancia peso	-0.162	0.004**
Peso niño	-0.006	0.923
Índice ponderal	0.060	0.505
Perímetro cefálico	-0.093	0.338
Semanas gestación	-0.106	0.075

Según la prueba de Levene, existía una asociación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el hábito tabáquico, siendo más jóvenes las fumadoras. Sin embargo, no apareció una asociación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y la paridad, aunque, como se puede ver en los valores medios de ambos grupos, las mujeres multíparas tenían de media una edad mayor que las primíparas.

Variable	F	Medias(\pm DE)		P
Edad de la madre (años)	0.0001	Primípara	Multípara	0.997
		30.37(5.11)	33.75(5.14)	
	14.755	Fumadora	No fumadora	<0.001**
		31.16(6.48)	32.59(6.86)	

Primíparas N=142 y multíparas N=166. Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223

Según el test ANOVA de un factor, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la edad de la madre y el nivel de estudios. Las mujeres que tuvieron un hijo con mayor edad, eran las que tenían estudios universitarios.

Variable	F	Medias(\pm DE)			P
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Edad de la madre (años)	4.924	31.56(5.95)	32.20(4.67)	34.29(4.19)	0.008**
	0.854	Agricultura 33.87(5.82)	Hogar 31.89(5.89)	Otros 32.17(5.16)	

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89, estudios superiores N=54. Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otro tipo de trabajo N=198.

4.5.1.2. Índice de masa corporal antes del embarazo

Es interesante considerar como el índice de masa corporal (IMC) justo antes del embarazo podría condicionar la movilización de compuestos xenobióticos de los reservorios de grasa y la transferencia de los mismos a través de la placenta al niño. En este estudio, el test de correlación de Spearman se utilizó para determinar la relación existente entre el IMC y niveles de pesticidas, así como la relación con los niveles de TEXB de la fracción alfa y beta, con objeto de describir la influencia del IMC en la bioacumulación de organoclorados en tejido placentario. Las tablas de contingencia se usaron cuando se consideró el IMC y los niveles de pesticidas/estrogenicidad como variables discontinuas (IMC <25 ó ≥ 25 Kg/m²; presencia/ausencia de pesticidas/TEXB), para ver si el IMC por encima o por debajo de 25 influía en la detección o no en el tejido placentario de pesticidas o de TEXB. Además, se aplicó el test Mann-Whitney para relacionar la variable IMC dividida en estos dos grupos (<25 ó ≥ 25 Kg/m²) con los niveles de pesticidas/TEXB encontrados en las placentas.

Para ver la posible asociación entre el número de pesticidas encontrados en las muestras de tejido placentario y el IMC de la madre justo antes de quedarse embarazada, se utilizó el test de Spearman, ya que la variable IMC no poseía una distribución normal.

Por último, la variable IMC se relacionó con otras variables de la encuesta tales como: perímetro cefálico, peso del niño, IP neonatal, semanas de

gestación, número de hijos y ganancia de peso durante el embarazo (Test de correlación de Spearman), lugar de residencia, paridad, hábito tabáquico (Test de Mann-Whitney), trabajo durante el embarazo y nivel educacional (Test de Kruskal-Wallis).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre el índice de masa corporal de la madre y pesticidas organoclorados

Al considerar las dos variables como continuas, se hallaron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de p,p'DDE (ng/g lípido) y Σ endosulfanes en tejido placentario y el IMC justo antes del embarazo. Dicha asociación era positiva en ambos casos, presentando mayores niveles de sumatoria de endosulfanes y p,p'DDE el tejido placentario de aquellas madres con un mayor IMC. Además, existía una tendencia a una asociación estadísticamente significativa para el p,p'DDT (ng/g placenta), endosulfán-diol y endosulfán-sulfato (ng/g lípido), siendo negativa para el caso del p,p'DDT (a mayor cantidad de este pesticida en tejido placentario, menor IMC) y positiva para los otros dos pesticidas (a mayor cantidad en tejido placentario, mayor IMC). El test aplicado en este caso fue el test de correlación de Spearman.

Pesticidas	IMC de la madre			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
o,p'DDT	0.056	0.336	0.042	0.468
p,p'DDT	-0.101	0.079⁺	-0.087	0.132
o,p'DDD	-0.056	0.336	-0.050	0.389
p,p'DDE	0.101	0.082⁺	0.134	0.020*
Σ DDTs	-0.035	0.550	0.030	0.601

Pesticidas	IMC de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.040	0.487	0.034	0.560
E-II	0.055	0.343	0.057	0.321
E-éter	0.050	0.385	0.012	0.835
E-lactona	-0.014	0.804	-0.016	0.778
E-diol	0.113	0.077⁺	0.114	0.073⁺
E-sulfato	0.085	0.141	0.103	0.075⁺
ΣEndos	0.173	0.003^{**}	0.194	0.001^{**}

E=Endosulfán.

Pesticidas	IMC de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	0.036	0.535	0.034	0.558
Endrín	0.001	0.987	0.002	0.976
Dieldrín	0.056	0.332	0.060	0.298

Pesticidas	IMC de la madre			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	-0.062	0.284	-0.061	0.293
Lindano	0.029	0.622	0.029	0.620
Mirex	0.031	0.592	0.007	0.900
Metoxicloro	0.025	0.664	0.026	0.648

HCB=Hexaclorobenceno

Si en vez de considerar el IMC como variable continua, la consideramos discontinua y dividida en dos categorías ($<25 \text{ Kg/m}^2$ y $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$), y se relaciona con la variable cualitativa presencia/ausencia de pesticidas (por encima o por debajo del LC), el test aplicado son las tablas de contingencia. Como podemos ver en las tablas recogidas más abajo, los niveles de p,p'DDT tenían una asociación estadísticamente significativa con el IMC y además existe una tendencia a la asociación estadísticamente significativa entre p,p'DDE, endosulfán-sulfato y dieldrín y el IMC. Del total de madres que poseían p,p'DDT, p,p'DDE, endosulfán-sulfato y dieldrín en su tejido placentario, más del 50% tenían un IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$ (concretamente un 76.98% 69.89%, 66.66% y 62.30% del total, respectivamente). Por grupos, un 50% y 36.78% de las madres con un IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$ e IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$, tenía p,p'DDT en su tejido placentario; un 91.12% y un 96.56% p,p'DDE; un 47.66% y 58.62% endosulfán-sulfato y un 17.75% y 26.44% dieldrín.

Pesticidas	$\geq \text{LC}$	IMC		χ^2	P
		$<25 \text{ Kg/m}^2$	$\geq 25 \text{ Kg/m}^2$		
o,p' DDT	Sí	112	46	0.007	0.993
$\rho = -0.005$	No	102	41		
p,p' DDT	Sí	107	32	4.348	0.037*
$\rho = 0.120$	No	107	55		
o,p' DDD	Sí	108	38	1.141	0.285
$\rho = 0.062$	No	100	49		
p,p' DDE	Sí	195	84	3.080	0.079+
$\rho = -0.095$	No	19	3		
ΣDDTs	Sí	209	85	0.000	0.984
$\rho = 0.001$	No	5	2		

Pesticidas	≥LC	IMC		χ^2	P
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²		
E-I	Sí	116	46	0.063	0.802
	No	97	41		
$\rho = 0.014$	Sí	64	29	0.340	0.560
	No	150	58		
E-II	Sí	102	49	1.855	0.173
	No	112	38		
$\rho = -0.078$	Sí	74	31	0.030	0.862
	No	140	56		
E-lactona	Sí	103	50	1.418	0.234
	No	70	24		
$\rho = -0.076$	Sí	102	51	2.971	0.085⁺
	No	112	36		
E-sulfato	Sí	204	84	0.234	0.628
	No	10	3		
$\rho = -0.099$	Sí	204	84	0.234	0.628
	No	10	3		
ΣEndos	Sí	204	84	0.234	0.628
	No	10	3		
$\rho = -0.027$	Sí	204	84	0.234	0.628
	No	10	3		

E= Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	IMC		χ^2	P
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²		
Aldrín	Sí	58	26	0.238	0.626
	No	156	61		
$\rho = -0.028$	Sí	71	32	0.357	0.550
	No	143	55		
Endrín	Sí	38	23	2.884	0.089⁺
	No	176	64		
$\rho = -0.034$	Sí	38	23	2.884	0.089⁺
	No	176	64		
Dieldrín	Sí	38	23	2.884	0.089⁺
	No	176	64		
$\rho = -0.098$	Sí	38	23	2.884	0.089⁺
	No	176	64		

Pesticidas	≥LC	IMC		X ²	P
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²		
HCB ρ= 0.061	Sí	93	32	1.135	0.287
	No	121	55		
Lindano ρ= -0.067	Sí	156	69	1.348	0.246
	No	58	18		
Mirex ρ= -0.044	Sí	50	24	0.595	0.441
	No	164	63		
Metoxicloro ρ= 0.009	Sí	66	26	0.027	0.870
	No	148	61		

HCB=Hexaclorobenceno

Si en vez de relacionar la variable dicotómica IMC con la presencia/ausencia de pesticidas, se comparan los niveles de pesticidas que tienen las madres con un IMC <25 Kg/m² con las que tienen un IMC ≥25 Kg/m² (Test de Mann-Whitney), aparece una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de p,p'DDE (ng/g lípido), sumatoria de endosulfanes (ng/g lípido) e IMC. Además, existía una tendencia a la asociación estadística entre los niveles de endosulfán-sulfato, p,p'DDT (ng/g placenta) y lindano (ng/g lípido) y el IMC. Los niveles medios de p,p'DDT, endosulfán-sulfato, sumatoria de endosulfanes y lindano eran mayores en las madres con un IMC ≥25 Kg/m², en cambio, para el caso de p,p'DDE los niveles medios eran mayores en madres con IMC <25 Kg/m².

Pesticidas	U	IMC		P
		Medias(±DE)		
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²	
o,p´DDT: ng/g placenta	9520.500	0.89(2.48)	0.67(0.69)	0.837
	ng/g lípido	9142.500	30.17(201.74)	13.72(30.41)
p,p´DDT: ng/g placenta	8469.500	1.40(4.34)	1.52(5.13)	0.067⁺
	ng/g lípido	8381.000	32.70(102.17)	35.84(122.21)
o,p´DDD: ng/g placenta	8907.000	2.28(5.02)	1.77(3.29)	0.253
	ng/g lípido	8638.000	72.37(216.80)	45.03(93.66)
p,p´DDE: ng/g placenta	8512.500	3.43(7.36)	3.19(3.75)	0.100⁺
	ng/g lípido	7598.000	121.89(176.16)	95.90(198.98)
ΣDDTs: ng/g placenta	9156.000	7.38(10.14)	6.54(9.39)	0.476
	ng/g lípido	9161.500	254.54(510.50)	218.61(279.21)

IMC madre <25 Kg/m² N=218 e IMC madre ≥25 Kg/m² N=90.

Pesticidas	U	IMC		P	
		Medias(±DE)			
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²		
E-I:	ng/g placenta	9255.000	0.77(2.35)	0.88(2.14)	0.550
	ng/g lípido	8965.000	19.78(53.05)	31.87(93.69)	0.597
E-II:	ng/g placenta	9415.000	1.03(3.40)	1.06(2.17)	0.675
	ng/g lípido	8944.000	12.72(75.73)	16.42(62.38)	0.511
E-éter:	ng/g placenta	9028.500	0.16(0.28)	0.27(0.61)	0.341
	ng/g lípido	8965.500	5.94(19.52)	9.28(30.82)	0.593
E-lactona:	ng/g placenta	9628.500	1.50(5.19)	0.62(1.98)	0.963
	ng/g lípido	9278.500	51.01(230.28)	23.27(90.81)	0.958
E-diol:	ng/g placenta	8690.500	3.98(4.62)	5.40(6.89)	0.162
	ng/g lípido	5644.500	131.81(221.45)	227.02(431.58)	0.131
E-sulfato:	ng/g placenta	8601.500	0.85(2.42)	1.21(2.51)	0.099⁺
	ng/g lípido	8108.000	22.93(60.98)	56.62(153.52)	0.062⁺
ΣEndos :	ng/g placenta	8292.500	7.53(12.54)	8.70(9.70)	0.052⁺
	ng/g lípido	7690.000	248.57(467.54)	368.57(591.84)	0.018[*]

E=Endosulfán. IMC madre <25Kg N=218 e IMC madre ≥25Kg N=90.

Pesticidas		U	IMC		P
			Medias(\pm DE)		
			<25 Kg/m ²	\geq 25 Kg/m ²	
Aldrín:	ng/g placenta	9274.000	0.44(0.58)	0.62(1.10)	0.496
	ng/g lípido	8827.000	5.59(25.81)	13.51(43.99)	0.372
Endrín:	ng/g placenta	9647.000	1.83(4.40)	1.55(2.03)	0.987
	ng/g lípido	9260.500	30.71(93.39)	20.22(51.20)	0.933
Dieldrín :	ng/g placenta	9013.500	0.53(1.11)	0.49(0.84)	0.203
	ng/g lípido	8530.500	19.83(55.15)	12.98(43.59)	0.105

IMC madre <25 Kg/m² N=218 e IMC madre \geq 25 Kg/m² N=90.

Pesticidas		U	IMC		P
			Medias(\pm DE)		
			<25 Kg/m ²	\geq 25 Kg/m ²	
HCB:	ng/g placenta	8996.500	1.00(2.79)	0.67(1.10)	0.296
	ng/g lípido	8764.500	39.42(266.12)	20.97(62.02)	0.373
Lindano:	ng/g placenta	8634.500	0.43(0.64)	0.48(0.53)	0.136
	ng/g lípido	8125.000	11.08(29.57)	17.55(37.36)	0.077⁺
Mirex:	ng/g placenta	9354.500	0.61(1.67)	0.69(2.05)	0.576
	ng/g lípido	9099.500	15.42(71.13)	18.65(69.39)	0.692
Metoxicloro:	ng/g placenta	9617.500	0.70(1.49)	0.99(2.68)	0.946
	ng/g lípido	9163.500	14.63(73.05)	27.88(85.99)	0.793

HCB=Hexaclorobenceno. IMC madre <25 Kg/m² N=218 e IMC madre \geq 25 Kg/m² N=90.

II.- Relación entre el índice de masa corporal de la madre y el número de pesticidas por muestra

Según el test de correlación de Spearman, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas encontrados en las muestras de tejido placentario y el IMC de la madre justo antes de quedarse embarazada.

Variable	IMC de la madre	
	ρ	P
Número de pesticidas	0.043	0.456

III.- Relación entre el índice de masa corporal de la madre y la TEXB de la fracción alfa y beta

Según el test de correlación de Spearman, no existía una asociación estadística significativa entre los niveles de carga estrogénica total efectiva de las fracciones alfa y beta y el IMC de la madre.

TEXB	IMC de la madre			
	ρ		P	
	ng/g placenta	ng/g lípido		
Alfa	0.009	0.878	0.047	0.422
Beta	-0.039	0.503	-0.016	0.778

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según las tablas de contingencia, se halló una tendencia hacia la asociación estadística significativa entre la presencia o ausencia de estrogenicidad en la fracción alfa y el IMC. Alrededor del 68% y 79% de las madres de este estudio que poseían un IMC $<25\text{Kg/m}^2$ e IMC $\geq 25\text{ Kg/m}^2$, respectivamente, tenían estrogenicidad en la fracción alfa de su tejido placentario. Además, del total de madres con un valor medible de TEXB de la fracción alfa en el tejido placentario (n=217), un 67.74% tenían un IMC $<25\text{ Kg/m}^2$ antes del embarazo.

TEXB	≥LC	IMC		X ²	P
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²		
Alfa	Sí	147	70	3.447	0.063⁺
ρ= -0.106	No	69	19		
Beta	Sí	185	73	0.636	0.425
ρ= 0.046	No	31	16		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. IMC madre <25 Kg/m² N=218 e IMC madre ≥25 Kg/m² N=90.

Según el test Mann-Whitney, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estrogénicidad encontrados en la fracción alfa o beta de madres con IMC <25 Kg/m², con respecto a las que tenían un IMC ≥25 Kg/m², pero los valores medios de TEXB en ambas fracciones, eran mayores en madres con IMC ≥25 Kg/m².

TEXB	U	IMC		P
		Medias(±DE)		
		<25 Kg/m ²	≥25 Kg/m ²	
Alfa: Eeq pM/g plac.	8694.000	4.19(9.65)	4.56(13.95)	0.897
Eeq pM /g lípido	8390.000	180.06(413.11)	180.30(418.48)	0.508
Beta: Eeq pM/g plac.	8643.000	17.10(34.79)	29.20(102.96)	0.792
Eeq pM /g lípido	8757.000	1097.03(2507.52)	1114.05(2555.22)	0.929

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. IMC madre >25 Kg/m² N=218 e IMC madre ≥25 Kg/m² N=90.

IV.- Relación entre el índice de masa corporal de la madre y otras variables de la encuesta

Según el test de correlación de Spearman, existía una asociación estadísticamente significativa entre el IMC justo antes de quedarse embarazada y el índice ponderal (IP) neonatal, perímetro cefálico y ganancia de peso, siendo

esta relación positiva para las primeras dos variables, con mayores IMC en madres con niños con mayor IP y perímetro cefálico y negativa para la tercera, con mayores ganancias de peso durante el embarazo en madres con menor IMC. Además, existía una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre el IMC y el peso del niño, así como con el número de hijos (incluyendo el del estudio) con mayores IMC en madres que tuvieron niños con un peso mayor y mayor número de hijos.

Variables	IMC antes del embarazo	
	ρ	P
Perímetro cefálico	0.222	0.021*
Peso niño	0.104	0.076⁺
Índice ponderal	0.243	0.007**
Semanas de gestación	0.060	0.320
Número de hijos	0.109	0.056⁺
Ganancia de peso	-0.198	<0.001**

Existía una tendencia a una asociación significativa entre el IMC y paridad (Test de Mann-Whitney), siendo mayor el IMC en las madres multíparas que en las primíparas.

Variable	U	Medias(\pm DE)		P
IMC antes embarazo (Kg/m ²)	10680.500	Rural	Urbana	0.524
		23.41(4.31)	23.56(4.01)	
	10353.000	Primípara	Multípara	0.100⁺
8850.000	Fumadora	No fumadora	0.434	
		23.31(4.35)	23.55(4.04)	

Zona de residencia rural (<10.000 habitantes) N=128 y urbana (\geq 10.000 habitantes) N=180. Primíparas N=142 y multíparas N=166. Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

Se ha hallado, según el test de Kruskal-Wallis, una asociación entre el tipo de trabajo desarrollado por la madre durante el embarazo y el IMC justo antes de quedarse embarazada, con mayores índices de masa corporal en madres que trabajaban en agricultura, seguido de las que trabajaban en el hogar.

Variable	χ^2	Medias(\pm DE)			P
IMC antes del embarazo (Kg/m ²)	1.601	Sin/primarios	Medios	Superiores	0.449
			23.78(4.35)	23.44(4.27)	
	12.257	Agricultura	Hogar	Otros	0.002**
		25.82 (3.78)	24.11(4.22)	23.05(4.05)	

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54. Mujeres que trabajan en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otro tipo de trabajo N=198.

4.5.1.3. Ganancia de peso durante el embarazo

Es interesante considerar cómo la ganancia de peso durante el embarazo podría condicionar la movilización de contaminantes químicos almacenados en los reservorios de grasa durante la vida de las madres y ponerlos a disposición del feto. Así pues, se utilizó el test de correlación de Spearman, cuando ambas variables se consideraron como continuas y las tablas de contingencia y el test de Mann-Whitney cuando la ganancia de peso, se dividió en dos categorías (≤ 12 Kg y >12 Kg) y los niveles de pesticidas/TEXB se fragmentaron en dos categorías (presencia/ausencia), para el primer caso, o se consideran como variables continuas, en el segundo caso.

La prueba de Levene se aplicó para ver si el número de pesticidas en tejido placentario estaba asociado con la ganancia de peso durante el embarazo.

Además, se analizaron las posibles asociaciones estadísticas entre ganancia de peso y algunas variables de la encuesta tales como peso, IP, perímetro cefálico (Test de Pearson), semanas de gestación del niño, número de hijos (Test de correlación de Spearman), residencia, paridad, hábito tabáquico

(Prueba de Levene), nivel de estudios y tipo de trabajo realizado durante el embarazo (Test ANOVA de un factor).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01^{**}$, $p \leq 0.05^{*}$ y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1^{+}$.

I.- Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y pesticidas organoclorados

Existía una asociación estadísticamente significativa entre la ganancia de peso y los niveles de los pesticidas endrín y lindano (ng/g lípido), así como una tendencia a la asociación estadísticamente significativa con el p,p'DDE (ng/g lípido) y diendrín (ng/g lípido). En todos los casos, la asociación estadística era negativa, es decir, a mayor ganancia de peso, menores niveles de estos pesticidas (Test de correlación de Spearman).

Pesticidas	Ganancia de peso			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
o,p'DDT	-0.012	0.838	-0.014	0.806
p,p'DDT	-0.028	0.621	-0.028	0.624
o,p'DDD	0.002	0.976	-0.029	0.615
p,p'DDE	-0.047	0.418	-0.101	0.082⁺
Σ DDTs	-0.004	0.948	-0.044	0.451

Pesticidas	Ganancia de peso			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	-0.057	0.319	-0.082	0.156
E-II	-0.072	0.209	-0.091	0.117
E-éter	-0.043	0.456	-0.045	0.434
E-lactona	0.039	0.501	0.023	0.691
E-diol	-0.013	0.827	-0.003	0.959
E-sulfato	-0.032	0.575	-0.044	0.452
Σ Endos	-0.033	0.565	-0.046	0.425

E=Endosulfán.

Pesticidas	Ganancia de peso			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	0.006	0.920	-0.008	0.895
Endrín	-0.131	0.022*	-0.149	0.010*
Dieldrín	-0.081	0.156	-0.103	0.074⁺

Pesticidas	Ganancia de peso			
	ρ	P	P	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	-0.033	0.563	-0.044	0.443
Lindano	-0.111	0.052⁺	-0.117	0.043*
Mirex	-0.013	0.816	-0.026	0.660
Metoxicloro	-0.046	0.424	-0.063	0.274

HCB=Hexaclorobenceno

Al construir las tablas de contingencia, se halló una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de la sumatoria de DDTs, y endosulfán-II con la ganancia de peso durante el embarazo. Además, existía una tendencia a la asociación estadísticamente significativa entre esta última variable y p,p'DDE, endosulfán-sulfato y endrín. De entre el total de tejidos placentarios de madres que poseían p,p'DDE, sumatoria de DDTs, endosulfán-II, endosulfán-sulfato y endrín, un 52.16%, 51.53%, 61.96%, 55.55%, 58.25%, ganaron $\leq 12\text{Kg}$ durante el embarazo. Del total de madres que ganaron un peso $\leq 12\text{Kg}$, un 93.39%, 99.34%, 37.5%, 55.92%, y 39.47%, tenían un valor medible de p,p'DDE, sumatoria de DDTs, endosulfán-II, endosulfán-sulfato y endrín, respectivamente. Y del grupo de madres con una ganancia de peso $>12\text{Kg}$, un 89.86%, 95.95%, 30.97%, 45.95% y 29.5%, tenían un valor medible de p,p'DDE, sumatoria de DDTs, endosulfán-II, endosulfán-sulfato y endrín, respectivamente.

Pesticidas	$\geq\text{LC}$	Ganancia de peso		χ^2	P
		$\leq 12\text{Kg}$	$>12\text{Kg}$		
o,p' DDT $\rho = -0.014$	Sí	79	79	0.059	0.808
	No	73	69		
p,p' DDT $\rho = 0.028$	Sí	72	66	0.232	0.630
	No	80	82		
o,p' DDD $\rho = 0.027$	Sí	76	70	0.219	0.640
	No	76	78		
p,p' DDE $\rho = 0.106$	Sí	145	133	3.374	0.066⁺
	No	7	15		
ΣDDTs $\rho = 0.112$	Sí	151	142	4.186	0.041[*]
	No	1	6		

Pesticidas	Presencia	Ganancia de peso		χ^2	P
		$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$		
E-I	Sí	86	75	0.929	0.335
	No	66	72		
$\rho = 0.056$					
E-II	Sí	57	35	6.766	0.009**
	No	95	113		
$\rho = 0.150$					
E-éter	Sí	75	76	0.121	0.728
	No	77	72		
$\rho = -0.020$					
E-lactona	Sí	49	56	1.034	0.309
	No	103	92		
$\rho = -0.059$					
E-diol	Sí	74	79	0.674	0.412
	No	50	43		
$\rho = -0.052$					
E-sulfato	Sí	85	68	2.986	0.084⁺
	No	67	80		
$\rho = 0.100$					
ΣEndos	Sí	147	140	0.810	0.368
	No	5	8		

E= Endosulfán.

Pesticidas	$\geq \text{LC}$	Ganancia de peso		χ^2	P
		$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$		
Aldrín	Sí	44	39	0.253	0.615
	No	108	109		
$\rho = 0.029$					
Endrín	Sí	60	43	3.611	0.057⁺
	No	92	105		
$\rho = 0.010$					
Dieldrín	Sí	35	26	1.379	0.240
	No	117	122		
$\rho = 0.068$					

Pesticidas	≥LC	Ganancia de peso		X ²	P
		≤12Kg	>12Kg		
HCB ρ= 0.050	Sí	67	58	0.738	0.390
	No	85	90		
Lindano ρ= -0.023	Sí	112	112	0.157	0.692
	No	40	36		
Mirex ρ= 0.008	Sí	38	36	0.018	0.892
	No	114	112		
Metoxicloro ρ= -0.009	Sí	46	46	0.024	0.878
	No	106	102		

HCB=Hexaclorobenceno.

Si en vez de relacionar la variable dicotómica ganancia de peso con la presencia (<LC)/ausencia (<LC) de pesticidas, se comparan los niveles de pesticidas que tienen las madres con una ganancia de peso ≤12Kg con las que tienen una ganancia de peso >12Kg, el test a aplicar es el test de Mann-Whitney. Según éste, aparecieron asociaciones estadísticamente significativas entre la ganancia de peso y las concentraciones de endosulfán-II y endrín (ng/g lípido). Para el caso del primer pesticida, los niveles medios de endosulfán-II eran mayores en madres con una ganancia de peso >12Kg, mientras que para el caso del endrín, los niveles medios eran mayores en mujeres que ganaron ≤12Kg durante el embarazo.

Pesticidas	U	Ganancia de peso		P
		Medias(\pm DE)		
		$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$	
o,p´DDT: ng/g placenta	11140.500	0.75(1.92)	0.87(2.30)	0.504
	ng/g lípido	10690.000	30.94(228.90)	19.91(75.78)
p,p´DDT: ng/g placenta	11365.000	1.82(6.15)	0.98(1.65)	0.714
	ng/g lípido	11156.500	63.38(357.58)	31.88(96.46)
o,p´DDD: ng/g placenta	11397.000	2.39(5.33)	1.81(3.59)	0.751
	ng/g lípido	10815.000	81.57(243.77)	47.33(109.02)
p,p´DDE: ng/g placenta	11075.500	3.41(6.45)	3.20(6.56)	0.475
	ng/g lípido	10312.500	103.80(173.07)	103.60(212.12)
Σ DDTs: ng/g placenta	11432.000	7.73(11.41)	6.30(8.01)	0.802
	ng/g lípido	10909.000	281.61(579.22)	206.96(275.79)

Ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ N=127 y ganancia de peso $> 12\text{Kg}$ N=181.

Pesticidas	U	Ganancia de peso		P
		Medias(\pm DE)		
		$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$	
E-I: ng/g placenta	10992.500	0.82(2.63)	0.75(1.84)	0.389
	ng/g lípido	10400.000	25.08(60.69)	21.49(74.06)
E-II: ng/g placenta	10233.000	0.93(1.56)	1.11(4.10)	0.027*
	ng/g lípido	9759.000	11.27(42.66)	16.39(93.32)
E-éter: ng/g placenta	11470.500	0.17(0.30)	0.21(0.49)	0.831
	ng/g lípido	11111.000	6.18(16.76)	7.70(28.69)
E-lactona: ng/g placenta	10765.500	1.00(3.94)	1.47(5.00)	0.199
	ng/g lípido	10442.000	41.36(236.76)	44.95(156.18)
E-diol: ng/g placenta	11114.000	3.25(4.48)	3.90(5.81)	0.499
	ng/g lípido	7231.500	163.84(350.50)	158.08(246.69)
E-sulfato: ng/g placenta	10859.500	1.06(3.09)	0.81(1.47)	0.292
	ng/g lípido	10534.000	40.08(126.14)	25.27(56.49)
Σ Endos : ng/g placenta	11273.000	7.19(10.14)	0.45(0.55)	0.648
	ng/g lípido	10948.000	291.94(590.70)	276.08(410.75)

Ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ N=127 y ganancia de peso $> 12\text{Kg}$ N=181.

Pesticidas		U	Ganancia de peso		P
			Medias(\pm DE)		
			$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$	
Aldrín:	ng/g placenta	11502.000	0.50(0.89)	0.45(0.55)	0.841
	ng/g lípido	11060.000	8.05(236.76)	7.50(24.36)	0.750
Endrín:	ng/g placenta	10423.000	2.13(5.21)	1.31(1.35)	0.066⁺
	ng/g lípido	9969.500	35.79(100.68)	19.53(60.54)	0.045*
Dieldrín :	ng/g placenta	11108.000	0.54(1.10)	0.94(2.18)	0.351
	ng/g lípido	10661.000	13.28(47.99)	7.47(22.89)	0.266

Ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ N=127 y ganancia de peso $> 12\text{Kg}$ N=181.

Pesticidas		U	Ganancia de peso		P
			Medias(\pm DE)		
			$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$	
HCB:	ng/g placenta	11230.000	0.85(2.63)	0.94(2.18)	0.568
	ng/g lípido	10831.000	44.57(310.03)	23.55(77.76)	0.535
Lindano:	ng/g placenta	11138.500	0.43(0.43)	0.44(0.74)	0.517
	ng/g lípido	10787.000	14.65(33.86)	11.16(30.28)	0.531
Mirex:	ng/g placenta	11615.000	0.75(2.47)	0.50(0.66)	0.987
	ng/g lípido	11189.000	22.72(93.47)	9.93(33.07)	0.919
Metoxicloro:	ng/g placenta	11510.500	0.97(2.47)	0.56(0.99)	0.856
	ng/g lípido	11067.500	28.05(105.21)	8.73(23.86)	0.767

HCB=Hexaclorobenceno. Ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ N=127 y ganancia de peso $> 12\text{Kg}$ N=181.

II.- Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y el número de pesticidas por muestra

Según el test de correlación de Spearman, existía una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas por muestra y la ganancia de peso. La relación era negativa, es decir, a mayor ganancia de peso, menor número de pesticidas en el tejido placentario.

Variable	Ganancia de peso	
	ρ	P
Número de pesticidas	-0.127	0.028*

III.- Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y la TEXB de la fracción alfa y beta

No apareció una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de TEXB de alfa y beta y la ganancia de peso (Test de Spearman).

TEXB	Ganancia de peso			
	ρ		P	
	ng/g placenta	ng/g lípido		
Alfa	-0.006	0.920	-0.002	0.974
Beta	-0.050	0.392	-0.039	0.511

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según las tablas de contingencia, tampoco había asociación estadísticamente significativa entre la ganancia de peso y la TEXB de la fracción alfa o beta y no existían grandes diferencias entre el número de mujeres con presencia de TEXB en alfa o beta en función de si ganaron $\leq 12\text{Kg}$ ó $> 12\text{Kg}$.

TEXB	$\geq \text{LC}$	Ganancia de peso		χ^2	P
		$\leq 12\text{Kg}$	$> 12\text{Kg}$		
Alfa	Sí	106	111	0.994	0.319
	No	48	39		
Beta	Sí	132	125	0.330	0.566
	No	22	25		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ N=127 y ganancia $> 12\text{Kg}$ N=181.

Aunque no había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estrogenicidad encontrados en la fracción alfa o beta de madres con ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$, con respecto a las que ganaron más de 12Kg (Test de Mann-Whitney), los valores medios de TEXB en ambas fracciones eran mayores en madres con ganancia de peso $>12\text{Kg}$.

TEXB	U	Ganancia de peso		P
		Medias($\pm\text{DE}$)		
		$\leq 12\text{Kg}$	$>12\text{Kg}$	
Alfa: Eeq pM/g plac.	10189.000	3.67(8.25)	4.96(13.31)	0.512
Eeq pM /g lípido	10192.000	161.58(375.52)	200.77(451.79)	0.454
Beta: Eeq pM/g plac.	10078.500	19.56(35.73)	22.00(83.09)	0.550
Eeq pM /g lípido	10298.000	1082.84(2133.89)	1124.51(2121.46)	0.772

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ N=127 y ganancia $>12\text{Kg}$ N=181.

IV.- Relación entre la ganancia de peso durante el embarazo y otras variables de la encuesta

Al aplicar el test de correlación de Pearson apareció una asociación estadísticamente significativa entre el peso del niño y la ganancia de peso, naciendo con mayores pesos aquellos niños de madres que ganaron más peso durante el embarazo. El número de hijos (incluyendo el de este estudio) estaba asociado estadísticamente con la ganancia de peso, con menores ganancias de peso durante el embarazo entre las que tenían más hijos (Test de Spearman). No había asociación estadística entre la ganancia de peso, perímetro cefálico, IP (Test de Pearson) y semanas de gestación (Test de Spearman), aunque la tendencia era que a mayor perímetro cefálico y mayor número de semanas de gestación, mayor ganancia de peso y a mayor IP, menor ganancia de peso.

Variables	Ganancia de peso	
	r	P
Perímetro cefálico	0.087	0.365
Peso niño	0.113	0.055⁺
IP niño	-0.046	0.609

Variables	Ganancia de peso	
	ρ	P
Semanas gestación	0.058	0.332
IMC	-0.261	<0.001**
Nº de hijos	-0.163	0.004**

Además, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la ganancia de peso y la paridad (Prueba de Levene). Las madres primíparas ganaron más peso durante el embarazo que las multíparas.

Variable	F	Medias(\pm DE)		P
Ganancia de peso (Kg)	10.282	Rural	Urbana	0.276
		12.27(5.48)	13.17(5.86)	
	9.500	Primípara	Multípara	0.008*
13.48(5.63)		12.18(5.72)		
8.355	Fumadora	No fumadora	0.177	
	13.50(6.22)	12.50(5.49)		

Zona de residencia rural (<10.000 habitantes) N=128 y urbana (\geq 10.000 habitantes) N=180. Primíparas N=142 y multíparas N=166. Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

Al aplicar el test de ANOVA de un factor, no se halló asociación estadística entre la ganancia de peso durante el embarazo y el nivel educacional o el tipo de trabajo desarrollado durante el embarazo. Aunque se comprobó que mujeres sin

estudios o con estudios primarios y las que trabajaban en otro tipo de actividad, no relacionada con el hogar y la agricultura, ganaron mayor peso.

Variable	F	Medias(\pm DE)			P
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Ganancia de peso (Kg)	2.537	13.14(5.95)	12.08(5.69)	12.96(4.84)	0.281
	0.152	Agricultura 12.51(5.04)	Hogar 12.62(3.94)	Otros 12.85(6.14)	0.927

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89, estudios superiores N=54. Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otro tipo de trabajo N=198.

4.5.1.4. Lugar de residencia

La cercanía de la vivienda de la madre a zonas donde se utilizan sustancias químicas, puede estar relacionado con los niveles de estos mismos compuestos encontrados en el tejido placentario. En este estudio se ha intentado ver si la residencia (rural o urbana) de la madre durante el embarazo, estaba relacionado con los niveles de compuestos químicos encontrados en las muestras. Para esta variable se llevó a cabo el estudio de relación entre vivir en un área rural (<10.000 habitantes) o urbana (\geq 10.000 habitantes) y la presencia/ausencia de los distintos pesticidas o la presencia/ausencia de TEXB en los tejidos placentarios mediante las tablas de contingencia. Además, se aplicó el test Mann-Whitney, con el fin de observar posibles asociaciones entre los niveles de los distintos pesticidas/TEXB de las fracciones y vivir en un área rural o urbana.

La prueba de Levene se utilizó para ver si existía una relación entre el número de pesticidas por muestra de tejido placentario y el lugar de residencia.

Por último, la residencia se relacionó con otras variables de la encuesta tales como: nivel de estudios, trabajo durante el embarazo, hábito tabáquico, paridad, (Tablas de contingencia) y número de hijos (Test de Mann-Whitney).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre lugar de residencia y pesticidas organoclorados

Al enfrentar la variable cuantitativa categorizada presencia/ausencia de pesticidas a la variable categorizada vivir en una zona rural (<10.000 habitantes) o urbana (≥ 10.000 habitantes), solamente se encontró una asociación significativa entre la presencia/ausencia ($\geq LC$ o $< LC$, respectivamente) en tejido placentario de metoxicloro y vivir en una zona rural o urbana. Del total de mujeres que presentaban este pesticida en su tejido placentario ($n=92$), un 52.17% vivían en una zona urbana. Además, la presencia o ausencia del pesticida o,p'DDD tendía a tener una asociación estadísticamente significativa con el lugar de residencia, siendo mayor el número de mujeres que poseían este pesticida entre las que residían en una zona rural (54.10%).

Pesticidas	$\geq LC$	Lugar de residencia		χ^2	P
		Urbana	Rural		
o,p' DDT $\rho = 0.040$	Sí	67	90	0.480	0.488
	No	55	87		
p,p' DDT $\rho = -0.023$	Sí	55	84	0.164	0.686
	No	67	93		
o,p' DDD $\rho = 0.101$	Sí	67	79	3.058	0.080⁺
	No	55	98		
p,p' DDE $\rho = -0.053$	Sí	111	166	0.832	0.362
	No	11	11		
$\Sigma DDTs$ $\rho = -0.006$	Sí	119	173	0.012	0.911
	No	3	4		

Pesticidas	≥LC	Lugar de residencia		χ^2	P
		Urbana	Rural		
E-I $\rho = 0.063$	Sí	70	91	1.200	0.273
	No	51	86		
E-II $\rho = 0.022$	Sí	39	53	0.139	0.709
	No	83	124		
E-éter $\rho = -0.030$	Sí	59	91	0.269	0.604
	No	63	86		
E-lactona $\rho = -0.083$	Sí	37	68	2.075	0.150
	No	85	109		
E-diol $\rho = -0.050$	Sí	57	95	0.621	0.431
	No	40	54		
E-sulfato $\rho = -0.022$	Sí	60	91	0.144	0.704
	No	62	86		
ΣEndos $\rho = 0.044$	Sí	118	168	0.586	0.452
	No	4	9		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Lugar de residencia		χ^2	P
		Urbana	Rural		
Aldrín $\rho = -0.013$	Sí	33	50	0.052	0.820
	No	89	127		
Endrín $\rho = 0.034$	Sí	44	58	0.349	0.554
	No	78	119		
Dieldrín $\rho = 0.002$	Sí	25	36	0.001	0.974
	No	97	141		

Pesticidas	≥LC	Lugar de residencia		χ^2	P
		Urbana	Rural		
HCB	Sí	56	68	1.666	0.197
	No	66	108		
Lindano	Sí	90	133	0.072	0.789
	No	32	44		
Mirex	Sí	30	44	0.003	0.958
	No	92	133		
Metoxicloro	Sí	48	44	7.114	0.008**
	No	74	133		

HCB=Hexaclorobenceno.

Si en lugar de relacionar la presencia/ausencia de pesticidas con el lugar de residencia (rural/urbano), se correlacionan los niveles de los pesticidas en tejido placentario con esta última, con el objetivo de ver si la cantidad de cada uno de los pesticidas encontrados en las muestras varía en función de residir en una zona rural o en una zona urbana, debido a una posible diferencia entre los niveles y el tipo de compuestos al que se está expuesto, el número de relaciones aumentó (Test de Mann-Whitney). El metoxicloro estaba asociado significativamente con el lugar de residencia. Con mayores niveles medios de este compuesto en mujeres que vivían en una zona urbana. El pesticida o,p´DDD poseía una asociación estadísticamente significativa con el lugar de residencia, siendo mayores los niveles medios entre las mujeres que residían en una zona urbana. Además, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la Σ DDTs y el vivir en zona rural o urbana, encontrando niveles medios mayores en mujeres que vivían en una zona urbana. Por último, los niveles de endosulfán-lactona tendían a una asociación estadísticamente significativa, siendo los niveles medios mayores en mujeres que residían en una zona rural.

Pesticidas	U	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
		Urbana	Rural	
o,p´DDT: ng/g placenta	10338.000	1.06(3.20)	0.66(0.76)	0.506
	ng/g lípido	10171.500	44.54(265.00)	12.50(33.08)
p,p´DDT: ng/g placenta	10779.500	1.94(6.51)	1.10(2.50)	0.979
	ng/g lípido	10776.000	74.32(395.57)	30.10(97.43)
o,p´DDD: ng/g placenta	9317.000	2.65(5.12)	1.79(4.18)	0.030*
	ng/g lípido	9218.000	85.77(195.24)	50.51(186.20)
p,p´DDE: ng/g placenta	10314.000	3.80(7.42)	3.08(5.86)	0.511
	ng/g lípido	9595.500	106.232(154.65)	102.46(216.29)
ΣDDTs: ng/g placenta	9244.500	8.79(12.08)	6.06(8.00)	0.035*
	ng/g lípido	8674.500	310.35(582.05)	200.96(339.98)

Rural=<10.000 habitantes (N=128) y urbana= \geq 10.000 habitantes (N=180).

Pesticidas	U	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
		Urbana	Rural	
E-I: ng/g placenta	9774.500	1.18(3.42)	0.55(0.86)	0.179
	ng/g lípido	9791.000	33.20(92.29)	16.61(42.13)
E-II: ng/g placenta	10413.000	1.33(4.62)	0.84(1.25)	0.518
	ng/g lípido	10470.000	21.63(104.35)	8.53(35.89)
E-éter: ng/g placenta	10203.000	0.18 (0.45)	0.20 (0.38)	0.387
	ng/g lípido	10279.000	6.08(24.50)	7.54(22.71)
E-lactona: ng/g placenta	9742.000	0.99(4.43)	1.44(4.60)	0.096⁺
	ng/g lípido	9736.500	43.57(254.96)	46.62(133.93)
E-diol: ng/g placenta	6967.500	4.60(6.41)	4.27(4.72)	0.625
	ng/g lípido	7134.500	164.34(268.97)	158.11(324.16)
E-sulfato: ng/g placenta	10794.000	1.17(3.22)	0.80(1.73)	0.997
	ng/g lípido	10755.000	36.32(89.68)	30.47(104.22)
ΣEndos : ng/g placenta	10606.500	8.48(14.92)	7.48(9.11)	0.795
	ng/g lípido	10757.000	303.88(545.57)	271.25(485.01)

E=Endosulfán. Rural=<10.000 habitantes (N=128) y urbana= \geq 10.000

Pesticidas	U	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
		Urbana	Rural	
Aldrín: ng/g placenta	10748.500	0.53(0.81)	0.47(0.74)	0.933
	ng/g lípido	10716.000	8.63(34.53)	7.45(30.86)
Endrín: ng/g placenta	10272.000	2.14(5.67)	1.49(1.79)	0.395
	ng/g lípido	10338.000	38.82(110.30)	20.30(57.97)
Dieldrín : ng/g placenta	10730.000	0.46(0.63)	0.56(1.24)	0.897
	ng/g lípido	10711.500	11.17(37.22)	9.95(38.40)

Rural= $<$ 10.000 habitantes (N=128) y urbana= \geq 10.000 habitantes (N=180).

Pesticidas	U	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
		Urbana	Rural	
HCB: ng/g placenta	10159.000	1.08(3.34)	0.79(1.54)	0.330
	ng/g lípido	10035.500	52.63(345.84)	21.63(71.22)
Lindano: ng/g placenta	10231.500	0.39(0.41)	0.48(.071)	0.429
	ng/g lípido	10317.000	10.74(25.16)	14.56(36.23)
Mirex: ng/g placenta	10725.500	0.70(1.87)	0.60(1.74)	0.898
	ng/g lípido	10708.000	22.15(93.27)	12.54(49.58)
Metoxicloro: ng/g placenta	9386.000	1.02(2.78)	0.63(1.26)	0.018*
	ng/g lípido	9352.000	30.78(112.58)	10.17(35.25)

HCB= Hexaclorobenceno. Rural= $<$ 10.000 habitantes (N=128) y Urbana= \geq 10.000 habitantes (N=180).

II.- Relación entre lugar de residencia y el número de pesticidas por muestra

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el lugar de residencia y el número de pesticidas, al aplicar la Prueba de Levene. Pero

como se observa en el número medio de pesticidas en cada grupo, éste era mayor entre las mujeres que vivían en la zona urbana.

Variable	F	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
Número de pesticidas	0.713	Rural	Urbana	0.399
			7.49(3.02)	

Rural=<10.000 habitantes(N=128) y urbana= \geq 10.000 habitantes (N=180).

III.- Relación entre lugar de residencia y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la presencia/ausencia de estrogenicidad en la fracción alfa y beta con el lugar de residencia, se observó que no existía asociación estadísticamente significativa. Solamente en el caso de la fracción beta, esta asociación tendía a ser significativa. El número de mujeres que presentaban TEXB de la fracción beta en su tejido placentario era mayor en mujeres que residían en una zona rural, al igual que para el caso de la fracción alfa, aunque no existía asociación.

TEXB	\geq LC	Lugar de residencia		χ^2	P
		Urbana	Rural		
Alfa	Sí	85	131	0.481	0.488
	No	38	49		
Beta	Sí	109	147	2.694	0.095⁺
	No	14	33		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según el test de Mann-Whitney, al relacionar los niveles de estrogenicidad obtenidos en la fracción alfa y en la beta, con la residencia, no se encontró ninguna asociación significativa, e incluso la tendencia a una asociación

significativa encontrada en el test anterior para el caso de la fracción beta desaparecía. Pero los niveles medios de TEXB en ambas fracciones eran más elevados en los tejidos placentarios de las que mujeres que vivían en una zona urbana.

TEXB	U	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
		Rural	Urbana	
Alfa:Eeq pM/				
g placenta	10256.00	4,11 (9,64)	4,46 (12,01)	0.940
g lípido	17759.00	175.39 (392.15)	185,51 (432,25)	0.905
Beta:Eeq pM/				
g placenta	9757.00	12,75 (26,61)	26,44 (79,38)	0.583
g lípido	9925.00	925,08 (2304,32)	1240,63 (2668,62)	0.758

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Rural= <10.000 habitantes (N=128) y urbana= ≥ 10.000 habitantes (N=180).

IV.- Relación entre lugar de residencia y otras variables de la encuesta

Se halló una asociación estadísticamente significativa entre el lugar de residencia y el nivel de escolaridad. Dos terceras partes de las mujeres viviendo en una zona rural, no tenían estudios o solamente tenían estudios primarios. Además, también apareció dicha asociación entre la residencia y el tipo de trabajo desarrollado por las mujeres durante el embarazo. El 69.4% y 87% del total de mujeres que se dedican a tareas del hogar y a la agricultura, respectivamente, vivían en un área rural. No existía asociación estadística entre el hábito tabáquico o la paridad y la variable nivel de estudios, pero se observó que un mayor número de fumadoras durante el embarazo y múltiparas, residían en un área rural.

Variables	Categorías	Lugar de residencia		χ^2	P
		Urbana	Rural		
$\rho = -0.173$	Sin/primarios	54	106	9.169	0.010**
	Medios	42	53		
	Superiores	28	21		
$\rho = -0.157$	Hogar	29	65	9.753	0.008**
	Agricultura	3	12		
	Otros	89	101		
$\rho = -0.004$	Fumadora	34	50	0.005	0.945
	No fumadora	90	130		
$\rho = 0.063$	Primípara	61	77	1.219	0.270
	Múltipara	63	103		

Según el test de Mann-Whitney, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el número de hijos tenidos con anterioridad y el vivir en un área rural o urbana.

Variable	U	Lugar de residencia		P
		Medias(\pm DE)		
Número de hijos	10439.000	Rural	Urbana	0.296
		1.77(0.831)	1.75(1.08)	

Rural= <10.000 habitantes(N=128) y urbana= ≥ 10.000 habitantes (N=180).

4.5.1.5. Nivel de estudios

Dado que el nivel de estudios puede identificar dentro de la población a un grupo particular de individuos en los que confluyen situaciones comunes, se ha investigado la relación entre esta variable y la exposición a cada uno de los

pesticidas estudiados, así como la exposición a la mezcla de xenoestrógenos organohalogenados (fracción alfa) y otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas (fracción beta). Los tests aplicados fueron las tablas de contingencia, cuando ambas variables se consideraron como cualitativas (presencia/ausencia de pesticidas/estrogenicidad y nivel educacional dividido en tres grupos: sin estudios/primarios, medios y superiores) y el test de Kruskal-Wallis, cuando se tuvieron en consideración los niveles de pesticidas/carga estrogénica como variables continuas y el nivel educacional fue dividido en los tres grupos anteriormente descritos.

Para estudiar la posible relación entre el número de pesticidas por muestra y el nivel de escolaridad, se aplicó el test ANOVA de un factor.

Finalmente, se consideró las posibles asociaciones entre la variable nivel educacional y algunas variables de la encuesta tales como: trabajo durante el embarazo, hábito tabáquico, paridad (Tablas de contingencia) y número de hijos (Test de Mann-Whitney).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre nivel de estudios y pesticidas organoclorados

Según las tablas de contingencia, existía una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de endosulfán-II, y metoxicloro y el nivel educacional de las madres. Un 44.09% de las madres que tenían en su tejido placentario endosulfán-II, tenían estudios primarios o no tenían estudios y un 35.45% y un 22.55%, poseían estudios medios y superiores, respectivamente. Con respecto al metoxicloro, un 57.1% tenían estudios primarios o no tenían estudios, un 27.73% poseían estudios medios y un 15.17% habían ido a la universidad.

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			X ²	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
o,p' DDT	Sí	87	45	26	0.629	0.730
$\rho = 0.021$	No	74	47	23		
p,p' DDT	Sí	72	44	23	0.247	0.884
$\rho = -0.023$	No	89	48	26		
o,p' DDD	Sí	72	53	22	4.227	0.121
$\rho = -0.040$	No	89	39	27		
p,p' DDE	Sí	152	82	46	2.380	0.304
$\rho = 0.037$	No	9	10	3		
ΣDDTs	Sí	158	89	48	0.496	0.780
$\rho = 0.018$	No	3	3	1		

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			X ²	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
E-I	Sí	87	54	22	2.104	0.349
$\rho = 0.034$	No	74	38	26		
E-II	Sí	41	33	19	4.721	0.094⁺
$\rho = -0.120$	No	120	59	30		
E-éter	Sí	83	46	23	0.326	0.850
$\rho = 0.032$	No	78	46	26		
E-lactona	Sí	61	27	18	1.943	0.378
$\rho = 0.034$	No	100	65	31		
E-diol	Sí	89	48	17	3.978	0.137
$\rho = 0.106$	No	48	27	19		
E-sulfato	Sí	88	45	26	2.387	0.303
$\rho = 0.052$	No	73	47	23		
ΣEndos	Sí	156	87	46	1.223	0.540
$\rho = 0.062$	No	5	5	3		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			χ ²	P
		Sin/ primarios	Medios	Superiores		
Aldrín ρ= 0.028	Sí	48	22	14	1.032	0.597
	No	113	70	35		
Endrín ρ= 0.045	Sí	59	28	16	1.060	0.589
	No	102	64	33		
Dieldrín ρ= - 0.051	Sí	28	23	10	2.104	0.349
	No	133	69	39		

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			χ ²	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
HCB ρ= 0.047	Sí	70	38	18	0.712	0.700
	No	91	54	31		
Lindano ρ= 0.084	Sí	124	70	32	2.847	0.241
	No	37	22	17		
Mirex ρ= - 0.039	Sí	35	29	11	3.180	0.204
	No	126	63	38		
Metoxicloro ρ= - 0.001	Sí	53	20	19	5.362	0.068⁺
	No	108	72	30		

HCB=Hexaclorobenceno.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de p,p' DDE (ng/g placenta), metoxicloro, suma de endosulfanes (ng/g placenta) y el nivel de estudios, teniendo mayores niveles medios de p,p'DDE y metoxicloro, aquellos tejidos placentarios de madres sin estudios o estudios primarios. Para el caso de la suma de los endosulfanes, los niveles mayores de este compuesto en tejido placentario, correspondieron a madres con estudios medios. Además, se halló una tendencia a la asociación significativa entre los niveles de o,p'DDD (ng/g

lípidos) y el nivel de estudios, teniendo unos niveles medios mayores de este compuesto las madres que tenían estudios medios.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
o,p´DDT:					
ng/g placenta	1.312	0.88(1.97)	0.63(0.68)	1.00(3.78)	0.519
ng/g lípido	0.631	30.39(220.91)	17.46(47.63)	23.47(124.29)	0.729
p,p´DDT:					
ng/g placenta	0.781	0.90(1.40)	2.10(6.02)	1.94(7.31)	0.677
ng/g lípido	0.646	23.64(73.83)	48.94(143.21)	124.24(606.10)	0.724
o,p´DDD:					
ng/g placenta	4.314	1.74(3.59)	2.93(5.84)	1.89(4.70)	0.116
ng/g lípido	4.879	49.01(152.03)	91.96(247.96)	62.50(171.62)	0.087⁺
p,p´DDE:					
ng/g placenta	6.296	3.92(8.19)	3.30(4.41)	1.57(1.16)	0.031*
ng/g lípido	3.228	103.35(210.71)	119.12(192.55)	72.21(112.20)	0.199
ΣDDTs:					
ng/g placenta	4.191	6.87(9.73)	8.31(10.74)	5.71(8.74)	0.123
ng/g lípido	4.573	208.91(408.69)	282.44(413.46)	283.51(639.87)	0.102

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
E -I:					
ng/g placenta	1.764	0.79(2.71)	0.87(1.66)	0.71(1.70)	0.414
ng/g lípido	1.950	18.28(66.93)	26.99(57.83)	32.22(83.39)	0.377
E-II:					
ng/g placenta	4.465	0.70(0.45)	1.69(5.46)	0.91(1.21)	0.107
ng/g lípido	4.538	6.19(26.32)	28.23(121.96)	11.37(36,64)	0.103
E-éter:					
ng/g placenta	1.634	0.19(0.43)	0.24(0.48)	0.11(0.08)	0.442
ng/g lípido	1.180	6.13(22.57)	9.35(28.28)	4.74(13.29)	0.554
E-lactona:					
ng/g placenta	1.263	1.25(4.27)	1.14(4.54)	1.43(5.27)	0.532
ng/g lípido	0.880	49.05(250.34)	33.48(114.07)	40.30(131.33)	0.644
E-diol:					
ng/g placenta	2.162	4.29(4.86)	5.02(6.50)	3.68(4.98)	0.339
ng/g lípido	2.705	136.94(217.80)	169.97(243.21)	229.04(571.27)	0.259
E-sulfato:					
ng/g placenta	4.425	1.16(3.10)	0.65(1.36)	0.81(1.22)	0.109
ng/g lípido	1.732	33.56(107.24)	24.02(67.10)	45.45(114.12)	0.421
ΣEndos:					
ng/g placenta	6.993	7.75(8.88)	8.78(15.65)	6.59(11.71)	0.030*
ng/g lípido	4.337	258.36(431.72)	296.27(453.19)	338.88(774.68)	0.114

E=Endosulfán. Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias \pm DE			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Aldrín:					
ng/g placenta	0.931	0.49(0.67)	0.46(0.65)	0.57(1.18)	0.628
ng/g lípido	0.700	7.21(30.89)	9.61(38.49)	6.70(22.47)	0.705
Endrín:					
ng/g placenta	0.652	1.81(4.80)	1.76(2.69)	1.54(1.70)	0.722
ng/g lípido	0.817	24.24(72.49)	31.80(103.41)	30.69(75.41)	0.664
Dieldrín :					
ng/g placenta	2.769	0.45(0.89)	0.66(1.35)	0.44(0.73)	0.250
ng/g lípido	2.635	6.82(25.29)	16.50(49.98)	10.41(43.87)	0.268

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
HCB:					
ng/g placenta	0.711	0.97(2.77)	0.83(1.95)	0.81(2.01)	0.701
ng/g lípido	0.617	41.68(298.25)	23.07(61.22)	29.13(132.44)	0.735
Lindano:					
ng/g placenta	9.658	0.43(0.49)	0.57(0.86)	0.28(0.24)	0.008
ng/g lípido	7.207	9.73(21.26)	20.51(44.99)	9.19(30.55)	0.027
Mirex:					
ng/g placenta	2.468	0.49(0.59)	0.94(3.04)	0.54(1.02)	0.291
ng/g lípido	4.199	8.58(26.49)	19.54(65.03)	35.59(141.92)	0.122
Metoxicloro:					
ng/g placenta	6.142	0.87(1.84)	0.70(2.34)	0.63(1.05)	0.046*
ng/g lípido	6.030	18.74(57.32)	12.49(56.62)	28.37(141.29)	0.049*

HCB=Hexaclorobenceno. Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54.

II.- Relación entre el nivel de estudios y el número de pesticidas por muestra

Según el test ANOVA de un factor, el número de pesticidas por muestra, no estaba estadísticamente de forma significativa asociado con el nivel educacional. La diferencia entre el número medio de pesticidas por muestra de tejido adiposo era bastante similar en los 3 grupos, siendo algo mayor entre el grupo de madres sin estudios o estudios primarios.

Variable	F	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
Número de pesticidas	0.313	Sin/primarios	Medios	Superiores	0.713
		7.68(2.89)	7.64(3.00)	7.31(3.06)	

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89, estudios superiores N=54.

III.- Relación entre el nivel de estudios y la TEXB de la fracción alfa y beta

Según las tablas de contingencia, al relacionar la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y beta con el nivel de estudios, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa. Aunque se observó, que era mayor el número de mujeres con TEXB en la fracción alfa entre las que no tenían estudios o estudios primarios.

TEXB	\geq LC	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
Alfa	Sí	116	66	36	0.461	0.794
	No	45	30	13		
Beta	Sí	131	85	43	2.817	0.245
	No	30	11	6		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al utilizar el test de Kruskal-Wallis, se encontró una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción beta (ng/g lípido) y el nivel de estudios, apareciendo niveles medios mayores de TEXB en el tejido placentario de mujeres con estudios medios. Dicha asociación no era estadísticamente significativa para el caso de la fracción alfa, aunque también los niveles medios más altos de TEXB para esta fracción la presentaban los tejidos placentarios de mujeres con estudios medios.

TEXB	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Alfa:EeqpM/					
g placenta	0.384	3.65(8.45)	5.57(15.43)	3.82(7.54)	0.825
g lípido	0.921	151.83(369.93)	205.43(459.19)	224.45(459.46)	0.631
Beta:EeqpM/					
g placenta	1.890	14.66(33.72)	34.45(102.25)	18.33(33.61)	0.389
g lípido	5.369	828.79(2016.98)	1533.90(3218.98)	1183.06(2442.01)	0.068⁺

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54.

IV.- Relación entre nivel de estudios y otras variables de la encuesta

Se halló una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y el nivel de estudios de las madres. Alrededor del 72% y 87% de las mujeres dedicadas a tareas del hogar y agricultura, respectivamente, no tenían estudios o solamente tenían estudios primarios. La mayoría de las madres dedicadas a otro tipo de trabajos (no al hogar o a la agricultura) poseían estudios superiores. También existía una asociación casi estadísticamente significativa entre el tipo de estudios y la paridad. Un 59.03% de las mujeres multíparas, no tenía estudios o tenía estudios primarios, y solamente un 13.25% de las madres multíparas poseían estudios superiores. No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el nivel educacional y el hecho de fumar o no

durante el embarazo, aunque, según podemos ver en las tablas de contingencia, el número de mujeres fumadoras era mayor entre el colectivo de mujeres sin estudios o con estudios primarios (Un 60% del total de fumadoras).

Variables	Categorías	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
Trabajo $\rho = 0.311$	Hogar	68	24	3	39.653	<0.001**
	Agricultura	13	2	0		
	Otros	81	70	41		
Hábito tabáquico $\rho = 0.095$	Fumadora	51	24	10	2.808	0.246
	No fumad.	11	72	39		
Paridad $\rho = -0.313$	Primípara	64	50	27	5.815	0.055⁺
	Múltipara	98	46	22		

Según el test de Mann-Whitney, existía una asociación estadísticamente significativa entre el número de hijos y el nivel de estudios. Los valores medios del número de hijos por mujer eran mayores en las madres sin estudios o con estudios primarios (incluyendo el niño recogido en este estudio).

Variables	U	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Número de hijos	6.765	1.86(0.92)	1.63(0.77)	1.23(0.17)	0.034*

Mujeres sin estudios o estudios primarios N=165, estudios medios N=89 y estudios superiores N=54.

4.5.1.6. Actividad laboral

La exposición ocupacional de la madre a productos químicos podría influir en la exposición intrauterina del feto a los mismos. Por esta razón, se ha estudiado la relación entre el tipo de actividad desarrollada por la mujer durante el embarazo y la exposición fetal a sustancias químicas a través de la medida de dichos compuestos en el tejido placentario. Debido al interés que existe sobre la posible asociación entre la exposición ocupacional a xenobióticos y la aparición de defectos en el nacimiento, la variable actividad laboral se recodificó en tres categorías: trabajo en hogar, agricultura y otros. Los tests aplicados para ver si existía una relación estadísticamente significativa entre los distintos pesticidas o la carga estrogénica total efectiva de la fracción alfa y beta fueron, las tablas de contingencia (actividad laboral: hogar, agricultura, otros; frente a niveles de pesticidas/estrogenicidad por encima o por debajo del LC) y el test de Kruskal-Wallis (actividad laboral: hogar, agricultura, otros; frente a las variables pesticidas/TEXB consideradas como variables continuas). Además, se tuvo en cuenta en este apartado una de las preguntas que recogía la encuesta: percepción de la exposición a productos químicos durante el embarazo por parte de las madres. Los tests utilizados fueron las tablas de contingencia y el test de Mann-Whitney.

Para ver la posible asociación entre la variable número de pesticidas por muestra y trabajo, se utilizó el test ANOVA de un factor y la prueba de Levene se aplicó para estudiar la asociación entre número de pesticidas y la percepción que las madres tenían de su propia exposición a productos químicos.

Por último, también se relacionó la variable actividad laboral y exposición a productos químicos con otras variables de la encuesta tales como: paridad, hábito tabáquico (Tablas de contingencia), número de hijos, semanas de gestación (Test de Kruskal-Wallis), peso, IP, perímetro cefálico (ANOVA de un factor).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la actividad laboral y pesticidas organoclorados

Se encontró, según las tablas de contingencia, una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia (\geq LC o $<$ LC, respectivamente) de endrín y la actividad laboral. Del total de muestras de tejido placentario con este compuesto, 40.20% se dedicaban a tareas del hogar, un 2.94% a trabajar en el campo y 56.86% tenían otro tipo de trabajo. Además, un 44.57% del total de madres dedicadas a tareas del hogar, un 20% de las agricultoras y un 38.7% de las que desarrollaban otro tipo de trabajo, tenían niveles detectables de este organoclorado en su tejido placentario.

Pesticidas	\geq LC	Actividad laboral			χ^2	P
		Hogar	Agricultura	Otros		
o,p' DDT	Sí	48	9	100	0.328	0.849
$\rho = -0.001$	No	44	6	90		
p,p' DDT	Sí	45	4	90	2.751	0.253
$\rho = 0.027$	No	47	11	100		
o,p' DDD	Sí	48	7	90	0.602	0.740
$\rho = 0.043$	No	44	8	100		
p,p' DDE	Sí	83	14	178	1.051	0.591
$\rho = -0.060$	No	9	1	12		
ΣDDTs	Sí	89	14	187	1.672	0.433
$\rho = -0.056$	No	3	1	3		

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			χ^2	P
		Hogar	Agricultura	Otros		
E-I	Sí	46	10	106	1.833	0.400
$\rho = -0.051$	No	46	5	83		
E-II	Sí	29	2	60	2.575	0.276
$\rho = -0.008$	No	63	13	130		
E-éter	Sí	44	10	96	1.832	0.400
$\rho = -0.018$	No	48	5	94		
E-lactona	Sí	33	6	66	0.184	0.912
$\rho = 0.013$	No	39	9	124		
E-diol	Sí	52	9	93	3.285	0.194
$\rho = 0.101$	No	24	3	67		
E-sulfato	Sí	48	10	94	1.698	0.428
$\rho = 0.031$	No	44	5	96		
ΣEndos	Sí	90	14	182	1.138	0.566
$\rho = 0.046$	No	2	1	8		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			χ^2	P
		Hogar	Agricultura	Otros		
Aldrín	Sí	28	4	52	0.305	0.858
$\rho = 0.030$	No	64	11	138		
Endrín	Sí	41	3	58	6.853	0.033+
$\rho = 0.129$	No	51	12	132		
Dieldrín	Sí	18	5	38	1.592	0.451
$\rho = 0.001$	No	74	10	152		

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			X ²	P
		Hogar	Agricultura	Otros		
HCB	Sí	38	7	81	0.161	0.923
ρ= -0.011	No	54	8	109		
Lindano	Sí	68	13	140	1.421	0.491
ρ= 0.008	No	24	2	50		
Mirex	Sí	22	6	45	2.028	0.363
ρ= 0.009	No	70	9	145		
Metoxicloro	Sí	29	7	81	0.161	0.923
ρ= 0.009	No	63	8	109		

HCB=Hexaclorobenceno.

Las tablas de contingencia también han sido aplicadas para ver posibles asociaciones entre la percepción de la propia exposición a productos químicos que las madres tenían, y el nivel detectable o no de pesticidas en el tejido placentario. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la variable de estudio y el compuesto endrín y una tendencia a la significación para los pesticidas endosulfán-éter y sumatoria de endosulfanes. Del total de madres que afirmaron estar expuestas, un 65.71%, 100%, y 17.14%, tenían en su tejido placentario, endosulfán-éter, sumatoria de endosulfanes, y endrín (Tablas de contingencia). Además, del total de mujeres que tenían niveles medibles de endosulfán-éter en su tejido placentario, un 15.13% afirmaron exposición a productos químicos. Para el caso de la sumatoria de endosulfanes, solamente un 12.17% afirmaron estar expuestas. Y, finalmente, un 5.82% del total de madres con un valor de endrín por encima del LC, afirmaron estar expuestas a sustancias químicas.

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		X ²	P
		Sí	No		
o,p' DDT ρ= 0.035	Sí	20	138	0.369	0.543
	No	15	129		
p,p' DDT ρ= 0.039	Sí	18	121	0.465	0.495
	No	17	146		
o,p' DDD ρ= -0.001	Sí	17	130	0.000	0.990
	No	18	137		
p,p' DDE ρ= 0.062	Sí	34	246	1.430	0.232
	No	1	21		
ΣDDTs ρ= -0.013	Sí	34	261	0.048	0.827
	No	1	6		

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		X ²	P
		Sí	No		
E-I ρ= 0.084	Sí	23	140	2.132	0.144
	No	12	126		
E-II ρ= -0.062	Sí	8	85	1.170	0.279
	No	27	182		
E-éter ρ= 0.111	Sí	23	129	3.747	0.053⁺
	No	12	138		
E-lactona ρ= 0.016	Sí	13	93	0.73	0.788
	No	22	174		
E-diol ρ= 0.042	Sí	19	135	0.445	0.505
	No	9	85		
E-sulfato ρ= -0.038	Sí	16	138	0.441	0.506
	No	19	129		
ΣEndos ρ= 0.077	Sí	35	254	3.278	0.070⁺
	No	0	13		

E= Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
Aldrín	Sí	10	74	0.011	0.915
	No	25	193		
Endrín	Sí	6	97	5.069	0.024*
	No	29	170		
Dieldrín	Sí	8	53	0.174	0.677
	No	27	214		

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
HCB	Sí	18	108	1.534	0.216
	No	17	159		
Lindano	Sí	30	196	2.488	0.115
	No	5	71		
Mirex	Sí	11	64	0.922	0.337
	No	24	203		
Metoxicloro	Sí	13	79	0.834	0.361
	No	22	188		

HCB=Hexaclorobenceno.

Si en lugar de considerar el nivel de pesticidas como una variable cualitativa (presencia o ausencia), la consideramos como una variable continua, e intentamos ver posibles diferencias entre los niveles de estos organoclorados en los tejidos placentarios de madres que trabajaban en el campo, con respecto a las que trabajaban en el hogar y las que desarrollaban otro tipo de actividades, se observó una tendencia a la asociación entre la actividad laboral de las madres y los niveles de endosulfán-I (ng/g lípido) y endrín (ng/g lípido) en el tejido placentario (Test de Kruskal-Wallis), con mayores niveles medios de estos pesticidas en mujeres que trabajaban en otro tipo de actividad que no fuera

relacionada con el campo o el hogar, para el caso del endosulfán-I y en mujeres que trabajaban en casa, para el caso del endrín.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
o,p´DDT:					
ng/g placenta	0.232	0.72(0.85)	0.69(0.70)	0.87(2.59)	0.890
ng/g lípido	0.055	13.50(27.52)	9.91(21.27)	32.93(214.06)	0.973
p,p´DDT:					
ng/g placenta	2.084	1.26 (3.57)	0.49(0.53)	1.58(5.15)	0.353
ng/g lípido	2.477	28.53(92.82)	8.76(24.29)	61.25(324.14)	0.290
o,p´DDD:					
ng/g placenta	0.044	1.71(2.79)	1.16(1.35)	2.37(5.37)	0.978
ng/g lípido	0.045	40.26(77.85)	35.74(60.53)	78.95(231.03)	0.978
p,p´DDE:					
ng/g placenta	0.325	2.96(4.64)	2.10(1.59)	3.62(7.47)	0.850
ng/g lípido	0.270	84.67(136.05)	97.29(189.52)	114.97(216.54)	0.874
ΣDDTs:					
ng/g placenta	1.225	6.10(7.21)	3.95(3.14)	7.82(11.27)	0.542
ng/g lípido	1.721	171.04(216.15)	172.30(236.45)	289.08(545.10)	0.423

Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
E -I:					
ng/g placenta	4.340	0.47(0.78)	0.55(0.48)	0.98(2.79)	0.114
ng/g lípido	4.771	11.34(27.41)	22.62(29.90)	29.59(81.64)	0.092⁺
E-II:					
ng/g placenta	1.951	0.75(0.75)	0.57(0.18)	1.19(3.84)	0.377
ng/g lípido	2.085	8.89(29.25)	1.81(4.92)	17.39(88.23)	0.353
E-éter:					
ng/g placenta	1.391	0.21(0.46)	0.16(0.14)	0.18(0.39)	0.499
ng/g lípido	1.989	6.44(24.21)	6.70(10.90)	7.28(23.95)	0.370
E-lactona:					
ng/g placenta	0.364	1.03(4.17)	1.64(4.51)	1.32(4.69)	0.834
ng/g lípido	0.628	27.55(125.53)	70.34(203.18)	49.27(229.93)	0.731
E-diol:					
ng/g placenta	1.152	4.32(6.04)	3.07(3.48)	3.33(4.83)	0.562
ng/g lípido	2.262	153.67(226.00)	190.77(245.97)	161.16(336.38)	0.323
E-sulfato:					
ng/g placenta	2.625	0.69(1.31)	1.06(1.25)	1.06(2.90)	0.269
ng/g lípido	3.316	17.11(42.47)	46.06(53.25)	40.02(118.35)	0.190
ΣEndos:					
ng/g placenta	0.907	7.61(8.66)	7.05(7.40)	8.05(13.32)	0.636
ng/g lípido	0.406	225.65(310.00)	328.35(412.52)	314.09(589.09)	0.816

E=Endosulfán. Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias \pm DE			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Aldrín:					
ng/g placenta	0.156	0.53(0.77)	0.47(0.44)	0.47(0.79)	0.925
ng/g lípido	0.327	8.77(37.00)	11.22(35.77)	7.35(32.46)	0.849
Endrín:					
ng/g placenta	3.680	1.80(2.22)	1.14(1.03)	1.74(4.58)	0.159
ng/g lípido	4.737	31.45(78.75)	9.39(23.36)	27.46(89.30)	0.094⁺
Dieldrín :					
ng/g placenta	1.921	0.53(1.13)	0.48(0.47)	0.50(1.02)	0.383
ng/g lípido	1.703	8.86(31.18)	12.34(28.45)	11.18(41.58)	0.427

Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
HCB:					
ng/g placenta	0.969	0.64(1.22)	0.73(0.99)	1.04(2.90)	0.616
ng/g lípido	0.346	12.86(37.47)	33.78(78.07)	45.11(283(16)	0.841
Lindano:					
ng/g placenta	1.480	0.42(0.56)	0.39(0.23)	0.46(0.65)	0.477
ng/g lípido	1.885	10.22(28.69)	6.70(10.90)	14.33(33.52)	0.390
Mirex:					
ng/g placenta	2.391	0.51(0.70)	0.59(0.55)	0.69(2.18)	0.302
ng/g lípido	3.120	11.38(41.71)	12.68(23.91)	19.31(83.61)	0.210
Metoxicloro:					
ng/g placenta	2.287	0.57(0.93)	1.40(2.75)	0.83(2.17)	0.319
ng/g lípido	2.051	12.27(50.87)	30.89(70.66)	20.85(88.19)	0.359

HCB=Hexaclorobenceno. Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la percepción que las madres tenían de su propia exposición a productos químicos durante el embarazo y los niveles de endosulfán-éter (ng/g lípido), endrín y lindano (ng/g placenta) en tejido placentario. Los niveles medios de endosulfán-éter y lindano son mayores entre madres que tuvieron una exposición a productos químicos, mientras que para el caso del endrín, los niveles medios son mayores entre las madres que negaron haber estado expuestas.

Pesticidas	U	Percepción de la exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
o,p´DDT: ng/g plac	4145.000	1.41(3.83)	0.74(1.78)	0.247
ng/g lip	4198.500	92.55(470.35)	16.52(63.29)	0.298
p,p´DDT: ng/g plac	4456.500	0.76(0.77)	1.52(4.84)	0.627
ng/g lip	4506.000	12.53(20.88)	52.27(278.88)	0.709
o,p´DDD: ng/g plac	4597.000	1.55(2.58)	2.20(4.78)	0.867
ng/g lip	4638.000	54.62(145.37)	80.91(174.65)	0.939
p,p´DDE: ng/g plac	4283.000	2.60(4.67)	3.45(6.72)	0.422
ng/g lip	4364.500	78.68(154.55)	106.31(196.94)	0.526
ΣDDTs: ng/g plac	4423.000	5.76(7.10)	7.30(10.22)	0.607
ng/g lip	4289.000	263.49(643.20)	279.57(433.90)	0.430

Mujeres con percepción de exposición a productos químicos N=36 y no exposición n=272.

Pesticidas	U	Percepción de la exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
E-I:	ng/g plac	4080.000	0.67(1.33)	0.82(2.38)	0.212
	ng/g lip	3908.500	16.22(31.56)	24.11(70.66)	0.098
E-II:	ng/g plac	4214.500	1.98(8.14)	0.91(1.49)	0.244
	ng/g lip	4268.500	31.20(175.22)	11.46(43.41)	0.305
E-éter:	ng/g plac	3852.500	0.28(0.77)	0.18(0.33)	0.071⁺
	ng/g lip	3671.500	13.10(43.37)	6.07(19.21)	0.028*
E-lactona:	ng/g plac	4532.000	2.54(7.88)	1.07(3.85)	0.737
	ng/g lip	4438.000	123.13(480.71)	32.37(121.73)	0.571
E-diol:	ng/g plac	3052.500	4.14(4.31)	4.46(5.52)	0.937
	ng/g lip	3024.000	142.36(193.73)	162.58(313.17)	0.872
E-sulfato:	ng/g plac	4203.000	0.80(1.70)	0.97(2.52)	0.304
	ng/g lip	4166.000	15.55(29.91)	34.81(103.47)	0.269
ΣEndos:	ng/g plac	4546.000	9.75(21.82)	7.63(9.76)	0.795
	ng/g lip	4479.500	353.82(772.87)	273.69(463.21)	0.691

E=Endosulfán. Mujeres con percepción de exposición a productos químicos N=36 y no exposición n=272.

Pesticidas	U	Percepción de la exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
Aldrín:	ng/g plac	4637.000	0.41(0.32)	0.50(0.81)	0.926
	ng/g lip	4607.500	6.76(24.03)	8.00(33.16)	0.865
Endrín:	ng/g plac	3712.500	0.98(0.70)	1.85(4.09)	0.019*
	ng/g lip	3683.500	5.99(16.27)	30.42(88.07)	0.016*
Dieldrín:	ng/g plac	4531.000	0.47(0.60)	0.52(1.07)	0.678
	ng/g lip	4548.500	7.49(21.91)	10.73(39.30)	0.716

Mujeres con percepción de exposición a productos químicos N=36 y no exposición n=272.

Pesticidas	U	Percepción de exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
HCB:	ng/g plac	4023.500	1.86(5.68)	0.77(1.54)	0.135
	ng/g lip	3965.500	132.07(625.59)	21.11(81.11)	0.104
Lindano:	ng/g plac	3669.500	0.48(0.41)	0.44(0.63)	0.034*
	ng/g lip	3952.500	13.17(32.83)	11.10(25.46)	0.130
Mirex:	ng/g plac	4383.000	0.44(0.34)	0.66(1.89)	0.432
	ng/g lip	4427.000	8.82(20.68)	17.28(74.49)	0.515
Metoxicloro:	ng/g plac	4321.000	0.97(2.11)	0.76(1.88)	0.371
	ng/g lip	4289.000	16.34(35.97)	12.66(40.33)	0.329

HCB=Hexaclorobenceno. Mujeres con percepción de exposición a productos químicos N=36 y no exposición n=272.

II.- Relación entre la actividad laboral y el número de pesticidas por muestra

Aunque al aplicar el test ANOVA de un factor, entre el número de pesticidas por muestra y el tipo de trabajo no apareció una asociación estadística significativa, el número medio de pesticidas por muestra era mayor entre madres que desarrollaban actividades agrícolas durante el embarazo, seguido de las que realizan tareas del hogar.

Variables	F	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
Número de pesticidas	0.490	Hogar	Agricultura	Otros	0.613
				7.72(2.73)	

Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15, en otros trabajos N=198.

Según la prueba de Levene, la percepción de la exposición a productos químicos que las madres tuvieron durante el embarazo, sí estaba relacionado con el número de pesticidas encontrado en el tejido placentario de estas mujeres, siendo este número mayor en mujeres que sí tenían percepción de haber estado expuestas durante el embarazo a productos químicos.

Variable	F	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
Número de pesticidas	4.949	Sí	No	0.027*
		8.20(2.34)	7.53(3.01)	

Mujeres con percepción de una exposición a productos químicos N=36, no exposición n=272.

III.- Relación entre la actividad laboral y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la presencia (\geq LC) o ausencia ($<$ LC) de estrogenicidad en la fracción alfa y beta con la actividad laboral, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo y la carga estrogénica total efectiva de la fracción beta pero no en la fracción alfa. En el 100% y en el 66.66% de las madres que trabajaban en agricultura, se pudo determinar un valor de estrogenicidad en beta y alfa.

TEXB	\geq LC	Actividad laboral			χ^2	P
		Hogar	Agricultura	Otros		
Alfa	Sí	68	10	136	0.220	0.896
	No	26	5	56		
Beta	Sí	84	15	156	8.381	0.015*
	No	10	0	36		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al enfrentar la variable dicotómica presencia/ausencia de TEXB a la variable dicotómica percepción de la exposición (sí/no) a productos químicos, no se vio ninguna significación estadística entre ambas variables (Tabla de contingencia). Aún así se observó que del total de mujeres que afirmaban estar expuestas a productos químicos, un 71.4% presentaban un valor medible de TEXB en alfa y un 91.18% en beta.

TEXB	≥LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
Alfa	Sí	25	193	0.001	0.979
	No	10	78		
Beta	Sí	31	228	0.190	0.663
	No	4	43		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

No apareció asociación estadística entre el tipo de trabajo desarrollado por la mujer y los niveles de TEXB de su tejido placentario, cuando se aplicó el test de Mann-Whitney. Aún así, la TEXB de la fracción alfa, era prácticamente igual entre mujeres que trabajaban en el hogar y en la agricultura y menor para el grupo que realizaban otro tipo de trabajo, y para el caso de beta, mayor entre el colectivo de dedicación al hogar,.

TEXB	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(±DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Alfa:EeqpM/					
g placenta	0.850	4.74(14.21)	4.64(6.42)	3.91(9.33)	0.654
g lípido	0.235	162.97(354.69)	178.05(264.27)	177.36(425.79)	0.889
Beta:EeqpM/					
g placenta	1.502	30.66(103.60)	13.63(20.59)	16.81(34.06)	0.472
g lípido	1.439	1285.42(2883.53)	1545.70(4300.93)	993.33(2147.62)	0.487

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Mujeres que trabajaban en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Según el test de Mann-Whitney, no se halló ninguna asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa ni de la fracción beta y la percepción de la exposición a productos químicos. De todas formas, es destacable que el valor medio de alfa entre las que afirmaron estar expuestas era mayor.

TEXB	U	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
Alfa:EeqpM/				
g placenta	3735.000	6.11(12.63)	4.04(10.79)	0.137
g lípido	4291.000	224.61(402.58)	173.57(415.18)	0.580
Beta:EeqpM/				
g placenta	4373.50	11.33(23.74)	21.87(66.57)	0.791
g lípido	4350.00	1039.51(3005.50)	1106.32(2445.99)	0.752

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Mujeres que trabajan en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

IV.- Relación entre la actividad laboral y otras variables de la encuesta

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadística significativa entre la paridad y la actividad laboral. Un 76.7% de las madres que eran primíparas, se dedicaban a actividades laborales diferentes a la agricultura o el hogar. En cambio, del total de mujeres que trabajaban en el hogar, un 69.47% eran multíparas y de las que trabajaban en el campo, un 73.33%.

En cambio, al aplicar el test ANOVA de un factor, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el tipo de actividad laboral desarrollada durante el embarazo y variables tales como peso, índice ponderal y perímetro cefálico del recién nacido.

Variables	Categorías	Actividad laboral			χ^2	P
		Hogar	Agricultura	Otros		
Tabaco	Fuma	32	2	50	3.685	0.158
	No fuma	63	13	142		
Paridad	Primípara	29	4	105	17.645	<0.001*
	Múltipara	66	11	87		

Variables	F	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Peso (g)	1.417	3237.30(466.55)	3371.43(435.46)	3329.65(446.86)	0.244
IP (g/cm ³)	0.529	25.67(3.17)	24.19(5.92)	25.91(4.49)	0.555
P.cefálico(cm)	0.344	34.65(1.36)	34.81(1.07)	34.88(1.28)	0.710

Mujeres que trabajan en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Al aplicar el test de Kruskal-Wallis, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el número de hijos y el tipo de trabajo desarrollado por la mujer durante el embarazo, el número medio de hijos por mujer (contando el nacido durante este estudio) era mayor entre las agricultoras, seguido de las que realizaban tareas en el hogar.

Variables	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		Hogar	Agricultura	Otros	
Número de hijos	0.479	1.99(1.09)	2.20(1.04)	1.61(0.818)	<0.001**
Sem. gestación	0.728	39.42(1.65)	39.29(1.49)	39.39(1.42)	0.695

Mujeres que trabajan en el hogar N=95, en agricultura N=15 y en otros trabajos N=198.

Con respecto a la variable exposición a productos químicos durante el embarazo, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa al enfrentar dicha variable con el hábito tabáquico o la paridad (Tablas de contingencia).

Variables	Categorías	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
Tabaco $\rho=-0.022$	Fuma	9	76	0.147	0.701
	No fuma	27	195		
Paridad $\rho= -0.011$	Primípara	16	125	0.036	0.849
	Múltipara	20	146		

Según la prueba de Levene, no existía asociación estadísticamente significativa entre la percepción de la exposición y variables relacionadas con el niño. Aún así, el peso del niño era algo mayor entre recién nacidos de madres con exposición a productos químicos, en cambio, el índice ponderal y perímetro cefálico eran algo mayores entre niños de madres no expuestas.

Variables	F	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
Peso (g)	1.094	3386.18(474.27)	3295.95(448.95)	0.275
IP (g/cm ³)	-0.045	24.96(4.88)	25.79(4.18)	0.964
P.cefálico (cm)	-0.644	34.78(1.79)	34.80(1.25)	0.521

Mujeres con percepción de una exposición a productos químicos N=36, no exposición n=272.

Según el test de Mann-Whitney, las semanas de gestación estaban relacionadas estadísticamente con la variable percepción de la exposición a

productos químicos que las madres tenían, con mayor número medio de semanas de gestación en madres sin percepción de exposición.

Variables	U	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
Número de hijos	4738.00	1.78(0.87)	1.75(0.951)	0.760
Sem. gestación	2825.000	38.83(1.66)	39.45(1.46)	0.021*

4.5.1.7. Paridad

La paridad podría ser un elemento modificador de la exposición interna a sustancias químicas, por esta razón se ha hecho hincapié en el hecho de ser primípara o múltipara así como en el número de hijos y su influencia sobre la presencia/ausencia de pesticidas/TEXB de las fracciones alfa y beta. Para observar si existía asociación entre haber tenido o no hijos y la presencia de pesticidas en tejido placentario, se construyeron las tablas de contingencia entre estas dos variables. Además, para estudiar la posible influencia de los niveles de pesticidas o de TEXB de la fracción alfa y beta en tejido placentario, el ser primípara o múltipara, se utilizó el test de Mann-Whitney, y para ver si existía asociación estadística entre los niveles de pesticidas/TEXB de ambas fracciones y el número de hijos se usó el test de Spearman. El número de hijos comprendía un rango de 1-9, ya que se consideró el hijo incluido en este estudio.

La prueba de Levene se aplicó para estudiar la relación entre el número de pesticidas por muestra de tejido placentario y el hecho de ser primípara o múltipara, y para la variable número de hijos, el test aplicado fue el de Spearman.

Por último, los test aplicados para ver la posible asociación entre paridad y otras variables de la encuesta fueron la prueba de Levene, para las variables IP, peso y perímetro cefálico y las tablas de contingencia para el tipo de parto y las

semanas de gestación. Y para intentar asociar el número de hijos y las variables anteriormente citadas, se usó Spearman (para el caso del peso, IP y perímetro cefálico) y Kruskal-Wallis (para el caso del tipo de parto y semanas de gestación).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la paridad y pesticidas organoclorados

No hubo ninguna asociación estadísticamente significativa entre la variable paridad (primípara o múltipara) y la presencia/ausencia de los pesticidas, aunque se pudo observar, que un mayor número de mujeres con presencia de casi todos los pesticidas (exceptuando endosulfán-II, endosulfán-éter, HCB y mirex), eran múltiparas (Tablas de contingencia).

Pesticidas	≥LC	Paridad		χ^2	P
		Primípara	Múltipara		
o,p' DDT $\rho = 0.050$	Sí	77	81	0.753	0.386
	No	63	81		
p,p' DDT $\rho = -0.032$	Sí	62	77	0.318	0.573
	No	78	85		
o,p' DDD $\rho = -0.002$	Sí	68	79	0.001	0.973
	No	72	83		
p,p' DDE $\rho = 0.005$	Sí	130	150	0.008	0.930
	No	10	12		
ΣDDTs $\rho = 0.011$	Sí	137	158	0.035	0.851
	No	3	4		

Pesticidas	≥LC	Paridad		χ^2	P
		Primípara	Múltipara		
E-I	Sí	76	87	0.002	0.966
	No	64	74		
E-II	Sí	47	46	0.944	0.331
	No	93	116		
E-éter	Sí	76	76	1.633	0.201
	No	64	86		
E-lactona	Sí	51	55	0.202	0.653
	No	89	107		
E-diol	Sí	72	82	0.231	0.630
	No	41	53		
E-sulfato	Sí	76	78	1.123	0.287
	No	64	84		
ΣEndos	Sí	136	153	1.327	0.249
	No	4	9		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Paridad		χ^2	P
		Primípara	Múltipara		
Aldrín	Sí	40	44	0.074	0.785
	No	100	118		
Endrín	Sí	51	52	0.626	0.429
	No	89	110		
Dieldrín	Sí	27	34	0.135	0.713
	No	113	128		

Pesticidas	≥LC	Paridad		χ ²	P
		Primípara	Múltipara		
HCB	Sí	64	62	1.711	0.191
	No	76	100		
Lindano	Sí	106	120	0.107	0.743
	No	34	42		
Mirex	Sí	39	36	1.277	0.258
	No	101	126		
Metoxicloro	Sí	44	48	0.115	0.735
	No	96	114		

HCB=Hexaclorobenceno.

Al comparar los niveles de pesticidas de madres primíparas con las de múltiparas, apareció una asociación estadísticamente significativa entre la ΣDDTs (ng/g lípido) y la paridad, con valores medios mayores entre primíparas.

Pesticidas	U	Paridad		P
		Medias(±DE)		
		Primípara	Múltipara	
o,p´DDT: ng/g placenta	11245.000	0.98(3.01)	0.68(0.76)	0.894
	ng/g lípido	10942.500	38.63(247.02)	13.83(38.47)
p,p´DDT: ng/g placenta	11294.500	1.82(5.70)	1.10(3.27)	0.948
	ng/g lípido	11187.000	72.48(371.96)	26.23(91.91)
o,p´DDD: ng/g placenta	11277.000	2.30(5.11)	1.98(4.09)	0.929
	ng/g lípido	11293.000	77.58(246.46)	52.79(120.21)
p,p´DDE: ng/g placenta	10925.500	4.02(8.44)	2.77(4.13)	0.583
	ng/g lípido	10517.500	113.83(206.05)	93.84(180.09)
ΣDDTs: ng/g placenta	10144.500	8.46(11.60)	5.96(8.03)	0.114
	ng/g lípido	9783.500	303.77(576.85)	191.26(306.65)

Primíparas N=142 y múltiparas N=166.

Pesticidas		U	Paridad		P
			Medias(\pm DE)		
			Primípara	Múltipara	
E-I:	ng/g placenta	11056.500	0.98(3.10)	0.65(1.17)	0.766
	ng/g lípido	11239.000	25.21(82.02)	21.46(51.55)	0.888
E-II:	ng/g placenta	10681.000	1.27(4.26)	0.83(1.44)	0.282
	ng/g lípido	10703.000	20.06(97.42)	8.29(37.59)	0.299
E-éter:	ng/g placenta	10695.500	0.20(0.39)	0.19(0.42)	0.363
	ng/g lípido	10820.500	7.70(21.91)	7.04(24.53)	0.465
E-lactona:	ng/g placenta	11071.500	1.28(4.53)	1.21(4.51)	0.681
	ng/g lípido	11150.000	51.23(257.42)	36.67(132.45)	0.768
E-diol:	ng/g placenta	7453.000	4.03(4.55)	4.75(6.05)	0.750
	ng/g lípido	7561.500	146.06(244.40)	172.21(343.06)	0.904
E-sulfato:	ng/g placenta	10544.000	1.13(3.05)	0.80(1.75)	0.263
	ng/g lípido	10244.000	36.81(69.10)	33.25(117.58)	0.124
ΣEndos :	ng/g placenta	10834.500	8.10(13.26)	7.68(10.34)	0.504
	ng/g lípido	10864.000	284.85(497.10)	281.35(518.20)	0.529

E=Endosulfán. Primíparas N=142 y múltiparas N=166.

Pesticidas		U	Paridad		P
			Medias(\pm DE)		
			Primípara	Múltipara	
Aldrín:	ng/g placenta	11274.000	0.45(0.59)	0.53(0.89)	0.912
	ng/g lípido	11185.000	7.21(24.20)	8.41(37.85)	0.795
Endrín:	ng/g placenta	10780.000	2.00(5.19)	1.53(2.12)	0.378
	ng/g lípido	10761.500	30.36(81.91)	25.19(84.74)	0.366
Dieldrín :	ng/g placenta	11120.000	0.50(1.08)	0.53(0.99)	0.678
	ng/g lípido	11184.500	11.26(41.00)	9.56(34.68)	0.769

Primíparas N=142 y múltiparas N=166.

Pesticidas		U	Medias(\pm DE)		P
			Primípara	Múltipara	
HCB:	ng/g placenta	10410.000	1.21(3.35)	0.64(1.09)	0.169
	ng/g lípido	10460.000	55.64(327.89)	15.26(47.98)	0.193
Lindano:	ng/g placenta	10681.500	0.43(0.69)	0.46(0.53)	0.372
	ng/g lípido	11166.000	10.72(27.73)	14.83(35.32)	0.814
Mirex:	ng/g placenta	10761.000	0.67(1.96)	0.61(1.62)	0.313
	ng/g lípido	10792.000	14.03(49.76)	18.27(84.42)	0.351
Metoxicloro:	ng/gplacenta	11014.000	0.73(1.52)	0.83(2.19)	0.594
	ng/g lípido	10976.000	13.28(34.87)	22.81(99.94)	0.552

HCB=Hexaclorobenceno. Primíparas N=142 y múltiparas N=166.

En cuanto a la variable número de hijos, se encontró una asociación estadísticamente significativa positiva entre ésta y los niveles de lindano (ng/g placenta) (mayores niveles de este pesticida en madres con un mayor número de hijos). También se halló una tendencia a la significación estadística entre la sumatoria de DDTs (ng/g lípido) y el número de hijos, pero en esta ocasión la relación era negativa (a mayor número de hijos, menores niveles).

Pesticidas	Número de hijos			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
o,p´DDT	-0.001	0.988	-0.008	0.892
p,p´DDT	0.011	0.842	0.043	0.460
o,p´DDD	-0.017	0.768	0.005	0.937
p,p´DDE	-0.030	0.599	-0.057	0.319
Σ DDTs	-0.080	0.160	-0.101	0.079⁺

Pesticidas	Número de hijos			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.030	0.597	0.031	0.590
E-II	-0.039	0.498	-0.027	0.643
E-éter	-0.016	0.784	-0.007	0.906
E-lactona	-0.038	0.507	-0.025	0.667
E-diol	0.044	0.442	-0.008	0.904
E-sulfato	-0.072	0.211	-0.080	0.166
Σ Endos	-0.030	0.602	-0.024	0.677

E=Endosulfán.

Pesticidas	Número de hijos			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	0.019	0.743	0.023	0.685
Endrín	-0.025	0.665	-0.021	0.713
Dieldrín	0.027	0.643	0.032	0.578

Pesticidas	Número de hijos			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	-0.043	0.450	-0.035	0.542
Lindano	0.115	0.044*	0.081	0.159
Mirex	-0.059	0.299	-0.040	0.490
Metoxicloro	-0.036	0.529	-0.030	0.599

HCB= Hexaclorobenceno

II.- Relación entre paridad y el número de pesticidas por muestra

Según la prueba de Levene, no existía ninguna asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas por muestra y la paridad.

Variable	F	Paridad		P
		Medias(\pm DE)		
Número de pesticidas	1.698	Primípara	Múltipara	0.195
		7.85(3.08)	7.40(2.83)	

Primíparas N=142 y múltiparas N=166.

Al aplicar el test de correlación de Spearman, tampoco se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas y el número de hijos.

Variable	Número de hijos	
	ρ	P
Número de pesticidas	-0.039	0.498

III.- Relación entre paridad y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la variable paridad con la presencia o ausencia de estrogenicidad, la fracción alfa poseía casi una asociación estadísticamente significativa con la paridad de las madres. Teniendo mayor frecuencia de aparición de estrogenicidad en la fracción alfa aquellas madres que eran múltiparas (un 57.34% del total de mujeres con un valor de TEXB por encima del LC). Para el caso de la fracción beta, sí existía una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables. Al igual que la fracción alfa, un mayor

número de madres con una estrogenicidad positiva en la fracción beta eran multíparas (56.37%).

TEXB	≥LC	Paridad		χ ²	P
		Primípara	Multípara		
Alfa ρ= -0.108	Sí	93	125	3.564	0.059⁺
	No	48	40		
Beta ρ= -0.115	Sí	113	146	4.071	0.044[*]
	No	28	19		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Si usamos el test de Mann-Whitney para relacionar los niveles de estrogenicidad de las fracciones alfa y beta en el grupo de las madres primíparas y comparar estos valores con el multíparas, vemos que para la fracción alfa la asociación era significativa, y tendía a la significación estadística en beta (ng/g lípido). Los niveles medios de estrogenicidad para las madres multíparas eran mayores que para las primíparas en ambas fracciones.

TEXB	U	Paridad		P
		Medias±DE		
		Primípara	Multípara	
Alfa:Eeq pM/g plac.	8807.000	2,54 (6,98)	5,76 (13,37)	0.007^{**}
Eeq pM /g lípido	9114.000	124.14(281.88)	226,44 (494,13)	0.019[*]
Beta:Eeq pM/g plac.	9399.000	17,19 (36,07)	23,63 (79,65)	0.090⁺
Eeq pM /g lípido	9707.000	1012,73 (2496,78)	1085,57 (2536,75)	0.205

TEXB=Carga estrogénica total efectiva; Primíparas N=142 y multíparas N=166.

Al aplicar el test de correlación de Spearman, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la TEXTB de la fracción alfa y el número de hijos, siendo esta mayor a mayor número de hijos.

TEXTB	Número de hijos			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	P	ρ	P
Alfa	0.138	0.018*	0.118	0.043*
Beta	0.072	0.222	0.051	0.387

TEXTB= Carga estrogénica total efectiva.

IV.- Relación entre paridad y otras variables de la encuesta

Según la prueba de Levene, no existía ninguna asociación estadísticamente significativa entre la paridad y el peso, perímetro cefálico o IP. Aún así, se observó que los niños de madres multíparas tenían un peso e IP medio mayor. El valor medio del perímetro cefálico era algo superior entre las madres primíparas.

Variables	F	Paridad		P
		Medias(\pm DE)		
		Primípara	Multípara	
Peso (g)	0.221	3270.71(433.46)	3336.77(466.46)	0.270
IP (g/cm³)	0.004	24.81(3.88)	26.44(4.40)	0.947
P. cefálico (cm)	0.836	34.91(1.37)	34.71(1.22)	0.363

Primíparas N=142 y multíparas N=166.

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de parto y la paridad. De 208 mujeres que tuvieron un

parto espontáneo, 60.6% eran multíparas. Con respecto a las semanas de gestación, no se encontró una correlación entre esta variable y el tipo de parto. Correlación tampoco encontrada al aplicar el test Mann-Whitney entre el tipo de parto y las semanas de gestación como variable continua ($p=0.823$).

Variables	Categorías	Paridad		χ^2	P
		Primípara	Múltipara		
$\rho = -0.241$	Esponáneo	82	126	18.568	<0.001**
	Cesárea	15	19		
	Instrumental	33	11		
$\rho = 0.020$	32-37 sem.	7	6	0.346	0.841
	>37-39 sem.	51	61		
	>39 sem.	71	85		

La variable número de hijos, estaba asociada de forma estadísticamente significativa con el peso del niño, con mayores pesos cuanto mayor era el número de embarazos. El índice ponderal tendía a la significación estadística, con mayor IP cuanto mayor era el número de hijos nacidos (Test de correlación de Spearman).

Variables	Número de hijos	
	ρ	P
Peso niño (g)	0.128	0.029*
IP niño (g/cm^3)	0.160	0.076⁺
P. cefálico (cm)	-0.125	0.197

Por último, según el test de Kruskal-Wallis, el número de embarazos previos estaba relacionado de forma estadísticamente significativa con el tipo de

parto, siendo mayor el número medio de hijos entre las madres que tuvieron partos espontáneos.

Variables	χ^2	Medias(\pm DE)			P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental	
Número de hijos	19.003	1.88(2.02)	1.59(1.56)	1.32(1.64)	<0.001**
	0.265	32-37 sem. 1.62(0.77)	>37-39 sem. 1.73(0.85)	>39 sem. 1.79(1.03)	0.876

Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45. Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112 y >39 semanas N=156.

4.5.1.8. Hábito tabáquico durante el embarazo

El consumo de tabaco durante el embarazo, podría influir en los niveles de exposición transplacentaria a xenobióticos. Por esta razón, se utilizaron las tablas de contingencia, para ver si existía una relación entre fumar o no fumar y la presencia/ausencia de pesticidas/TEXB de ambas fracciones y el test de Mann-Whitney para estudiar posibles asociaciones entre fumar/no fumar y los niveles de pesticidas organoclorados o los niveles de TEXB en las muestras de tejido placentario.

A la hora de relacionar si el número de pesticidas por muestra estaba asociado significativamente con fumar o no fumar durante el embarazo, se utilizó la prueba de Levene.

Por último, se analizó la influencia del hábito tabáquico durante el embarazo en el peso, índice ponderal y perímetro cefálico del niño (Prueba de Levene), en las semanas de gestación (Test de Mann-Whitney) y en el tipo de parto (Tablas de contingencia).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre hábito tabáquico y pesticidas organoclorados

Al construir las tablas de contingencia, se ha hallado una asociación estadísticamente significativa entre fumar o no fumar y la presencia o ausencia de endosulfán-sulfato. Del total de mujeres fumadoras, un 60.71% presentaban un valor por encima del límite de cuantificación de este compuesto. Además, aparece una tendencia a la significación estadística entre la variable de estudio y la presencia/ausencia de p,p'DDE, sumatoria de DDTs y sumatoria de endosulfanes. Un 96.42%, 100% y 98.88% de las mujeres que fumaron durante el embarazo, presentaron p,p'DDE, Σ DDTs y endosulfanes en su tejido placentario.

Pesticidas	\geq LC	Hábito tabáquico		χ^2	P
		Fuma	No fuma		
o,p' DDT $\rho = -0.044$	Sí	41	117	0.574	0.449
	No	43	101		
p,p' DDT $\rho = 0.020$	Sí	40	99	0.119	0.730
	No	44	119		
o,p' DDD $\rho = 0.031$	Sí	43	104	0.295	0.587
	No	41	114		
p,p' DDE $\rho = 0.089$	Sí	81	199	2.709	0.100⁺
	No	3	19		
ΣDDTs $\rho = 0.096$	Sí	84	211	2.761	0.097⁺
	No	0	7		

Pesticidas	≥LC	Hábito tabáquico		χ^2	P
		Fuma	No fuma		
E-I	Sí	47	116	0.152	0.697
$\rho = 0.022$	No	37	101		
E-II	Sí	28	65	0.352	0.553
$\rho = 0.034$	No	56	153		
E-éter	Sí	44	108	0.196	0.658
$\rho = 0.025$	No	40	110		
E-lactona	Sí	32	74	0.458	0.498
$\rho = 0.039$	No	52	144		
E-diol	Sí	46	108	0.306	0.580
$\rho = 0.035$	No	25	69		
E-sulfato	Sí	51	103	4.400	0.036*
$\rho = 0.121$	No	33	115		
ΣEndos	Sí	83	206	3.448	0.063⁺
$\rho = 0.095$	No	1	12		

E= Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Hábito tabáquico		χ^2	P
		Fuma	No fuma		
Aldrín	Sí	22	62	0.153	0.696
$\rho = -0.022$	No	62	156		
Endrín	Sí	32	71	0.824	0.364
$\rho = 0.052$	No	52	147		
Dieldrín	Sí	16	45	0.096	0.757
$\rho = -0.018$	No	68	173		

Pesticidas	≥LC	Hábito tabáquico		X ²	P
		Fuma	No fuma		
HCB ρ= -0.046	Sí	32	94	0.629	0.428
	No	52	124		
Lindano ρ= -0.032	Sí	61	165	0.303	0.582
	No	23	53		
Mirex ρ= 0.002	Sí	21	54	0.002	0.967
	No	63	164		
Metoxicloro ρ= 0.007	Sí	26	66	0.013	0.909
	No	58	152		

HCB=Hexaclorobenceno.

Los niveles de metoxicloro y lindano (ng/g lípido), estaban asociados con el hábito tabáquico y el endosulfán-éter, tendía a la significación estadística (Test Mann-Whitney), con niveles mayores entre las fumadoras, en todos ellos.

Pesticidas	U	Hábito tabáquico		P
		Medias(±DE)		
		Fuma	No fuma	
o,p´DDT: ng/g placenta	10179.000	0.90(2.46)	0.60(0.59)	0.134
	ng/g lípido	10299.000	31.01(200.21)	10.60(22.74)
p,p´DDT: ng/g placenta	10731.000	1.49(4.85)	1.30(3.74)	0.462
	ng/g lípido	10880.000	54.99(305.40)	28.64(75.36)
o,p´DDD: ng/g placenta	10709.000	2.11(4.55)	2.18(4.67)	0.449
	ng/g lípido	10857.000	62.43(167.11)	69.09(239.30)
p,p´DDE: ng/g placenta	10049.500	3.34(6.16)	3.37(7.40)	0.114
	ng/g lípido	10156.500	103.76(180.66)	105.41(221.43)
ΣDDTs: ng/g placenta	10608.500	7.21(10.15)	6.87(9.30)	0.403
	ng/g lípido	10489.000	254.01(492.45)	215.74(340.65)

Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

Pesticidas	U	Hábito tabáquico		P	
		Medias(±DE)			
		Fuma	No fuma		
E-I:	ng/g placenta	10863.000	0.84(2.43)	0.71(1.85)	0.683
	ng/g lípido	11074.000	23.42(56.47)	23.39(89.99)	0.818
E-II:	ng/g placenta	10824.000	1.10(3.59)	0.88(0.92)	0.497
	ng/g lípido	10784.000	15.16(82.24)	10.07(32.54)	0.456
E-éter:	ng/g placenta	9858.500	0.21(0.46)	0.15(0.16)	0.050*
	ng/g lípido	9894.500	7.94(27.05)	4.14(6.97)	0.057⁺
E-lactona:	ng/g placenta	10484.500	1.36(4.98)	0.94(2.94)	0.246
	ng/g lípido	10567.500	51.15(232.53)	21.45(56.71)	0.296
E-diol:	ng/g placenta	6910.500	4.46(5.09)	4.32(6.29)	0.245
	ng/g lípido	6818.000	174.11(331.22)	125.87(209.62)	0.183
E-sulfato:	ng/g placenta	10231.500	0.97(2.74)	0.88(1.40)	0.155
	ng/g lípido	10402.000	34.06(109.13)	28.73(60.48)	0.239
ΣEndos :	ng/g placenta	11055.000	8.13(12.89)	7.22(8.20)	0.808
	ng/g lípido	11056.500	307.45(569.83)	219.44(283.12)	0.809

E=Endosulfán. Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

Pesticidas	U	Hábito tabáquico		P	
		Medias(±DE)			
		Fuma	No fuma		
Aldrín:	ng/g placenta	10986.500	0.50(0.84)	0.47(0.54)	0.671
	ng/g lípido	11001.000	9.02(36.98)	4.83(13.17)	0.689
Endrín:	ng/g placenta	10975.000	1.93(4.50)	1.28(0.90)	0.677
	ng/g lípido	11069.000	32.60(95.49)	14.58(33.34)	0.790
Dieldrín :	ng/g placenta	10466.000	0.52(1.02)	0.50(1.07)	0.144
	ng/g lípido	10456.000	11.04(41.31)	8.55(26.17)	0.139

Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

Pesticidas	U	Hábito tabáquico		P	
		Medias(\pm DE)			
		Fuma	No fuma		
HCB:	ng/g placenta	10860.000	0.97(2.68)	0.74(1.61)	0.574
	ng/g lípido	10856.000	39.80(262.31)	18.86(76.01)	0.570
Lindano:	ng/g placenta	9891.500	0.47(0.68)	0.38(0.36)	0.066⁺
	ng/g lípido	9785.500	14.49(36.07)	8.89(17.28)	0.049*
Mirex:	ng/g placenta	11111.000	0.58(1.45)	0.77(2.46)	0.823
	ng/g lípido	11141.500	17.55(78.86)	18.05(41.34)	0.868
Metoxicloro:	ng/gplacenta	10002.000	0.83(2.15)	0.63(1.04)	0.042*
	ng/g lípido	9968.000	19.80(86.29)	14.76(44.81)	0.037*

Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

II.- Relación entre hábito tabáquico y el número de pesticidas por muestra

Al aplicar la prueba de Levene no apareció asociación estadística entre fumar o no durante el embarazo y el número de pesticidas por muestra de tejido placentario.

Variable	F	Hábito tabáquico		P
		Medias(\pm DE)		
		Fuma	No fuma	
Número de pesticidas	0.608	7.81(3.08)	7.53(2.90)	0.436

Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

III.- Relación entre hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la variable dicotómica, hábito tabáquico (fuma/no fuma) con la variable también dicotómica, presencia/ausencia de TEXB de la fracción alfa y beta, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Pero se observó que, del total de mujeres fumadoras, 72.62% y 86.90% tenían un valor

de TEXTB de la fracción alfa y beta, respectivamente, por encima del LC en su tejido placentario.

TEXTB	≥LC	Hábito tabáquico		χ^2	P
		Fumadora	No fumadora		
Alfa $\rho = 0.003$	Sí	61	159	0.002	0.965
	No	24	64		
Beta $\rho = 0.018$	Sí	73	188	0.103	0.749
	No	12	35		

TEXTB=Carga estrogénica total efectiva.

Según el test de Mann-Whitney, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y la TEXTB de ambas fracciones. Aún así, los niveles de TEXTB de la fracción alfa y beta, eran mayores en mujeres fumadoras que en no fumadoras.

TEXTB	U	Hábito tabáquico		P
		Medias(±DE)		
		Fumadora	No fumadora	
Alfa:Eeq pM/g plac.	8173.000	4.31(11.63)	4.19(9.25)	0.480
Eeq pM /g lípido	8504.000	168.82(403.59)	134.55(354.76)	0.724
Beta:Eeq pM/g plac.	8190.500	20.01(68.78)	22.13(45.53)	0.517
Eeq pM /g lípido	8310.000	957.13(2184.25)	1459.89(3194.97)	0.643

TEXTB=Carga estrogénica total efectiva. Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

IV.- Relación entre hábito tabáquico y otras variables de la encuesta

Según la prueba de Levene, el hábito de fumar durante el embarazo estaba relacionado con el peso del niño, con pesos al nacer menores para niños

de madres fumadoras. No se hallaron asociaciones estadísticas entre hábito tabáquico e IP o perímetro cefálico y los valores medios eran prácticamente idénticos para ambos grupos.

Variables	F	Hábito tabáquico		P
		Medias(\pm DE)		
		Fumadora	No fumadora	
Peso del niño (g)	4.003	3156.93(387.47)	3364.84(462.76)	0.046*
Índice ponderal (g/cm³)	1.676	25.71(2.68)	25.72(4.70)	0.198
P. cefálico (cm)	0.411	34.52(1.38)	34.90(1.24)	0.523

Fumadoras N=85, no fumadoras N=223.

Según el test de Mann-Whitney, las semanas de gestación no estaban relacionadas de forma estadísticamente significativa con el hábito de fumar de la madre durante el embarazo, siendo su valor medio parecido en ambos grupos de estudio.

Variables	U	Hábito tabáquico		P
		Medias(\pm DE)		
		Fumadora	No fumadora	
Semanas gestación	7130.000	39.43(1.75)	39.37(1.39)	0.262

Fumadoras N=85 y no fumadoras N=223.

Al construir las tablas de contingencia, no aparecieron relaciones estadísticamente significativas entre el haber fumado o no durante el embarazo y el tipo de parto.

Variables	Categorías	Tipo de parto			χ^2	P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
Tabaco	Fuma	60	8	10	0.958	0.619
$p= 0.056$	No fuma	148	26	34		

4.5.1.9. Hábitos alimentarios

La principal fuente de exposición para el feto a estos compuestos es a través de la dieta y la metabolización y movilización durante el embarazo de los reservorios de grasa acumulados en la madre a lo largo de su vida. Debido a la exposición alimentaria a la que se ve expuesta la mujer embarazada y la población en general, se han creado leyes que regulan y controlan los niveles máximos de pesticidas admisibles en los distintos tipos de alimentos. Según el Real Decreto 569/1990, de 27 de Abril, se fijaron los niveles máximos de plaguicidas en alimentos de origen animal, poniendo límites al contenido de Aldrín, dieldrín, DDT e isómeros/metabolitos, HCB y lindano (entre otros contaminantes), en la grasa contenida en las carnes, preparados de carnes, despojos y materias grasas, así como para la leche de vaca fresca o entera. Y según Real decreto de 280/1994, de 18 de febrero, se establecieron los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal. Entre los compuestos que se limitaba su cantidad en los vegetales se encontraban los endosulfanes.

En este trabajo, se ha intentado ver si existía alguna relación entre los niveles en tejido placentario de los distintos pesticidas y de TEXB de la fracción alfa y beta, en función del tipo de alimentación que tuvo la madre durante el embarazo, a través de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos.

Se seleccionaron aquellos pesticidas para los que existen niveles máximos según la ley, debido a la gran cantidad de pesticidas organoclorados estudiados y debido a la extensión de la encuesta de frecuencia de consumo de alimentos, tal era el caso de drinas, DDTs e isómeros/metabolitos, HCB y lindano para los alimentos de origen animal y endosulfanes para los alimentos de origen vegetal.

También se relacionó la TEXB de la fracción alfa y beta con la frecuencia de consumo de alimentos por las madres durante el embarazo. El test aplicado fue las tablas de contingencia.

Además, se aplicó el test ANOVA de un factor, para estudiar posibles asociaciones entre el número de pesticidas por muestra y la frecuencia de consumo de alimentos.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (*).

I.- Relación entre hábitos alimentarios y pesticidas organoclorados

Con respecto a los productos de origen vegetal, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo durante el embarazo, de ensalada, y los niveles de sumatoria de endosulfanes y el consumo de vegetales verdes frescos y los niveles medios de endosulfán-I (ng/g lípido) y endosulfán II (ng/g lípido). Para el caso de la sumatoria de endosulfanes, se hallaron niveles medios mayores en el tejido placentario de madres que nunca tomaban ensalada, seguido de las que comían de 1-3 veces por mes. Para el caso de endosulfán-I y II, los niveles medios mayores de estos pesticidas se detectaron en madres que consumían este producto con una frecuencia de 1-3 veces al mes, seguido de las que nunca consumían. Además, existía una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de ensalada, endosulfán-éter (ng/g lípido) y endosulfán-sulfato, vegetales verdes frescos y sumatoria de endosulfanes (ng/g lípido), vegetales congelados, endosulfán II (ng/g lípido) y sumatoria de endosulfanes (ng/g lípido), y por último, fruta fresca, endosulfán I (ng/g lípido) y sumatoria de endosulfanes (ng/g lípido). Con niveles medios mayores para madres que consumían ensalada 1-3 veces al mes, para el caso del endosulfán éter y >3 veces por semana para el endosulfán sulfato; los niveles medios de la sumatoria de endosulfanes eran mayores en madres que consumían vegetales verdes frescos de 1-3 veces al mes; para el caso de vegetales congelados, los niveles de endosulfán II y sumatoria de endosulfanes eran mayores en madres que no consumían este tipo de productos; por último, las mujeres con mayores niveles medios en el tejido

placentario de endosulfán I y sumatoria de endosulfanes eran aquellas que consumían muy poca fruta (1-3 veces al mes).

Pesticidas	χ^2	Leguminosas			P	
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces A la semana	>3 veces a la semana	
E -I:						
ng/gplacenta	1.549	1.08	0.23(0.09)	1.22(3.58)	0.61(0.81)	0.671
ng/g lípido	1.261	15.82	6.84(6.09)	31.53(95.03)	21.87(47.14)	0.738
E-II:						
ng/gplacenta	0.742	0.50	0.67(0.29)	1.37(4.82)	0.82(1.22)	0.863
ng/g lípido	0.561	0.5	0.66 (0.29)	22.04(108.40)	9.46(39.34)	0.905
E-éter:						
ng/gplacenta	3.834	0.50	0.66(0.28)	1.37(4.82)	0.20(0.46)	0.280
ng/g lípido	5.368	0.05	5.18(9.77)	9.69(17.54)	8.36(28.44)	0.147
E-lactona:						
ng/gplacenta	3.255	0.50	0.24(0.32)	0.86(3.94)	1.60(5.07)	0.354
ng/g lípido	4.563	0.05	8.76(15.09)	24.32(98.13)	60.65(259.37)	0.207
E-diol:						
ng/gplacenta	3.447	3.65	1.44(2.29)	3.10((4.47)	4.32(5.91)	0.328
ng/g lípido	4.551	53.26	88.43(124.70)	141.98(243.67)	204.55(360.42)	0.208
E-sulfato:						
ng/gplacenta	3.140	0.13	0.13(0.04)	1.00(3.18)	0.79(1.84)	0.371
ng/g lípido	4.840	0.13	0.20(0.23)	22.93(58.31)	15.30(49.88)	0.184
ΣEndos:						
ng/gplacenta	4.315	5.20	2.70(2.42)	7.64(14.74)	8.54(10.20)	0.229
ng/g lípido	5.408	75.84	111.31(108.88)	244.53(442.11)	342.97(585.48)	0.144

Nunca N=1, 1-3 veces al mes N=3, 1-3 veces a la semana N=124 y más de 3 veces a la semana N=180.

Pesticidas	χ^2	Ensalada			P	
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
E -I:						
ng/gplacenta	3.744	2.05(1.89)	1.55(2.54)	0.60(0.84)	0.83(2.44)	0.291
ng/g lípido	2.823	36.18(33.88)	41.35(66.64)	11.03(17.89)	25.94(72.87)	0.420
E-II:						
ng/gplacenta	0.413	2.57(4.13)	0.75(0.29)	0.65(0.30)	1.04(3.31)	0.938
ng/g lípido	0.416	27.98(54.96)	0.75(0.29)	1.91(4.98)	15.17(78.44)	0.937
E-éter:						
ng/gplacenta	5.426	0.14(0.12)	1.31(2.24)	0.18(0.16)	0.17(0.33)	0.143
ng/g lípido	6.779	2.02(2.28)	68.38(125.70)	4.76(4.75)	6.45(19.81)	0.079⁺
E-lactona:						
ng/gplacenta	1.877	6.48(12.86)	12.82(16.17)	0.57(0.99)	1.06(3.94)	0.598
ng/g lípido	1.733	81.21(162.32)	445.06(563.24)	10.53(19.45)	39.945(199.82)	0.630
E-diol:						
ng/gplacenta	5.808	10.83(7.87)	4.39(3.57)	2.54(3.43)	3.74(5.37)	0.121
ng/g lípido	3.533	220.53(244.91)	178.37(44.36)	79.28(80.66)	151.25(328.06)	0.316
E-sulfato:						
ng/gplacenta	6.653	0.13(0.24)	0.48(0.72)	0.59(1.14)	0.90(2.55)	0.084⁺
ng/g lípido	6.524	1.24(0.50)	13.69(27.13)	18.65(47.62)	31.20(101.95)	0.089⁺
ΣEndos:						
ng/gplacenta	9.714	23.89(25.28)	23.48(16.20)	5.01(6.11)	7.79(11.85)	0.021*
ng/g lípido	8.120	407.18(380.38)	218.48(549.04)	130.37(116.60)	298.44(540.51)	0.044*

Nunca N=4, 1-3 veces al mes N=4, 1-3 veces a la semana N=19 y más de 3 veces a la semana N=281.

Pesticidas	χ^2	Vegetales verdes frescos			P	
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
E -I:						
ng/gplacenta	5.584	0.85(1.32)	2.38(3.78)	0.75(2.09)	0.73(2.31)	0.134
ng/g lípido	8.289	19.52(36.86)	78.84(117.69)	24.54(97.44)	21.11(49.65)	0.040*
E-II:						
ng/gplacenta	5.109	1.18(2.11)	4.23(11.72)	0.75(0.92)	0.19(0.45)	0.164
ng/g lípido	7.988	8.97(28.35)	83.13(261.31)	6.39(25.71)	11.21(42.30)	0.046*
E-éter:						
ng/gplacenta	2.895	0.18(0.16)	0.24(0.32)	0.18(0.37)	0.19(0.45)	0.408
ng/g lípido	3.642	3.74(5.37)	7.76(9.49)	5.42(14.04)	8.11(28.91)	0.303
E-lactona:						
ng/gplacenta	1.222	2.34(6.57)	4.32(11.96)	0.74(2.08)	1.08(3.63)	0.748
ng/g lípido	1.348	28.77(83.14)	125.13(340.03)	20.53(59.99)	47.58(231.32)	0.718
E-diol:						
ng/gplacenta	4.888	5.56(5.41)	4.06(6.13)	2.77(4.27)	3.98(5.59)	0.180
ng/g lípido	1.818	181.06(316.12)	128.47(153.31)	112.48(166.65)	204.13(364.86)	0.611
E-sulfato:						
ng/gplacenta	2.762	0.50(1.01)	1.06(1.52)	0.69(1.24)	0.94(2.91)	0.430
ng/g lípido	5.086	9.87(19.66)	53.45(86.40)	16.99(41.96)	34.05(116.48)	0.166
ΣEndos:						
ng/gplacenta	3.539	11.08(15.20)	17.02(31.43)	5.68(6.48)	7.82(9.54)	0.316
ng/g lípido	6.301	266.97(391.18)	512.84(707.56)	180.97(242.59)	324.29(587.20)	0.098*

Nunca N=17, 1-3 veces al mes N=19, 1-3 veces a la semana N=73 y más de 3 veces a la semana N=199.

Pesticidas	χ^2	Vegetales congelados				P
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
E -I:						
ng/gplacenta	3.792	0.92(1.75)	0.85(1.76)	0.57(1.76)	1.44(5.38)	0.285
ng/g lípido	5.325	31.72(62.46)	26.77(62.24)	19.29(97.26)	24.04(56.55)	0.149
E-II:						
ng/gplacenta	4.365	1.64(5.91)	1.02(1.72)	0.66(0.43)	0.69(0.36)	0.225
ng/g lípido	6.285	29.77(133.96)	13.93(49.84)	3.46(19.70)	10.64(31.65)	0.099⁺
E-éter:						
ng/gplacenta	0.324	0.20(0.29)	0.14(0.14)	0.18(0.35)	0.39(0.99)	0.955
ng/g lípido	1.108	8.52(22.09)	3.98(8.15)	5.63(13.38)	18.08(59.13)	0.775
E-lactona:						
ng/gplacenta	2.617	1.88(6.59)	0.99(3.20)	0.84(3.11)	1.93(5.75)	0.455
ng/g lípido	2.415	54.80(183.30)	23.46(61.79)	54.30(308.48)	57.37(180.18)	0.491
E-diol:						
ng/gplacenta	2.225	4.41(5.62)	3.48(5.00)	3.65(5.97)	3.49(3.58)	0.527
ng/g lípido	3.775	212.83(296.87)	146.60(246.50)	185.16(412.97)	156.82(251.94)	0.287
E-sulfato:						
ng/gplacenta	0.586	0.77(1.29)	0.84(2.20)	0.57(0.93)	2.00(5.87)	0.900
ng/g lípido	0.575	31.38(88.89)	35.57(138.50)	19.63(54.60)	37.45(68.05)	0.902
ΣEndos:						
ng/gplacenta	4.281	10.15(17.18)	7.32(9.26)	6.42(8.38)	10.03(13.67)	0.233
ng/g lípido	7.503	372.70(569.73)	251.95(349.01)	277.63(664.12)	316.25(418.60)	0.057⁺

Nunca N=81, 1-3 veces al mes N=99, 1-3 veces a la semana N=95 y más de 3 veces a la semana N=33.

Pesticidas	χ^2	Fruta			P	
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
E -I:						
ng/gplacenta	5.438	0.30(0.30)	2.61(5.08)	0.25(0.24)	0.82(2.27)	0.142
ng/g lípido	7.065	2.80(4.64)	100.87(236.24)	2.44(4.61)	24.24(56.59)	0.070⁺
E-II:						
ng/gplacenta	4.494	0.50(0.21)	1.08(0.99)	0.70(0.36)	1.06(3.37)	0.213
ng/g lípido	4.482	1.23(2.01)	18.57(56.25)	1.54(3.77)	15.26(78.91)	0.214
E-éter:						
ng/gplacenta	0.152	0.08(0.03)	0.59(1.45)	0.18(0.25)	0.18(0.33)	0.985
ng/g lípido	0.176	1.55(2.55)	27.83(80.62)	4.22(8.01)	6.62(19.94)	0.981
E-lactona:						
ng/gplacenta	2.861	5.96(10.19)	2.51(5.39)	2.39(8.11)	1.09(4.14)	0.414
ng/g lípido	2.332	265.79(460.22)	85.26(189.28)	75.37(283.05)	38.23(197.01)	0.506
E-diol:						
ng/gplacenta	2.796	1.35(2.13)	3.74(4.07)	2.33(2.96)	3.91(5.53)	0.424
ng/g lípido	0.392	85.89(121.12)	175.09(246.25)	87.56(69.74)	181.76(327.33)	0.942
E-sulfato:						
ng/gplacenta	1.341	0.91(1.36)	0.64(0.71)	0.29(0.45)	0.91(2.58)	0.719
ng/g lípido	1.831	37.25(64.31)	22.96(34.86)	5.07(16.80)	31.67(103.36)	0.608
ΣEndos:						
ng/gplacenta	5.689	9.29(15.33)	11.69(9.10)	6.19(10.74)	8.04(12.33)	0.128
ng/g lípido	7.558	408.56(698.17)	451.74(42.19)	165.00(363.45)	299.39(538.86)	0.056⁺

Nunca N=3, 1-3 veces al mes N=11, 1-3 veces a la semana N=19 y más de 3 veces a la semana N=275.

En cuanto a los productos lácteos, no se halló ninguna asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de yogurt y los niveles de los pesticidas, pero sí para el caso de frecuencia de consumo de queso fresco y queso añejo. Existía una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de queso fresco y los niveles de p,p'DDE (ng/g placenta), y sumatoria de DDTs (ng/g placenta) con mayores niveles medios de estos pesticidas, entre las mujeres que consumían con poca frecuencia este producto (1-3 veces al mes) seguido de las que nunca consumían este producto. Además, apareció una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de queso fresco y HCB (ng/g lípido), y entre el queso añejo y el aldrín (ng/g lípido), con mayores niveles medios en tejido placentario, en ambos casos, en madres que consumían más de 3 veces por semana este producto.

Con respecto a los productos cárnicos, la frecuencia de consumo de carne de aves no estaba asociada estadísticamente con ninguno de los pesticidas estudiados. En cambio, el consumo de otro tipo de carnes (cerdo y ternera) tendía a una asociación estadística con los niveles de aldrín (ng/g placenta), con niveles mayores en madres que nunca consumían este tipo de carne.

Por último, la frecuencia de consumo de pescado blanco tendía a una asociación estadísticamente significativa con el pesticida p,p'DDE, con niveles mayores entre los que consumieron este tipo de alimento con muy poca asiduidad (1-3 veces al mes). La frecuencia de consumo de pescado azul no se relacionó con ninguno de los pesticidas estudiados.

Pesticidas	χ^2	Yogurt				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
o,p´DDT:						
ng/gplacenta	2.413	1.72(5.77)	0.67(0.84)	0.99(1.31)	0.75(1.76)	0.491
ng/g lípido	2.041	50.33(189.41)	10.71(18.49)	20.59(46.85)	29.37(211.14)	0.564
p,p´DDT:						
ng/gplacenta	2.143	0.90(1.16)	1.35(2.30)	1.04(1.47)	1.40(4.90)	0.543
ng/g lípido	1.522	17.44(32.71)	50.94(156.42)	75.70(154.21)	52.69(145.98)	0.677
o,p´DDD:						
ng/gplacenta	4.587	4.58(9.68)	1.66(2.77)	3.05(6.00)	1.66(2.86)	0.205
ng/g lípido	4.359	189.30(479.10)	53.80(145.37)	75.70(154.21)	52.69(145.98)	0.225
p,p´DDE:						
ng/gplacenta	3.922	1.96(1.62)	4.71(6.59)	2.39(2.32)	2.66(5.17)	0.270
ng/g lípido	3.884	70.57(89.15)	125.54(177.29)	84.57(146.15)	85.59(151.34)	0.274
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	5.575	8.56(10.04)	7.84(7.59)	6.93(7.67)	5.88(8.66)	0.134
ng/g lípido	2.207	326.87(499.44)	240.41(303.88)	217.15(287.61)	230.56(507.83)	0.531

Nunca N=21, 1-3 veces al mes N=24, 1-3 veces a la semana N=53 y más de 3 veces a la semana N=210.

Pesticidas	χ^2	Yogurt				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces Al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Aldrín:						
ng/gplacenta	1.463	0.58(0.78)	0.33(0.20)	0.52(0.75)	0.52(0.86)	0.691
ng/g lípido	1.198	11.51(29.54)	2.00(8.14)	5.14(17.27)	10.04(39.35)	0.754
Dieldrín:						
ng/gplacenta	3.040	0.49(0.46)	0.38(0.61)	0.49(0.79)	0.50(1.03)	0.326
ng/g lípido	2.623	19.07(42.41)	3.25(14.30)	6.48(17.70)	11.60(43.76)	0.454

Nunca N=21, 1-3 veces al mes N=24, 1-3 veces a la semana N=53 y más de 3 veces a la semana N=210.

Pesticidas	χ^2	Yogurt				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
HCB:						
ng/gplacenta	2.857	0.54(0.85)	1.04(3.36)	0.58(0.98)	1.00(2.75)	0.414
ng/g lípido	2.371	14.10(53.62)	20.49(74.35)	13.18(42.35)	44.86(290.42)	0.499
Lindano:						
ng/gplacenta	2.824	0.30(0.17)	0.51(0.76)	0.55(0.63)	0.43(0.59)	0.420
ng/g lípido	1.681	7.92(14.29)	29.95(90.01)	18.27(42.27)	12.08(26.54)	0.641

Nunca N=21, 1-3 veces al mes N=24, 1-3 veces a la semana N=53 y más de 3 veces a la semana N=210.

Pesticidas	χ^2	Queso fresco				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
o,p´DDT:						
ng/gplacenta	0.991	1.06(3.29)	0.83(0.85)	0.75(1.10)	0.82(2.24)	0.803
ng/g lípido	0.828	22.94(108.93)	23.74(52.71)	14.38(33.74)	41.09(274.88)	0.843
p,p´DDT:						
ng/gplacenta	5.528	1.80(5.10)	1.19(1.22)	0.88(1.28)	1.27(5.05)	0.137
ng/g lípido	4.095	50.45(152.34)	35.29(57.68)	28.83(89.78)	69.57(421.60)	0.251
o,p´DDD:						
ng/gplacenta	4.151	2.27(5.10)	2.40(2.97)	2.89(6.46)	1.49(2.40)	0.246
ng/g lípido	3.327	55.83(142.77)	84.34(155.40)	93.17(273.00)	52.17(171.83)	0.344
p,p´DDE:						
ng/gplacenta	9.951	3.07(3.36)	3.88(5.56)	2.38(3.30)	2.38(5.86)	0.019*
ng/g lípido	5.854	104.82(177.92)	119.17(175.73)	221.76(323.23)	70.87(147.74)	0.119
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	11.921	7.56(9.55)	7.78(7.24)	6.38(7.87)	5.37(8.58)	0.008**
ng/g lípido	6.362	236.80(318.28)	270.40(314.62)	221.76(323.23)	234.09(622.95)	0.095†

Nunca N=73, 1-3 veces al mes N=39, 1-3 veces a la semana N=78 y más de 3 veces a la semana N=118.

Pesticidas	χ^2	Queso fresco				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
Aldrín:						
ng/gplacenta	1.260	0.61(0.86)	0.34(0.17)	0.51(1.01)	0.50(0.72)	0.739
ng/g lípido	1.583	11.91(30.33)	1.30(4.15)	7.80(24.47)	9.39(44.82)	0.663
Dieldrín:						
ng/gplacenta	0.623	0.56(1.29)	0.42(0.57)	0.42(0.58)	0.52(0.93)	0.891
ng/g lípido	1.216	8.79(23.63)	8.62(26.13)	7.82(25.62)	14.64(53.25)	0.749

Nunca N=73, 1-3 veces al mes N=39, 1-3 veces a la semana N=78 y más de 3 veces a la semana N=118.

Pesticidas	χ^2	Queso fresco				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
HCB:						
ng/gplacenta	5.975	0.98(2.03)	0.88(2.79)	0.51(0.64)	1.08(3.26)	0.113
ng/g lípido	6.418	28.22(89.63)	19.76(70.54)	12.72(42.20)	57.91(373.25)	0.093⁺
Lindano:						
ng/gplacenta	2.557	0.64(1.00)	0.44(0.35)	0.42(0.49)	0.36(0.31)	0.465
ng/g lípido	0.765	17.43(39.77)	21.52(46.33)	12.57(30.02)	8.79(19.00)	0.858

Nunca N=73, 1-3 veces al mes N=39, 1-3 veces a la semana N=78 y más de 3 veces a la semana N=118.

Pesticidas	χ^2	Queso añejo				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
o,p´DDT:						
ng/gplacenta	5.714	0.89(2.95)	1.47(3.77)	0.78(1.09)	0.65(0.66)	0.222
ng/g lípido	6.098	20.98(99.64)	99.55(469.40)	17.63(47.80)	13.63(34.99)	0.192
p,p´DDT:						
ng/gplacenta	4.183	0.89(1.25)	2.38(6.55)	1.04(1.80)	1.40(5.43)	0.382
ng/g lípido	5.368	20.78(53.40)	75.06(182.54)	32.35(103.27)	79.98(450.62)	0.252
o,p´DDD:						
ng/gplacenta	3.794	2.36(5.79)	2.64(4.37)	2.28(4.91)	1.65(2.44)	0.435
ng/g lípido	2.244	82.68(267.64)	111.03(292.21)	57.40(123.93)	45.33(86.36)	0.691
p,p´DDE:						
ng/gplacenta	2.280	3.04(4.82)	2.75(2.64)	2.31(1.90)	2.76(6.50)	0.684
ng/g lípido	2.815	93.53(159.40)	80.96(75.46)	85.73(128.84)	86.34(173.33)	0.589
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	3.542	6.62(7.64)	8.53(12.28)	5.85(8.79)	2.76(8.79)	0.472
ng/g lípido	2.498	220.05(323.37)	357.97(733.68)	199.08(281.31)	231.37(522.64)	0.645

Nunca N=92, 1-3 veces al mes N=40, 1-3 veces a la semana N=75 y más de 3 veces a la semana N=101.

Pesticidas	χ^2	Queso añejo				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
Aldrín:						
ng/gplacenta	4.740	0.55(1.05)	0.50(0.79)	0.33(0.23)	0.60(0.79)	0.192
ng/g lípido	7.197	9.23(24.33)	9.40(31.69)	1.49(6.45)	12.89(49.56)	0.066*
Diadrín:						
ng/gplacenta	2.585	0.52(1.15)	0.52(1.22)	0.42(0.58)	0.51(0.75)	0.460
ng/g lípido	2.439	8.29(26.47)	12.71(53.47)	5.18(16.57)	15.57(49.83)	0.486

Nunca N=92, 1-3 veces al mes N=40, 1-3 veces a la semana N=75 y más de 3 veces a la semana N=101.

Pesticidas	χ^2	Queso añejo				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
HCB:						
ng/gplacenta	1.484	1.03(2.55)	1.39(5.05)	0.53(0.53)	0.82(1.61)	0.686
ng/g lípido	0.622	25.86(88.96)	118.90(624.70)	12.58(40.47)	25.86(103.14)	0.891
Lindano:						
ng/gplacenta	1.226	0.44(0.77)	0.47(0.56)	0.50(0.65)	0.42(0.36)	0.747
ng/g lípido	1.669	10.06(25.77)	15.83(33.87)	16.90(42.26)	11.89(27.11)	0.644

Nunca N=92, 1-3 veces al mes N=40, 1-3 veces a la semana N=75 y más de 3 veces a la semana N=101.

Pesticidas	χ^2	Aves				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
o,p´DDT:						
ng/gplacenta	2.546	0.81(0.44)	0.67(0.61)	0.81(1.96)	1.12(3.24)	0.636
ng/g lípido	3.662	29.48(28.46)	19.11(29.12)	17.45(67.43)	74.50(403.27)	0.454
p,p´DDT:						
ng/gplacenta	2.969	1.02(0.98)	3.08(3.53)	1.31(4.52)	0.99(1.42)	0.563
ng/g lípido	3.642	45.55(67.43)	84.96(119.00)	50.17((303.12)	46.86(135.96)	0.457
o,p´DDD:						
ng/gplacenta	4.381	3.69(4.02)	0.58(0.45)	2.12(4.48)	2.24(4.87)	0.357
ng/g lípido	3.820	155.72(261.47)	8.51(12.71)	61.58(176.98)	90.94(264.28)	0.431
p,p´DDE:						
ng/gplacenta	2.858	2.56(0.69)	2.19(2.34)	2.89(5.26)	2.15(2.21)	0.582
ng/g lípido	5.009	64.21(73.72)	67.53(77.39)	80.53(130.66)	119.55(220.10)	0.286
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	2.790	7.71(5.11)	5.77(4.37)	0.81(1.96)	5.93(7.21)	0.594
ng/g lípido	5.736	346.95(371.33)	173.95(150.33)	212.61(396.09)	337.93(686.91)	0.220

Nunca N=7, 1-3 veces al mes N=7, 1-3 veces a la semana N=240 y más de 3 veces a la semana N=54.

Pesticidas	χ^2	Aves				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
Aldrín:						
ng/gplacenta	2.791	0.25(0.08)	0.29(0.10)	0.51(0.83)	0.56(0.76)	0.593
ng/g lípido	3.914	5.25(0.00)	6.92(3.20)	7.18(28.21)	16.71(53.89)	0.418
Dieldrín:						
ng/gplacenta	2.117	0.64(0.65)	0.29(0.10)	0.50(0.99)	0.46(0.64)	0.714
ng/g lípido	3.322	30.61(48.59)	12.30(30.12)	8.90(34.87)	16.40(51.18)	0.505

Nunca N=7, 1-3 veces al mes N=7, 1-3 veces a la semana N=240 y más de 3 veces a la semana N=54.

Pesticidas	χ^2	Aves				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
HCB:						
ng/gplacenta	4.899	0.42(0.26)	1.06(0.97)	0.81(1.84)	1.21(4.42)	0.298
ng/g lípido	5.300	4.90(7.75)	27.21(34.74)	22.67(87.05)	91.55(534.83)	0.258
Lindano:						
ng/gplacenta	2.636	0.46(0.42)	0.28(0.15)	0.46(0.64)	0.42(0.47)	0.620
ng/g lípido	2.308	12.56(12.11)	5.16(7.83)	13.09(32.07)	16.10(35.24)	0.679

Nunca N=7, 1-3 veces al mes N=7, 1-3 veces a la semana N=240 y más de 3 veces a la semana N=54.

Pesticidas	χ^2	Resto de carnes				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
o,p'DDT:						
ng/gplacenta	1.113	2.13(6.20)	0.66(0.59)	0.69(0.84)	1.35(3.80)	0.892
ng/g lípido	2.310	66.83(202.25)	13.90(40.88)	14.19(37.32)	95.77(477.18)	0.679
p,p'DDT:						
ng/gplacenta	4.295	5.79(14.50)	1.06(1.28)	0.93(1.50)	1.18(1.98)	0.368
ng/g lípido	4.915	306.04(978.58)	29.18(52.80)	29.76(108.50)	15.21(31.00)	0.296
o,p'DDD:						
ng/gplacenta	1.734	2.41(5.03)	1.00(1.11)	2.11(4.36)	2.97(6.11)	0.784
ng/g lípido	0.825	71.22(182.55)	33.12(61.99)	64.03(181.39)	110.97(309.77)	0.935
p,p'DDE:						
ng/gplacenta	5.396	3.52(3.55)	1.77(1.61)	2.92(5.39)	1.94(2.06)	0.249
ng/g lípido	2.956	110.16(116.03)	60.85(85.48)	91.39(162.73)	72.45(107.82)	0.565
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	3.173	12.65(18.07)	4.00(3.28)	6.14(7.48)	6.78(8.13)	0.529
ng/g lípido	3.613	524.49(971.27)	142.93(200.57)	206.61(323.57)	321.89(725.48)	0.461

Nunca N=20, 1-3 veces al mes N=28, 1-3 veces a la semana N=221 y más de 3 veces a la semana N=39.

Pesticidas	χ^2	Resto de carnes				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Dieldrín:						
ng/gplacenta	6.743	0.93(2.28)	0.42(0.40)	0.48(0.79)	0.36(0.60)	0.150
ng/g lípido	6.545	18.43(37.78)	12.16(37.81)	10.97(41.30)	2.38(8.73)	0.162
Aldrín:						
ng/gplacenta	8.258	0.75(1.28)	0.26(0.09)	0.49(0.79)	0.62(0.81)	0.083⁺
ng/g lípido	7.108	13.78(35.97)	0.27(0.07)	8.63(36.04)	11.14(30.04)	0.130

Nunca N=20, 1-3 veces al mes N=28, 1-3 veces a la semana N=221 y más de 3 veces a la semana N=39.

Pesticidas	χ^2	Resto de carnes			P	
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
HCB:						
ng/gplacenta	0.896	1.41(2.90)	0.54(0.72)	0.76(1.69)	1.56(5.19)	0.925
ng/g lípido	0.258	61.32(211.36)	13.47(48.70)	19.42(65.27)	122.55(634.14)	0.992
Lindano:						
ng/gplacenta	3.729	0.76(1.55)	0.46(0.58)	0.43(0.45)	0.40(0.49)	0.444
ng/g lípido	4.216	18.50(30.44)	16.88(33.47)	13.73(34.07)	6.56(14.18)	0.378

Nunca N=20, 1-3 veces al mes N=28, 1-3 veces a la semana N=221 y más de 3 veces a la semana N=39.

Pesticidas	χ^2	Pescado blanco			P	
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
o,p´DDT:						
ng/gplacenta	2.928	0.60(0.42)	0.67(0.79)	0.81(1.96)	1.38(3.97)	0.570
ng/g lípido	4.136	15.90(27.62)	10.52(24.74)	17.59(68.78)	108.73(491.36)	0.388
p,p´DDT:						
ng/gplacenta	1.579	0.90(0.88)	1.11(1.93)	1.36(4.51)	1.05(1.69)	0.813
ng/g lípido	1.902	32.10(53.95)	32.41(87.37)	56.36(308.26)	25.12(61.50)	0.754
o,p´DDD:						
ng/gplacenta	5.561	3.84(5.08)	1.50(2.02)	2.15(4.78)	1.76(2.82)	0.234
ng/g lípido	5.785	129.26(194.71)	119.82(60.02)	59.86(181.74)	116.38(298.07)	0.216
p,p´DDE:						
ng/gplacenta	5.783	1.47(1.15)	4.46(6.61)	2.78(4.99)	2.04(1.53)	0.216
ng/g lípido	8.063	44.54(62.53)	129.82(156.57)	85.18(156.02)	98.83(111.09)	0.089⁺
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	1.252	6.32(5.88)	7.17(7.29)	6.52(8.99)	5.65(6.45)	0.869
ng/g lípido	2.875	209.68(299.06)	219.90(206.26)	223.49(422.16)	344.51(742.08)	0.579

Nunca N=13, 1-3 veces al mes N=18, 1-3 veces a la semana N=242 y más de 3 veces a la semana N=35.

Pesticidas	χ^2	Pescado blanco				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Aldrín:						
ng/gplacenta	0.232	0.53(0.53)	0.49(0.53)	0.50(0.83)	0.53(0.80)	0.994
ng/g lípido	0.514	6.82(15.14)	6.56(17.90)	9.52(37.29)	3.68(13.68)	0.972
Dieldrín:						
ng/gplacenta	2.159	0.38(0.45)	0.67(0.91)	0.49(0.99)	0.47(0.42)	0.706
ng/g lípido	1.723	9.45(31.86)	14.95(31.76)	10.03(40.07)	11.80(56.64)	0.787

Nunca N=13, 1-3 veces al mes N=18, 1-3 veces a la semana N=242 y más de 3 veces a la semana N=35.

Pesticidas	χ^2	Pescado blanco				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
HCB:						
ng/gplacenta	3.502	0.38(0.26)	1.42(4.10)	0.78(1.58)	1.50(5.32)	0.478
ng/g lípido	4.313	3.76(9.50)	29.06(88.57)	22.09(85.59)	131.27(653.33)	0.365
Lindano:						
ng/gplacenta	6.158	0.25(0.12)	0.61(0.64)	0.44(0.62)	0.49(0.48)	0.188
ng/g lípido	6.171	3.74(5.20)	31.81(53.98)	11.80(30.42)	18.79(31.18)	0.187

Nunca N=13, 1-3 veces al mes N=18, 1-3 veces a la semana N=242 y más de 3 veces a la semana N=35.

Pesticidas	χ^2	Pescado azul				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
o,p´DDT:						
ng/gplacenta	3.421	0.54(0.31)	0.65(0.71)	0.82(1.99)	1.47(4.17)	0.490
ng/g lípido	5.776	15.28(23.76)	11.07(24.06)	17.67(69.40)	119.39(515.79)	0.217
p,p´DDT:						
ng/gplacenta	2.984	1.00(0.95)	0.86(1.57)	1.38(4.57)	1.11(1.77)	0.560
ng/g lípido	4.959	138.69(330.44)	24.59(72.16)	52.31(303.15)	26.97(64.34)	0.292
o,p´DDD:						
ng/gplacenta	2.640	3.60(5.42)	1.67(1.94)	2.18(4.83)	1.74(2.93)	0.620
ng/g lípido	5.081	125.63(212.34)	40.98(59.69)	60.90(183.42)	119.27(312.69)	0.279
p,p´DDE:						
ng/gplacenta	4.143	1.79(1.46)	3.57(5.36)	2.77(5.05)	2.07(1.60)	0.387
ng/g lípido	4.658	11.56(161.44)	99.37(132.35)	83.85(154.56)	94.90(115.35)	0.324
ΣDDTs:						
ng/gplacenta	0.998	6.55(5.80)	6.25(6.07)	6.56(9.11)	5.80(6.73)	0.910
ng/g lípido	2.523	395.09(539.22)	176.81(185.19)	218.87(415.03)	358.31(778.75)	0.640

Nunca N=12, 1-3 veces al mes N=29, 1-3 veces a la semana N=235 y más de 3 veces a la semana N=32.

Pesticidas	χ^2	Pescado azul				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
Aldrín:						
ng/gplacenta	1.082	0.46(0.54)	0.70(1.52)	0.48(0.67)	0.55(0.83)	0.897
ng/g lípido	0.610	6.58(16.32)	9.73(21.82)	8.24(37.25)	4.04(14.35)	0.962
Dieldrín:						
ng/gplacenta	1.566	0.41(0.49)	0.52(0.74)	0.49(1.01)	0.44(0.40)	0.815
ng/g lípido	1.321	40.56(95.25)	9.68(26.04)	9.52(36.77)	7.66(18.13)	0.858

Nunca N=12, 1-3 veces al mes N=29, 1-3 veces a la semana N=235 y más de 3 veces a la semana N=32.

Pesticidas	χ^2	Pescado azul				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces A la semana	
HCb:						
ng/gplacenta	3.644	0.39(0.30)	1.00(3.23)	0.80(1.60)	1.62(5.59)	0.456
ng/g lípido	2.722	4.49(10.34)	19.45(71.32)	22.42(86.37)	144.82(685.97)	0.605
Lindano:						
ng/gplacenta	5.759	0.27(0.17)	0.57(0.58)	0.44(0.63)	0.48(0.50)	0.218
ng/g lípido	6.053	5.30(6.75)	18.28(26.97)	12.76(33.32)	16.94(31.38)	0.195

Nunca N=12, 1-3 veces al mes N=29, 1-3 veces a la semana N=235 y más de 3 veces a la semana N=32.

II.- Relación entre hábitos alimentarios y el número de pesticidas por muestra

Según el test ANOVA de un factor, no existía asociación estadística entre la frecuencia de consumo de ninguno de los tipos de alimentos vegetales estudiados y el número de pesticidas encontrado en el tejido placentario, excepto para el caso de vegetales verdes frescos, encontrando un mayor número medio de pesticidas en tejido placentario de madres que consumían este producto con poca frecuencia (1-3 veces al mes).

Variable	F	Legumbres				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Nº pesticidas	0.112	9.00	8.00(2.00)	7.82(2.93)	7.96(2.63)	0.953

Nunca N=1, 1-3 veces al mes N=3, 1-3 veces a la semana N=124 y más de 3 veces a la semana N=180.

Variable	F	Ensalada				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	0.449		al mes	a la semana	a la semana	0.718
		7.33(3.04)	9.18(2.55)	7.23(2.73)	8.13(2.69)	

Nunca N=4; 1-3 veces al mes N=4, 1-3 veces a la semana N=19 y más de 3 veces a la semana N=281.

Variable	F	Vegetales verdes frescos				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	3.208		al mes	a la semana	a la semana	0.024*
		7.33(3.04)	9.17(2.56)	7.23(2.73)	8.13(2.69)	

Nunca N=17, 1-3 veces al mes N=19, 1-3 veces a la semana N=73 y más de 3 veces a la semana N=199.

Variable	F	Vegetales congelados				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	1.096		al mes	a la semana	a la semana	0.351
		8.43(2.93)	7.77(2.82)	7.68(2.56)	7.96(2.61)	

Nunca N=81, 1-3 veces al mes N=99, 1-3 veces a la semana N=95 y más de 3 veces a la semana N=33.

Variable	F	Fruta				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	0.321		al mes	a la semana	a la semana	0.810
		8.00(3.65)	8.70(2.71)	7.65(2.87)	7.92(2.74)	

Nunca N=3, 1-3 veces al mes N=11, 1-3 veces a la semana N=19 y más de 3 veces a la semana N=275.

Con respecto a los productos lácteos, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de estos alimentos y el número de pesticidas encontrados en el tejido placentario (Test ANOVA de un factor).

Variable	F	Yogurt				P
		Medias(±DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	0.707		al mes	a la semana	a la semana	0.549
		8.67(2.24)	7.78(2.71)	8.11(2.77)	7.81(2.80)	

Nunca N=21, 1-3 veces al mes N=24, 1-3 veces a la semana N=53 y más de 3 veces a la semana N=210.

Variable	F	Queso fresco				P
		Medias(±DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	0.123		al mes	a la semana	a la semana	0.297
	5	8.49(2.98)	7.80(2.24)	7.86(2.22)	7.68(3.01)	

Nunca N=73, 1-3 veces al mes N=39, 1-3 veces a la semana N=78 y más de 3 veces a la semana N=118.

Variable	F	Queso añejo				P
		Medias(±DE)				
		Nunca	1-3 veces	1-3 veces	>3 veces	
Nºpesticidas	0.282		al mes	a la semana	a la semana	0.839
		7.93(2.57)	8.31(2.74)	7.91(2.37)	7.81(3.15)	

Nunca N=92, 1-3 veces al mes N=40, 1-3 veces a la semana N=75 y más de 3 veces a la semana N=101.

La frecuencia de consumo de carnes (aves, carnes rojas), no estaba asociada estadísticamente con el número de pesticidas encontrados en el tejido placentario (Test ANOVA de un factor).

Variable	F	Aves				P
		Medias(±DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Nºpesticidas	0.829	8.39(2.57)	8.25(2.62)	7.93(2.73)	7.5(3.09)	0.479

Nunca N=7, 1-3 veces al mes N=7, 1-3 veces a la semana N=240, más de 3 veces a la semana N=54.

Variable	F	Otras carnes				P
		Medias(±DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Nºpesticidas	0.551	8.39(2.57)	8.25(2.63)	7.93(2.73)	7.50(3.09)	0.648

Nunca N=20, 1-3 veces al mes N=28, 1-3 veces a la semana N=221, más de 3 veces a la semana N=39.

Al aplicar el test ANOVA de un factor, apareció una tendencia a la significación estadística entre la frecuencia de consumo de pescado azul y el número medio de pesticidas encontrado en el tejido placentario, siendo este mayor en madres que consumía con poca frecuencia este alimento (1-3 veces al mes) o que no lo consumían nunca.

Variable	F	Pescado blanco				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Nºpesticidas	0.497	8.25(3.22)	8.31(3.44)	7.82(2.69)	8.34(2.67)	0.685

Nunca N=13, 1-3 veces al mes N=18, 1-3 veces a la semana N=242, más de 3 veces a la semana N=35.

Variable	F	Pescado azul				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces a la semana	>3 veces a la semana	
Nºpesticidas	2.420	8.70(2.31)	9.12(2.89)	7.71(2.71)	8.24(2.77)	0.066 ⁺

Nunca N=12, 1-3 veces al mes N=29, 1-3 veces a la semana N=235, más de 3 veces a la semana N=32.

III.- Relación entre hábitos alimentarios y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al aplicar el test de Mann-Whitney, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de productos vegetales y la TEXB de la fracción alfa y beta.

TEXB	χ^2	Legumbres				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/ g placenta	3.289	14.40	0.40(0.41)	3.61(8.36)	5.47(13.41)	0.349
	2.165	364.52	29.86(34.52)	137.25(289.29)	239.72(509.01)	0.539
G lípido						
Beta:EeqpM/ g placenta	0.111	3.02	8.97(12.27)	22.55(42.10)	23.49(79.21)	0.991
	0.358	74.40	577.46(796.07)	1305.40(2564.40)	1176.68(2705.50)	0.949
g lípido						

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=1, 1-3 veces al mes N=3, 1-3 veces a la semana N=124 y más de 3 veces a la semana N=180.

TEXB	χ^2	Ensalada				P
		Medias(\pm DE)				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	2.965	5.61(6.07)	2.70(3.31)	1.22(1.62)	4.90(11.99)	0.397
g lípido	1.650	159.28(156.46)	219.31(308.14)	45.82(55.19)	204.66(447.18)	0.648
Beta:EeqpM/						
g placenta	0.319	14.10(23.69)	9.31(11.73)	17.27(24.39)	23.38(68.58)	0.956
g lípido	0.669	652.17(990.59)	608.23(774.13)	871.50(987.43)	946.39(1703.44)	0.880

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=4, 1-3 veces al mes N=4, 1-3 veces a la semana N=19 y más de 3 veces a la semana N=281.

TEXB	χ^2	Vegetales verdes frescos				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	2.186	2.59(3.93)	5.27(14.99)	2.37(5.20)	5.60(13.01)	0.535
g lípido	3.530	195.05(385.92)	143.29(299.96)	109.71(242.81)	231.65(492.02)	0.317
Beta:EeqpM/						
g placenta	3.040	19.83(37.92)	14.08(34.96)	18.66(37.30)	25.22(77.22)	0.386
g lípido	1.793	1531.63(2633.46)	614.41(896.76)	897.62(1128.63)	978.18(1835.10)	0.616

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=17, 1-3 veces al mes N=19, 1-3 veces a la semana N=73 y más de 3 veces a la semana N=199.

TEXB	χ^2	Vegetales congelados				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	1.974	3.77(7.45)	7.21(16.76)	3.46(8.22)	2.67(6.81)	0.578
g lípido	3.018	192.24(409.76)	268.81(538.87)	147.52(339.94)	118.29(322.33)	0.389
Beta:EeqpM/						
g placenta	3.051	17.57(30.28)	37.16(107.65)	14.82(29.38)	15.34(29.63)	0.384
g lípido	5.675	980.78(2057.42)	998.47(1720.43)	840.59(2130.85)	655.18(931.346)	0.129

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=81, 1-3 veces al mes N=99, 1-3 veces a la semana N=95 y más de 3 veces a la semana N=33.

TEXB	χ^2	Fruta fresca				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	5.525	12.85(20.17)	1.27(2.25)	6.68(6.93)	4.54(11.82)	0.137
g lípido	5.030	294.89(461.96)	88.55(213.33)	358.78(493.29)	186.44(43.77)	0.170
Beta:EeqpM/						
g placenta	1.044	41.34(70.51)	4.98(8.62)	11.90(19.03)	23.77(68.86)	0.791
g lípido	1.542	951.67(1612.52)	287.09(566.92)	637.74(1134.04)	1279.41(2730.41)	0.673

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=3, 1-3 veces al mes N=11, 1-3 veces a la semana N=19, más de 3 veces a la semana N=275.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, aparecieron algunas asociaciones estadísticamente significativas entre la frecuencia de consumo de productos lácteos y la TEXB de la fracción alfa y beta. Se halló una asociación estadística entre la frecuencia de consumo de queso fresco y la TEXB de la fracción beta (ng/g lípido) y una tendencia a dicha asociación para el caso de la fracción alfa,

con mayores niveles medios de estrogenicidad en beta en el tejido placentario de mujeres que consumían este producto con una frecuencia de 1-3 veces por semana y 1-3 veces al mes, para el caso de alfa. También existía una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de queso añejo y la TEXB de la fracción beta (ng/g lípido), con mayores niveles medios en mujeres que consumían este alimento más de 3 veces por semana.

TEXB	χ^2	Yogurt				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	3.098	4.54(8.04)	1.84(3.82)	3.86(9.72)	5.26(12.85)	0.377
g lípido	2.535	181.3(341.691)	98.61(269.751)	136.58(321.68)	225.65(479.21)	0.469
Beta:EeqpM/						
g placenta	2.929	181.31(341.691)	7.48(12.80)	23.8(30.59)	10.97(17.89)	0.403
g lípido	3.340	446.23(1020.13)	1350.90(2235.53)	768.68(1981.91)	1395.08(2912.32)	0.342

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=21, 1-3 veces al mes N=24, 1-3 veces a la semana N=53 y más de 3 veces a la semana N=210.

TEXB	χ^2	Queso fresco				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	6.319	2.52(4.97)	8.63(12.70)	6.01(15.70)	3.88(10.54)	0.097⁺
g lípido	6.909	79.07(134.46)	386.59(537.36)	276.49(579.35)	153.61(371.13)	0.075⁺
Beta:EeqpM/						
g placenta	6.608	12.28(23.85)	21.50(31.97)	34.82(115.94)	21.73(41.58)	0.086⁺
g lípido	8.873	898.89(2715.04)	1154.57(1811.26)	1431.93(2879.61)	1273.16(2596.02)	0.031[*]

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=73, 1-3 veces al mes N=39, 1-3 veces a la semana N=78 y más de 3 veces a la semana N=118.

TEXB	χ^2	Queso añejo				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	1.820	6.19(15.40)	5.34(11.10)	3.76(8.68)	3.56(8.25)	0.611
g lípido	1.684	193.10(350.03)	227.85(428.64)	215.23(550.15)	166.84(410.03)	0.640
Beta:EeqpM/						
g placenta	5.611	23.98(103.82)	14.99(28.52)	18.99(35.34)	27.18(46.26)	0.132
g lípido	8.222	816.27(1778.16)	567.71(1067.99)	1128.04(2529.67)	1869.38(3496.26)	0.042*

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=92, 1-3 veces al mes N=40, 1-3 veces a la semana N=75 y más de 3 veces a la semana N=101.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de carnes y la TEXB de la fracción alfa y beta.

TEXB	χ^2	Aves				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	3.414	3.21(6.28)	2.24(3.09)	5.47(12.76)	1.31(2.01)	0.332
g lípido	1.826	79.92(159.34)	162.79(264.90)	222.14(473.26)	85.99(159.66)	0.609
Beta:EeqpM/						
g placenta	2.954	5.65(9.84)	5.34(10.35)	25.62(73.56)	14.65(29.49)	0.399
g lípido	2.550	19.35(148.36)	331.62(90.22)	1255.89(2552.66)	1227.70(3113.87)	0.466

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=7, 1-3 veces al mes N=7, 1-3 veces a la semana N=240 y más de 3 veces a la semana N=54.

TEXB	χ^2	Otras carnes				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces Mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	5.141	1.17(2.47)	8.41(14.24)	4.87(12.33)	2.34(3.28)	0.162
g lípido	4.705	48.95(96.96)	318.17(646.56)	204.61(440.20)	119.73(199.00)	0.195
Beta:EeqpM/						
g placenta	2.854	40.13(56.64)	15.58(30.14)	25.04(75.11)	6.37(10.30)	0.415
g lípido	3.283	1432.52(1844.21)	836.89(1559.02)	1834.17(2962.17)	416.48(913.03)	0.350

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=20, 1-3 veces al mes N=28, 1-3 veces a la semana N=221 y más de tres veces a la semana N=39.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de consumo de pescados y la TEXB de la fracción alfa y beta.

TEXB	χ^2	Pescado blanco				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	0.841	4.32(5.57)	5.6(8.67)	4.42(11.46)	6.2(14.63)	0.840
g lípido	0.497	3.49(3.71)	296.84(657.7)	179.55(385.1)	269.81(611.65)	0.919
Beta:EeqpM/						
g placenta	1.790	3.49(3.71)	19.15(33.07)	25.52(73.34)	12.37(2.03)	0.617
g lípido	1.372	15.83(198.23)	1041.18(2314.55)	1288.54(2725.75)	1124.56(2428.75)	0.712

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=13, 1-3 veces al mes N=18, 1-3 veces a la semana N=242 y más de 3 veces a la semana N=35.

TEXB	χ^2	Pescado blanco				P
		Medias \pm DE				
		Nunca	1-3 veces mes	1-3 veces semana	>3 veces semana	
Alfa:EeqpM/						
g placenta	3.211	4.59(5.78)	8.20(22.23)	3.91(8.81)	6.86(15.29)	0.360
g lípido	3.525	237.97(371.24)	250.19(546.39)	171.69(378.67)	296.71(638.66)	0.317
Beta:EeqpM/						
g placenta	1.466	4.12(3.62)	52.42(185.22)	21.39(39.59)	12.78(2.79)	0.690
g lípido	0.873	927.78(2397.80)	1136.9(2418.88)	1244.97(2679.25)	1089.39(253.23)	0.832

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Nunca N=12, 1-3 veces al mes N=29, 1-3 veces a la semana N=235 y más de 3 veces a la semana N=32.

4.5.2. CARACTERÍSTICAS DEL PADRE

4.5.2.1. Nivel de estudios

Como en el caso de la madre, se ha recogido en la encuesta epidemiológica, el nivel de estudios alcanzado por el padre.

Dado que el nivel de estudios del padre puede identificar a un grupo particular de la población, se ha estudiado la relación existente entre esta variable y los niveles de cada uno de los pesticidas y TEXB. Se construyeron tablas de contingencia para la variable nivel de escolaridad (sin estudios o primarios/ medios/ superiores) y presencia o no de cada uno de los pesticidas y la presencia o no de TEXB de la fracción alfa y beta. Además, se enfrentaron la variable nivel educacional del padre a los niveles de pesticidas y TEXB detectados en el tejido placentario de las madres (Test de Kruskal-Wallis).

Con objeto de estudiar la influencia que el nivel de estudios tenía en el número de pesticidas encontrado en cada tejido placentario, se usó el test ANOVA de un factor.

Por último, la variable nivel de estudios se relacionó con otras variables de la encuesta, tales como, trabajo actual (Tablas de contingencia) y edad del padre, considerada como variable continua (Test de Kruskal-Wallis).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre nivel de estudios del padre y pesticidas organoclorados

Al construir las tablas de contingencia, solamente apareció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia ($\geq LC$ o $< LC$) del pesticida HCB en el tejido placentario de las madres y el nivel de estudios de su pareja. Del total de madres que presentaban este compuesto en su tejido placentario, un 68% no tenían estudios o tenían estudios primarios, un 16% tenían estudios medios y otro 16% habían asistido a la universidad.

Pesticidas	$\geq LC$	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
o,p' DDT $\rho = 0.032$	Sí	97	34	26	0.373	0.830
	No	84	34	26		
p,p' DDT $\rho = 0.056$	Sí	88	29	22	1.088	0.580
	No	93	39	30		
o,p' DDD $\rho = -0.017$	Sí	88	32	27	0.288	0.866
	No	93	36	25		
p,p' DDE $\rho = 0.024$	Sí	170	60	49	2.328	0.312
	No	11	8	3		
$\Sigma DDTs$ $\rho = 0.029$	Sí	178	65	51	1.469	0.480
	No	3	3	1		

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
E-I $\rho = 0.034$	Sí	101	35	27	0.397	0.820
	No	80	32	25		
E-II $\rho = 0.011$	Sí	60	14	19	4.590	0.101
	No	121	54	33		
E-éter $\rho = -0.001$	Sí	95	27	30	4.531	0.104
	No	86	41	22		
E-lactona $\rho = -0.018$	Sí	62	24	19	0.099	0.952
	No	119	44	33		
E-diol $\rho = 0.015$	Sí	98	32	23	1.526	0.466
	No	56	26	12		
E-sulfato $\rho = 0.047$	Sí	95	34	24	0.672	0.715
	No	86	34	28		
ΣEndos $\rho = 0.076$	Sí	176	63	49	2.712	0.258
	No	5	5	3		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
Aldrín $\rho = 0.096$	Sí	58	14	12	3.953	0.139
	No	123	54	40		
Endrín $\rho = 0.008$	Sí	65	18	20	2.460	0.292
	No	116	50	32		
Dieldrín $\rho = 0.020$	Sí	40	9	12	2.711	0.258
	No	141	59	40		

Pesticidas	≥LC	Nivel de estudios			X ²	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
HCB ρ= 0.100	Sí	85	20	20	6.513	0.039*
	No	96	48	32		
Lindano ρ= 0.075	Sí	141	47	37	2.451	0.294
	No	40	21	15		
Mirex ρ= 0.003	Sí	45	16	13	0.053	0.974
	No	136	52	39		
Metoxicloro ρ= 0.062	Sí	59	20	13	1.153	0.562
	No	122	48	39		

HCB=Hexaclorobenceno.

Según el test de Kruskal-Wallis, existía una correlación positiva entre el nivel de estudios y los niveles de HCB en el tejido placentario y una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de lindano y el nivel de estudios. En ambos casos, un más bajo nivel educacional del padre determinaba una mayor concentración de estos pesticidas en el tejido placentario de las madres. Los niveles medios más altos se encontraban en madres cuyas parejas no tenían estudios o estudios primarios, seguido de los que tenían estudios secundarios y finalmente los que habían asistido a la universidad.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
o,p´DDT:ng/g pla	1.015	0.83(1.87)	0.59(0.62)	1.08(3.69)	0.602
	ng/g lip	1.013	29.56(209.22)	13.04(41.32)	26.75(121.99)
p,p´DDT:ng/g pla	0.617	1.14(2.76)	1.82(5.79)	1.95(7.17)	0.734
	ng/g lip	0.967	31.60(90.52)	29.24(11.35)	128.60(594.65)
o,p´DDD:ng/gpla	0.278	2.03(4.39)	2.32(4.94)	2.26(4.84)	0.870
	ng/g lip	0.371	63.96(217.69)	67.06(133.89)	58.69(144.91)
p,p´DDE:ng/gpla	2.073	3.69(7.78)	3.51(4.93)	1.96(1.60)	0.355
	ng/g lip	0.768	105.77(213.40)	116.75(184.75)	77.34(109.83)
Σ DDTs: ng/g pla	0.162	7.12(9.80)	7.59(11.20)	6.54(8.67)	0.922
	ng/g lip	0.871	237.54(451.00)	226.44(297.41)	289.72(620.43)

Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P	
		Medias(\pm DE)				
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
E –I:	ng/g pla	0.113	0.86(2.65)	0.68(1.47)	0.76(1.73)	0.945
	ng/g lip	0.391	22.66(60.85)	23.80(58.71)	24.72(66.96)	0.823
E-II:	ng/g pla	3.904	1.09(3.66)	1.02(2.43)	0.88(1.17)	0.142
	ng/g lip	3.465	14.70(82.34)	13.47(62.67)	11.05(37.81)	0.177
E-éter:	ng/g pla	3.014	0.22(0.46)	0.14(0.19)	0.17(0.42)	0.222
	ng/g lip	1.500	7.71(24.76)	4.33(9.68)	7.48(30.17)	0.472
E-lactona:ng/g pla	0.122	1.44(5.02)	0.65(1.78)	1.33(5.12)	0.941	
	ng/g lip	0.075	56.10(247.33)	18.48(57.46)	29.22(120.34)	0.963
E-diol:	ng/g pla	3.158	4.19(4.55)	3.98(5.74)	6.18(7.84)	0.206
	ng/g lip	2.761	154.64(246.24)	151.20(412.34)	203.43(318.38)	0.251
E-sulfato:ng/g pla	1.175	1.04(2.90)	0.91(1.61)	0.55(0.93)	0.556	
	ng/g lip	1.645	33.97(111.38)	39.67(88.35)	17.41(47.47)	0.439
Σ Endos:	ng/g pla	3.850	8.27(12.44)	6.60(9.17)	8.01(12.53)	0.146
	ng/g lip	0.996	300.63(515.94)	255.69(565.55)	259.48(398.24)	0.608

E=Endosulfán. Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Aldrín: ng/g pla	4.419	0.52(0.70)	0.38(0.56)	0.54(1.15)	0.110
	ng/g lip	4.056	10.21(39.11)	3.52(13.95)	5.48(20.37)
Endrín: ng/g pla	1.596	1.82(4.68)	1.69(2.42)	1.61(1.73)	0.450
	ng/g lip	1.724	26.64(81.80)	31.09(101.07)	26.84(62.64)
Dieldrín : ng/g pla	30.612	0.62(1.27)	0.30(0.16)	0.45(0.71)	0.164
	ng/g lip	3.526	13.76(42.55)	2.11(10.43)	9.45(41.43)

Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

Pesticidas	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
HCB: ng/gpla	6.120	1.03(2.77)	0.76(1.99)	0.64(1.53)	0.047*
	ng/g lip	6.544	42.04(279.85)	20.76(87.62)	23.44(124.99)
Lindano: ng/gpla	5.213	0.48(0.68)	0.42(0.44)	0.36(0.51)	0.074⁺
	ng/g lip	5.497	12.34(26.80)	17.29(41.60)	9.16(34.74)
Mirex: ng/gpla	0.044	0.63(1.77)	0.73(2.31)	0.52(0.83)	0.978
	ng/g lip	0.059	15.15(71.33)	19.11(73.98)	16.70(64.09)
Metoxicloro:ng/gpla	1.675	0.85(1.81)	0.88(2.70)	0.40(0.35)	0.433
	ng/g lip	1.699	22.72(90.23)	18.01(66.46)	4.20(12.57)

HCB=Hexaclorobenceno. Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

II.- Relación entre nivel de estudios del padre y el número de pesticidas por muestra

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el nivel educacional del padre y el número de pesticidas en tejido placentario de la madre. Las madres con parejas con estudios primarios o sin estudios, tenían un

mayor número medio de pesticidas en el tejido placentario (Test ANOVA de un factor).

Variable	F	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
Número de pesticidas	3.515	Sin/primarios	Medios	Superiores	0.031*
		7.93(2.89)	6.84(3.20)	7.48(2.70)	

Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55

III.- Relación entre nivel de estudios del padre y TEXB de la fracción alfa y beta

No existía asociación estadísticamente significativa entre los niveles de TEXB de la fracción alfa y beta y el nivel de estudios; aún así, se pudo observar que la mayoría de madres que presentaron un valor medible de TEXB para la fracción alfa en su tejido placentario, tenían una pareja sin estudios o con estudios primarios (60.37%).

TEXB	\geq LC	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
Alfa	Sí	131	45	41	1.624	0.444
	No	50	24	14		
Beta	Sí	150	59	49	1.309	0.520
	No	31	10	6		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según el test de Mann-Whitney, existía una tendencia a la significación estadística para el caso de la fracción beta (ng/g lípido), con niveles mayores en tejido placentario de madres con una pareja con estudios superiores.

TEXB	χ^2	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Alfa:EeqpM/					
g placenta	0.385	4.12(9.58)	3.78(8.48)	5.51(17.02)	0.825
g lípido	0.630	170.44(398.84)	195.56(454.07)	193.11(417.31)	0.630
Beta:EeqpM/					
g placenta	1.890	16.05(31.81)	22.48(44.62)	33.53(127.28)	0.389
g lípido	5.369	852.73(1325.26)	935.73(1824.16)	1045.84(2480.57)	0.068⁺

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

IV.- Relación entre nivel de estudios del padre y otras variables de la encuesta

Según el test ANOVA de un factor, existía una asociación estadísticamente significativa entre el nivel de estudios y la edad del padre en el momento del parto del bebé, teniendo edades mayores, aquellos padres con estudios superiores.

Variable	F	Nivel de estudios			P
		Medias(\pm DE)			
		Sin/primarios	Medios	Superiores	
Edad del padre (años)	3.112	34.16(6.19)	34.30(4.48)	36.36(6.14)	0.046*

Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

También se asoció estadísticamente de forma significativa el tipo de trabajo llevado a cabo por los padres y su nivel de estudios (Tablas de contingencia). El 100% de los agricultores no tenían estudios o estudios primarios, y más de dos terceras partes de los padres con estudios superiores, trabajaban en actividades diferentes a la agricultura y a trabajos manuales.

Variable	Categorías	Nivel de estudios			χ^2	P
		Sin/primarios	Medios	Superiores		
Actividad laboral	T.Manual	92	26	9	46.928	<0.001**
	Agricultura	22	0	0		
	Otros	68	43	46		

Sin estudios o estudios primarios N=183, secundarios N=69 y superiores N=55.

4.5.2.2. Actividad laboral

Los padres no están exentos de aportar posibles factores que influyan en los niveles de sustancias químicas encontradas en los bebés. Algunos estudios han mostrado una asociación entre la exposición del padre en el lugar de trabajo a determinadas sustancias químicas y los niveles de estas sustancias encontrados en los niños. La hipótesis más convincente es, que los padres expuestos a estas sustancias vivan en áreas más contaminadas o que traigan estas sustancias adheridas a su ropa de trabajo.

Con objeto de analizar la influencia de la actividad laboral del padre en los niveles de compuestos orgánicos persistentes en tejido placentario, se construyeron las tablas de contingencia (presencia/ausencia de pesticidas/TEXB de la fracción alfa o beta frente a actividad laboral: trabajo manual/agricultura/otros) y el test de Mann-Whitney (niveles de pesticidas organoclorados/TEXB de la fracción alfa o beta en el tejido placentario frente a la actividad laboral, segmentada esta variable en las tres categorías anteriormente descritas).

El test ANOVA de un factor y la prueba de Levene, fueron aplicados para ver la posible asociación entre el número de pesticidas en las muestras de tejido placentario de las madres y el tipo de trabajo desarrollado por los padres, y la percepción que las madres tenían de la exposición de sus parejas a las sustancias químicas durante el trabajo, respectivamente.

Por último, se estudiaron las asociaciones entre la variable trabajo y la percepción de la exposición a productos químicos y las variables edad del padre, peso, perímetro cefálico e índice ponderal del niño (Test ANOVA de un factor, prueba de Levene), y semanas gestación (Test de Kruskal-Wallis, Test de Mann-Whitney).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre actividad laboral del padre y pesticidas organoclorados

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de trabajo desarrollado por el padre y la presencia/ausencia de endosulfán-lactona y endosulfán-diol en el tejido placentario de sus parejas, así como una tendencia a dicha asociación para el caso de endosulfán-II. Del total de hombres dedicados a la agricultura, un 18.8%, 54.55% y un 100% de sus parejas tenía en su tejido placentario endosulfán-II, endosulfán-lactona y endosulfán-diol. Con respecto a los que desarrollaban algún tipo de trabajo manual, el 37.6%, 36.8% y 96%, de sus parejas tenía en su tejido placentario endosulfán-II, endosulfán-lactona y endosulfán-diol. Por último, un 37.5%, 29.87% y un 94.80% de las madres con parejas que trabajaban en otro tipo de trabajos, tenía endosulfán-II, endosulfán-lactona y endosulfán-diol en su tejido placentario.

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			X ²	P
		T.manual	Agricultura	Otros		
o,p' DDT	Sí	65	13	79	0.471	0.790
	No	60	9	75		
p,p' DDT	Sí	62	12	65	2.185	0.330
	No	63	10	89		
o,p' DDD	Sí	63	10	74	0.261	0.878
	No	62	12	80		
p,p' DDE	Sí	116	18	145	4.329	0.115
	No	9	4	9		
ΣDDTs	Sí	123	2	151	4.819	0.222
	No	2	2	3		

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			X ²	P
		T.manual	Agricultura	Otros		
E-I	Sí	66	11	86	0.369	0.831
	No	58	11	68		
E-II	Sí	47	4	42	5.348	0.069⁺
	No	78	18	112		
E-éter	Sí	64	12	76	0.250	0.883
	No	61	10	78		
E-lactona	Sí	46	13	46	7.582	0.023*
	No	79	9	108		
E-diol	Sí	67	18	68	12.309	0.002**
	No	43	1	50		
E-sulfato	Sí	66	9	78	1.062	0.588
	No	59	13	76		
ΣEndos	Sí	120	22	146	2.243	0.326
	No	5	0	8		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			χ^2	P
		T.manual	Agricultura	Otros		
Aldrín	Sí	41	7	36	3.226	0.199
	No	84	15	118		
Endrín	Sí	39	10	54	1.789	0.409
	No	86	12	100		
Dieldrín	Sí	26	6	29	0.887	0.642
	No	99	16	125		

Pesticidas	≥LC	Actividad laboral			χ^2	P
		T.manual	Agricultura	Otros		
HCB	Sí	56	10	59	1.347	0.510
	No	69	12	95		
Lindano	Sí	95	20	110	4.723	0.094
	No	30	2	44		
Mirex	Sí	31	6	37	0.115	0.944
	No	94	16	117		
Metoxicloro	Sí	42	7	83	1.066	0.587
	No	83	15	15		

HCB=Hexaclorobenceno.

Al enfrentar la variable actividad laboral del padre categorizada en tres grupos a las concentraciones de pesticidas encontrados en tejido placentario, aparecieron asociaciones estadísticamente significativas para el caso de p,p'DDE, endosulfán-II (ng/g lípido), endosulfán-lactona, endosulfán-diol, sumatoria de endosulfanes y lindano. Los niveles medios de endosulfán-lactona, diol y sumatoria de endosulfanes, eran mayores en el tejido placentario de madres cuyas parejas se dedicaban a trabajos agrícolas, el p,p'DDE y lindano en

padres dedicados a algún tipo de trabajo manual y el endosulfán-II, en el grupo de padres dedicados a otras actividades.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		T.manual	Agricultura	Otros	
o,p´DDT:					
ng/g placenta	0.434	0.89(2.15)	0.65(0.63)	0.75(2.21)	0.805
ng/g lípido	0.208	38.65(251.54)	9.07(16.66)	16.86(75.62)	0.901
p,p´DDT:					
ng/g placenta	2.597	1.33(3.21)	1.02(1.85)	1.53(5.61)	0.273
ng/g lípido	2.439	40.43(115.03)	21.59(64.79)	57.57(352.25)	0.295
o,p´DDD:					
ng/g placenta	0.460	1.99(4.04)	1.16(1.69)	2.31(5.18)	0.794
ng/g lípido	0.863	64.58(241.63)	21.80(39.63)	72.41(150.93)	0.650
p,p´DDE:					
ng/g placenta	6.910	4.32(8.88)	1.90(1.58)	2.66(4.08)	0.032*
ng/g lípido	6.585	132.13(244.77)	79.46(159.84)	83.38(140.13)	0.037*
ΣDDTs:					
ng/g placenta	4.441	7.94(10.67)	4.23(3.39)	6.64(9.77)	0.109
ng/g lípido	4.313	286.17(517.48)	145.72(193.43)	223.90(426.41)	0.116

Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		T.manual	Agricultura	Otros	
E -I:					
ng/g placenta	0.887	0.97(3.04)	0.38(0.43)	0.70(1.56)	0.642
ng/g lípido	1.007	29.11(82.85)	8.27(17.39)	20.68(56.91)	0.604
E-II					
ng/g placenta	5.625	0.95(1.41)	0.63(0.32)	1.13(4.01)	0.060⁺
ng/g lípido	6.541	14.66(46.99)	1.28(3.33)	14.87(91.44)	0.038*
E-éter:					
ng/g placenta	1.257	0.23(0.44)	0.13(0.12)	0.16(0.39)	0.533
ng/g lípido	0.881	9.32(26.52)	4.57(9.23)	5.28(21.89)	0.644
E-lactona:					
ng/g placenta	9.780	0.94(2.99)	4.33(8.77)	1.01(4.50)	0.008**
ng/g lípido	10.559	43.95(249.45)	159.47(327.03)	25.51(106.81)	0.005**
E-diol:					
ng/g placenta	9.298	3.92(5.38)	4.83(3.86)	3.11(5.15)	0.010*
ng/g lípido	8.581	185.12(375.58)	199.43(185.74)	131.80(232.05)	0.014*
E-sulfato:					
ng/g placenta	0.135	1.03(3.29)	0.72(0.99)	0.83(1.52)	0.935
ng/g lípido	0.293	37.58(124.30)	26.04(40.95)	29.10(77.95)	0.864
ΣEndos:					
ng/g placenta	10.445	8.11(9.28)	11.64(11.34)	6.86(13.37)	0.005**
ng/g lípido	8.740	333.65(614.80)	423.80(466.80)	222.50(402.63)	0.013*

E=Endosulfán. Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

Pesticidas	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		T.manual	Agricultura	Otros	
Aldrín:					
ng/g placenta	4.044	0.57(0.80)	0.40(0.29)	0.43(0.77)	0.132
ng/g lípido	3.611	12.22(45.01)	8.94(29.91)	4.21(15.69)	0.164
Endrín:					
ng/g placenta	1.608	1.99(5.56)	1.40(0.99)	1.56(1.91)	0.448
ng/g lípido	1.681	31.81(100.78)	18.54(35.16)	25.63(72.30)	0.431
Dieldrín :					
ng/g placenta	1.285	0.54(1.06)	0.48(0.55)	0.48(1.06)	0.526
ng/g lípido	0.992	11.94(38.96)	11.57(29.50)	8.95(37.94)	0.609

Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

Pesticidas	X^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		T.manual	Agricultura	Otros	
HCB:					
ng/gplacenta	2.911	0.98(2.90)	0.93(1.23)	0.81(2.09)	0.233
ng/g lípido	2.445	46.85(333.49)	39.71(74.31)	22.79(98.69)	0.294
Lindano:					
ng/gplacenta	9.322	0.56(0.84)	0.37(0.22)	0.34(0.33)	0.009**
ng/g lípido	9.775	17.37(38.21)	12.28(31.37)	9.38(25.93)	0.008**
Mirex:					
ng/gplacenta	0.308	0.66(2.03)	0.51(0.57)	0.61(1.67)	0.857
ng/g lípido	0.342	17.63(60.03)	8.61(21.06)	16.15(82.25)	0.843
Metoxicloro:					
ng/gplacenta	2.627	0.90(1.81)	0.80(2.15)	0.48(1.06)	0.269
ng/g lípido	2.469	20.91(58.25)	12.08(39.49)	17.38(93.17)	0.291

HCB= Hexaclorobenceno. Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

Al aplicar las tablas de contingencia para ver las asociaciones estadísticas entre la variable dicotómica percepción de la exposición que las madres tenían de la exposición a productos químicos de sus parejas y la variable también dicotómica, presencia/ausencia de pesticidas, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa.

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
o,p' DDT $\rho = 0.016$	Sí	23	130	0.081	0.775
	No	27	121		
p,p' DDT $\rho = -0.020$	Sí	22	117	0.115	0.735
	No	28	134		
o,p' DDD $\rho = -0.025$	Sí	23	124	0.193	0.660
	No	27	127		
p,p' DDE $\rho = -0.046$	Sí	45	234	0.641	0.423
	No	5	17		
ΣDDTs $\rho = -0.050$	Sí	48	246	0.638	0.424
	No	2	5		

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
E-I	Sí	25	138	0.259	0.611
	No	24	113		
$\rho = -0.029$	Sí	13	80	0.673	0.412
	No	37	171		
E-II	Sí	25	127	0.006	0.938
	No	25	124		
$\rho = -0.004$	Sí	19	86	0.256	0.613
	No	31	165		
E-lactona	Sí	30	123	2.629	0.105
	No	11	83		
$\rho = 0.103$	Sí	28	125	0.641	0.423
	No	22	126		
E-sulfato	Sí	48	240	0.015	0.902
	No	2	11		
$\rho = 0.007$	Sí	48	240	0.015	0.902
	No	2	11		

E= Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
Aldrín	Sí	18	66	1.952	0.162
	No	32	185		
$\rho = 0.081$	Sí	14	89	1.030	0.310
	No	36	162		
Endrín	Sí	14	47	2.220	0.136
	No	36	204		
$\rho = -0.059$	Sí	14	47	2.220	0.136
	No	36	204		
$\rho = 0.086$	Sí	14	47	2.220	0.136
	No	36	204		

Pesticidas	≥LC	Percepción de exposición		X ²	P
		Sí	No		
HCB	Sí	20	105	0.058	0.810
	No	30	146		
Lindano	Sí	42	183	2.718	0.099
	No	8	68		
Mirex	Sí	14	60	0.377	0.539
	No	36	191		
Metoxicloro	Sí	17	75	0.333	0.564
	No	33	176		

HCB= Hexaclorobenceno.

En cuanto a la percepción de la exposición, había una asociación estadísticamente significativa entre esta variable y los niveles de lindano (ng/g lípido) y una tendencia a la significación con el aldrín (Test de Mann-Whitney), siendo los niveles medios mayores en el tejido placentario de madres que afirmaron una exposición paterna a productos químicos.

Pesticidas	U	Percepción de exposición		P
		Medias(±DE)		
		Sí	No	
o,p´DDT: ng/g placenta	5936.000	1.12(3.22)	0.76(1.83)	0.520
	ng/g lípido	5825.000	78.08(395.49)	14.84(61.15)
p,p´DDT: ng/g placenta	5765.000	0.68(0.94)	1.59(4.98)	0.322
	ng/g lípido	5766.000	21.44(85.09)	53.08(285.33)
o,p´DDD: ng/g placenta	6025.500	1.44(2.26)	2.26(4.91)	0.633
	ng/g lípido	6158.500	69.86(231.17)	73.43(181.01)
p,p´DDE: ng/g placenta	5565.000	3.60(8.72)	3.30(6.01)	0.206
	ng/g lípido	6036.500	117.27(223.72)	100.56(186.37)
ΣDDTs: ng/g placenta	5441.500	6.27(9.98)	7.30(9.92)	0.138
	ng/g lípido	5741.000	284.93(672.99)	285.91(400.07)

Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

Pesticidas	U	Percepción de exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
E-I:	ng/g placenta	6018.000	1.16(4.27)	0.73(1.65)	0.804
	ng/g lípido	6251.000	29.25(69.24)	22.08(67.12)	0.964
E-II:	ng/g placenta	5920.000	0.79(0.97)	1.09(3.36)	0.435
	ng/g lípido	5971.000	7.37(23.62)	15.07(78.16)	0.505
E-éter:	ng/g placenta	6228.500	0.26(0.68)	0.18(0.32)	0.930
	ng/g lípido	6115.500	13.73(42.02)	5.55(17.24)	0.763
E-lactona	ng/g placenta	6028.000	1.74(5.72)	1.14(4.25)	0.610
	ng/g lípido	5859.000	105.43(419.92)	30.52(112.76)	0.384
E-diol:	ng/g placenta	3746.500	4.46(3.82)	4.41(5.71)	0.241
	ng/g lípido	3609.000	256.02(511.38)	141.79(237.70)	0.131
E-sulfato:	ng/g placenta	5936.000	1.60(5.06)	0.79(1.35)	0.520
	ng/g lípido	5825.000	54.89(183.93)	27.91(69.24)	0.393
ΣEndos :	ng/g placenta	5551.500	9.27(11.44)	7.57(11.85)	0.198
	ng/g lípido	5670.000	471.20(887.54)	245.96(383.95)	0.282

E=Endosulfán. Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

Pesticidas	U	Percepción de exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
Aldrín:	ng/g placenta	5449.500	0.70(0.99)	0.45(0.71)	0.062⁺
	ng/g lípido	5454.000	22.15(65.88)	5.04(18.68)	0.064⁺
Endrín:	ng/g placenta	5726.000	2.33(8.24)	1.64(2.13)	0.245
	ng/g lípido	5647.500	34.94(108.56)	26.23(77.70)	0.187
Dieldrín :	ng/g placenta	5640.000	0.71(1.47)	0.48(0.92)	0.108
	ng/g lípido	5627.000	19.33(54.08)	8.60(33.43)	0.101

Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

Pesticidas	U	Percepción de exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
HCB:	ng/g placenta	6210.000	1.30(4.34)	0.82(1.83)	0.897
	ng/g lípido	6150.000	93.85(523.48)	22.10(84.74)	0.803
Lindano:	ng/g placenta	5161.000	0.58(0.95)	0.41(0.50)	0.042*
	ng/g lípido	5277.000	20.39(43.80)	11.42(29.08)	0.070⁺
Mirex:	ng/g placenta	6127.000	0.42(0.34)	0.67(1.95)	0.727
	ng/g lípido	6197.500	14.71(63.59)	16.63(71.96)	0.859
Metoxicloro:	ng/gplacenta	5955.000	1.03(2.49)	0.73(1.77)	0.482
	ng/g lípido	5881.000	26.26(74.04)	16.90(77.75)	0.386

HCB=Hexaclorobenceno. Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

II.- Relación entre actividad laboral del padre y el número de pesticidas por muestra

Al relacionar la variable actividad laboral con el número de pesticidas por muestra, no apareció asociación estadística entre estas dos variables, pero aún así, el número medio de pesticidas en el tejido placentario de madres cuyos maridos se dedicaban a trabajos agrícolas era mayor que para el resto de categorías (Test ANOVA de un factor).

Variable	F	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
Número de pesticidas	2.146	T.Manual	Agricultura	Otros	0.119
				7.85(2.94)	

Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

Tampoco se encontró una asociación estadísticamente significativa al relacionar la variable percepción de la exposición a productos químicos con el número de pesticidas por muestra (Prueba de Levene).

Variable	F	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
Número de pesticidas	0.389	7.92(2.78)	7.54(2.99)	0.533

Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

III.- Relación entre actividad laboral del padre y TEXB de la fracción alfa y beta

La presencia/ausencia de TEXB de la fracción beta en el tejido placentario, estaba estadísticamente relacionada con el tipo de trabajo que realizaba el padre y no existía asociación con la TEXB de la fracción alfa. El 77.27% y el 100% de los padres que trabajaban en agricultura, tenían parejas con un nivel medible de TEXB en el tejido placentario de la fracción alfa y beta, respectivamente.

TEXB	\geq LC	Actividad laboral			χ^2	P
		T.Manual	Agricultura	Otros		
Alfa	Sí	92	17	108	0.785	0.675
	No	35	5	48		
Beta	Sí	101	22	135	6.959	0.031*
	No	26	0	21		

TEXB=Carga estrógena total efectiva.

No aparecieron asociaciones estadísticas entre los niveles de TEXB de ambas fracciones y el tipo de trabajo desarrollado por el padre (Test de Kruskal-Wallis), aún así se observó unos valores medios de TEXB de la fracción alfa, mayores en tejidos placentarios de madres cuyas parejas se dedicaban a actividades diferentes al trabajo manual o agricultura y valores medios mayores de beta para el grupo de los que desarrollaban algún tipo de trabajo manual.

TEXB	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		T.Manual	Agricultura	Otros	
Alfa:EeqpM/					
g placenta	0.142	3.84(11.31)	3.01(5.46)	4.83(11.39)	0.931
g lípido	0.343	152.75(292.62)	139.18(271.90)	207.67(503.07)	0.842
Beta:EeqpM/					
g placenta	0.619	25.52(89.15)	14.26(21.29)	17.82(37.62)	0.734
g lípido	0.455	1145.86(2366.98)	1431.80(3719.12)	1019.63(2433.26)	0.796

TEXB= Carga estrogénica total efectiva. Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

Al enfrentar la variable dicotómica presencia/ausencia de estrogénicidad a la variable dicotómica percepción de la exposición sí/no a productos químicos, no se vio ninguna significación estadística entre ambas variables (Tablas de contingencia).

TEXB	\geq LC	Percepción de exposición		χ^2	P
		Sí	No		
Alfa	Sí	33	184	0.411	0.522
	No	16	72		
Beta	Sí	38	220	2.219	0.136
	No	11	36		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según el test de Mann-Whitney, no existía una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa o fracción beta y

la percepción que las madres tenían de la exposición de sus parejas a productos químicos.

TEXB	U	Percepción de exposición		P	
		Medias(\pm DE)			
		Sí	No		
Alfa:EeqpM/					
g placenta	5488.000	2.61(4.53)	4.60(11.83)	0.711	
g lípido	5440.000	129.30(245.27)	189.86(438.48)	0.489	
Beta:EeqpM/					
g placenta	5327.500	12.95(31.70)	22.24(67.71)	0.262	
g lípido	5162.000	1227.28(3441.57)	1076.61(2291.02)	0.152	

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

IV.- Relación entre actividad laboral del padre y otras variables de la encuesta

La edad del padre estaba estadísticamente asociada con el tipo de trabajo, teniendo mayores edades aquellos padres que trabajaban en la agricultura (Test ANOVA de un factor).

Variables	F	Actividad laboral			P	
		Medias(\pm DE)				
		T.Manual	Agricultura	Otros		
Edad padre(años)	3.371	33.60(5.66)	36.18(6.65)	35.16(5.85)	0.036*	
Peso (g)	0.275	3286.31(452.70)	3295.00(402.34)	3326.72(458.73)	0.759	
IP niño (g/cm ³)	1.396	25.09(3.89)	24.43(2.48)	26.22(4.53)	0.258	
P. cefálico(cm)	0.812	34.63(1.19)	34.56(1.35)	34.93(1.35)	0.447	

Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

No existía una asociación estadísticamente significativa entre las semanas de gestación y el tipo de trabajo desarrollado, pero, los valores medios eran menores en niños de padres agricultores (Test de Kruskal-Wallis).

Variable	χ^2	Actividad laboral			P
		Medias(\pm DE)			
		T.Manual	Agricultura	Otros	
Sem. gestación	2.777	39.51(0.13)	38.53(2.42)	39.39(1.48)	0.249

Trabajo tipo manual N=124, trabajo en agricultura N=22 y otro tipo de trabajo N=159.

No se halló asociación estadísticamente significativa entre la percepción de la exposición y las variables estudiadas (Prueba de Levene).

Variables	F	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
Edad del padre (años)	0.126	34.86 (5.87)	34.54(5.89)	0.723
Peso del niño (g)	0.061	3287.83(484.26)	3311.90(446.59)	0.805
Índice ponderal(g/cm ³)	0.350	23.56(4.17)	23.49(4.16)	0.554
P. cefálico (cm)	0.990	34.66(1.49)	34.82(1.26)	0.322

Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la percepción de la exposición a productos químicos que las madres tenían de sus parejas, y las semanas de gestación con las que nacieron los niños (Test de Mann-Whitney).

Variables	U	Percepción de exposición		P
		Medias(\pm DE)		
		Sí	No	
Sem. gestación	5016.000	39.35(1.88)	39.39(1.42)	0.867

Exposición a productos químicos N=51 y no exposición N=256.

4.5.3. CARACTERÍSTICAS DEL NIÑO

4.5.3.1. Peso al nacer

Es sabida la existencia de una relación directa entre, por ejemplo, el consumo de drogas y tabaco durante el embarazo y bajo peso al nacer. Pero cada vez más, son los estudios que han empezado a probar que otros factores medioambientales, como la exposición intrauterina a determinadas sustancias químicas, puede jugar un importante papel también, como ya se ha dicho con anterioridad. Para determinar las correlaciones existentes entre los niveles de los diferentes pesticidas organoclorados y el peso al nacer del niño, se utilizó el test de Spearman, test también utilizado para ver las asociaciones entre los niveles de estrogenicidad de la fracción alfa (sustancias halogenadas) y beta (no halogenadas) y el peso del niño cuando fueron consideradas todas ellas como variables continuas. Además, el peso del niño se categorizó en dos grupos (según la OMS en pequeño peso <2500 g y peso normal \geq 2500 g) y se enfrentó a la variable ausencia/presencia de pesticidas/TEXB (Tablas de contingencia). Cuando la categorización del peso en dos grupos se mantuvo para ver si los niveles de pesticidas/TEXB de muestras de placenta en niños con un peso <2500g eran diferentes a los niveles en niños con un peso \geq 2500g, el test utilizado fue Mann-Whitney.

Para la variable, número de pesticidas, se aplicó el test de correlación de Pearson, para ver la posible asociación entre el número de pesticidas encontrados en las muestras de tejido placentario y el peso del niño.

Por último, se estudió mediante el Test de Pearson, la relación entre esta variable y el perímetro cefálico, peso e IP del niño (distribución normal), y

mediante el Test de Spearman, la relación con las semanas de gestación y tipo de parto (Test ANOVA de un factor).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre el peso del niño al nacer y pesticidas organoclorados

Como podemos ver en las tablas recogidas más abajo, el peso del niño estaba asociado significativamente con los niveles de endosulfán-diol (ng/g lípido). Los niveles de este pesticida eran mayores en niños con mayor peso (asociación positiva). Para el caso del p,p'DDE (ng/g placenta), la asociación era también prácticamente significativa, pero en este caso la asociación era negativa: los mayores niveles de este pesticida fueron encontrados en niños con menor peso.

Pesticidas	Peso del niño			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
o,p' DDT	0.087	0.140	0.109	0.064
p,p' DDT	-0.086	0.148	-0.065	0.273
o,p' DDD	-0.067	0.260	-0.059	0.320
p,p' DDE	-0.014	0.054⁺	-0.077	0.195
Σ DDE	-0.075	0.205	-0.012	0.834

Pesticidas	Peso del niño			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.008	0.889	0.026	0.664
E-II	-0.012	0.834	-0.008	0.891
E-éter	0.017	0.769	0.066	0.264
E-lactona	-0.034	0.562	-0.002	0.977
E-diol	0.126	0.052⁺	0.150	0.022*
E-sulfato	-0.057	0.339	-0.047	0.429
Σ Endos	-0.008	0.891	0.035	0.550

E=Endosulfán

Pesticidas	Peso del niño			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	0.087	0.141	0.093	0.115
Endrín	-0.026	0.657	-0.031	0.600
Dieldrín	0.029	0.625	0.033	0.583

Pesticidas	Peso del niño			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	-0.054	0.360	0.070	0.234
Lindano	0.009	0.877	0.038	0.522
Mirex	-0.064	0.278	-0.063	0.290
Metoxicloro	-0.079	0.185	-0.057	0.335

HCB=Hexaclorobenceno

Al aplicar las tablas de contingencia, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el peso del niño y la presencia/ausencia en el tejido placentario de o,p' DDT y lindano. Un 99.32% y 97.20% de los tejidos placentarios que tenían o,p' DDT y lindano, pertenecía a madres que tuvieron niños con un peso ≥ 2500 g. Además, del total de niños con un peso < 2500 g, el 9.09% y el 50%, poseían o,p' DDT y lindano, respectivamente, y de los niños con un peso ≥ 2500 g, un 53.45% y un 76%.

Pesticidas	\geq LC	Peso del niño		χ^2	P
		< 2500 g	≥ 2500 g		
o,p' DDT $\rho = -0.181$	Sí	1	147	10.783	0.001**
	No	11	128		
p,p' DDT $\rho = 0.018$	Sí	6	125	0.096	0.757
	No	6	150		
o,p' DDD $\rho = -0.028$	Sí	5	134	0.230	0.632
	No	7	141		
p,p' DDE $\rho = 0.059$	Sí	12	254	1.864	0.172
	No	0	21		
Σ DDTs $\rho = 0.033$	Sí	12	268	0.606	0.436
	No	0	7		

Pesticidas	≥LC	Peso del niño		χ^2	P
		<2500 g	≥2500 g		
E-I $\rho = -0.022$	Sí	6	152	0.139	0.709
	No	6	122		
E-II $\rho = 0.014$	Sí	4	83	0.053	0.818
	No	8	192		
E-éter $\rho = -0.073$	Sí	4	142	1.567	0.211
	No	8	133		
E-lactona $\rho = -0.007$	Sí	4	96	0.013	0.910
	No	8	179		
E-diol $\rho = 0.004$	Sí	7	141	0.004	0.948
	No	4	84		
E-sulfato $\rho = -0.041$	Sí	5	143	0.492	0.483
	No	7	132		
ΣEndos $\rho = -0.038$	Sí	11	263	0.343	0.558
	No	1	12		

E= Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Peso del niño		χ^2	P
		<2500 g	≥2500 g		
Aldrín $\rho = 0.027$	Sí	4	75	0.204	0.652
	No	8	200		
Endrín $\rho = -0.007$	Sí	4	96	0.013	0.910
	No	8	179		
Dieldrín $\rho = -0.059$	Sí	1	55	1.201	0.273
	No	11	220		

Pesticidas	≥LC	Peso del niño		χ ²	P
		<2500 g	≥2500 g		
HCB	Sí	6	114	0.345	0.557
	No	6	161		
Lindano	Sí	6	209	4.136	0.042*
	No	6	66		
Mirex	Sí	3	67	0.003	0.960
	No	9	208		
Metoxicloro	Sí	3	83	0.152	0.697
	No	9	192		

HCB= Hexaclorobenceno.

Según el test de Mann-Whitney, existía una asociación significativa entre el peso del niño y los niveles de o,p´DDT, así como una tendencia a una asociación significativa entre los niveles de endosulfán-éter y suma de endosulfanes. Para el caso del o,p´DDT y endosulfán-éter, los valores medios eran mayores en niños de ≥2500 g, mientras que para el caso de la suma de endosulfanes, los valores medios eran mayores en niños con un peso < 2500g.

Pesticidas	U	Peso del niño		P
		Medias±DE		
		<2500 g	≥2500 g	
o,p´DDT: ng/g placenta	910.500	0.25(0.10)	0.82(2.17)	0.001**
	864.500	0.27(0.07)	26.92(178.72)	
p,p´DDT: ng/g placenta	1680.500	0.65(0.64)	1.51(4.78)	0.627
	1593.500	8.74(20.52)	51.49(274.86)	0.827
o,p´DDD: ng/g placenta	1546.500	1.06(1.40)	2.19(4.76)	0.336
	1482.500	31.39(79.53)	66.53(197.35)	0.521
p,p´DDE: ng/g placenta	1784.500	2.30(1.74)	3.43(6.79)	0.922
	1597.000	103.73(162.43)	104.81(198.30)	0.850
ΣDDTs: ng/g placenta	1424.500	3.71(2.56)	7.36(10.31)	0.191
	1433.000	151.80(188.38)	252.56(473.91)	0.441

Niños con peso <2500g N=12 y niños con peso ≥2500g N=280.

Pesticidas	U	Peso del niño		P	
		Medias±DE			
		<2500 g	≥2500 g		
E-I:	ng/g placenta	1561.500	0.38(0.47)	0.83(2.37)	0.377
	ng/g lípido	1458.000	13.69(37.20)	24.25(69.82)	0.474
E-II:	ng/g placenta	1778.000	0.77(0.45)	1.04(3.21)	0.884
	ng/g lípido	1572.000	12.91(36.45)	13.55(74.21)	0.732
E-éter:	ng/g placenta	1295.000	0.08(0.06)	0.19(0.39)	0.064⁺
	ng/g lípido	1164.000	0.48(1.08)	7.11(23.80)	0.066⁺
E-lactona:	ng/g placenta	1759.500	0.26(0.35)	1.29(4.69)	0.834
	ng/g lípido	1549.500	5.75(10.98)	45.41(209.07)	0.675
E-diol:	ng/g placenta	1773.000	3.17(3.69)	4.57(5.57)	0.890
	ng/g lípido	1136.000	96.12(149.55)	168.12(313.60)	0.638
E-sulfato:	ng/g placenta	1415.500	0.34(0.42)	0.98(2.54)	0.157
	ng/g lípido	1435.500	26.81(63.11)	32.77(100.44)	0.420
ΣEndos :	ng/g placenta	1296.000	4.52(5.33)	8.12(12.18)	0.082⁺
	ng/g lípido	1349.000	165.52(260.13)	294.05(526.99)	0.285

E=Endosulfán. Niños con peso <2500g N=12 y niños con peso ≥2500g N=280.

Pesticidas	U	Peso del niño		P	
		Medias±DE			
		<2500 g	≥2500 g		
Aldrín:	ng/g placenta	1784.500	0.73(1.21)	0.49(0.76)	0.903
	ng/g lípido	1505.000	30.81(92.70)	7.18(27.69)	0.512
Endrín:	ng/g placenta	1618.500	1.14(0.71)	1.79(4.02)	0.443
	ng/g lípido	1595.500	19.80(65.28)	28.25(85.60)	0.820
Dieldrín:	ng/gplacenta	1528.000	0.43(0.62)	0.48(0.90)	0.177
	ng/g lípido	1482.000	14.80(50.39)	9.24(36.19)	0.388

Niños con peso <2500g N=12 y niños con peso ≥2500g N=280.

Pesticidas	U	Peso del niño		P	
		Medias±DE			
		<2500 g	≥2500 g		
HCB:	ng/g placenta	1806.000	0.52(0.43)	0.92(2.51)	0.978
	ng/g lípido	1567.000	13.19(36.54)	35.75(237.05)	0.742
Lindano:	ng/g placenta	1356.000	0.27(0.19)	0.44(0.51)	0.115
	ng/g lípido	1223.000	3.41(4.90)	13.35(33.01)	0.121
Mirex:	ng/g placenta	1729.500	2.20(6.35)	0.56(1.32)	0.713
	ng/g lípido	1640.000	28.43(90.90)	15.28(70.20)	0.963
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1618.500	0.78(1.58)	0.76(1.88)	0.423
	Ng/g lípido	1566.500	35.79(120.61)	17.09(74.94)	0.713

Niños con peso <2500g N=12 y niños con peso ≥2500g N=280.

II.- Relación entre el peso del niño y el número de pesticidas por muestra

No existía una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas encontrados en las muestras de tejido placentario y el peso del niño (Test de Pearson).

Variable	Peso del niño	
	r	P
Número de pesticidas	-0.047	0.428

III.- Relación entre el peso del niño y la TEXTB de la fracción alfa y beta

La TEXTB de la fracción alfa y beta, no estaba relacionada con el peso del niño (Test de Spearman).

TEXB	Peso del niño			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Alfa	0.021	0.722	0.042	0.479
Beta	-0.007	0.913	0.004	0.948

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa y el peso del niño. La mayoría de los niños con un peso ≥ 2500 g, presentaban estrogenicidad positiva en la fracción alfa de su tejido placentario.

TEXB	$\geq LC$	Peso del niño		χ^2	P
		<2500g	≥ 2500 g		
Alfa $\rho = -0.190$	Sí	4	202	9.344	0.002**
	No	8	76		
Beta $\rho = 0.046$	Sí	11	234	0.742	0.389
	No	1	44		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según el test de Mann-Whitney, existía una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción alfa y el peso del niño, teniendo valores medios mayores de TEXB los niños con un peso igual o superior a 2500 g.

TEXB	U	Peso del niño		P
		Medias(\pm DE)		
		<2500 g	\geq 2500 g	
Alfa:EeqpM/				
g placenta	1105.500	1.13(2.52)	4.53(11.45)	0.061⁺
g lípido	872.50	25.10(66.68)	191.89(429.22)	0.006^{**}
Beta:EeqpM/				
g placenta	1496.00	14.71(24.07)	20.88(65.45)	0.728
g lípido	1458.00	799.24(1066.21)	1117.22 (2607.44)	0.626

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Niños con peso <2500g N=12 y niños con peso \geq 2500g N=279.

IV.- Relación entre el peso del niño y otras variables de la encuesta

Como era de esperar, el perímetro cefálico estaba correlacionado con el peso e índice ponderal del niño (Test de Pearson), así como con las semanas de gestación (Test de Spearman).

Variables	Peso del niño	
	r	P
Perímetro cefálico	0.613	<0.001 ^{**}
IP niño	0.365	<0.001 ^{**}

Variables	Peso del niño	
	p	P
Semanas gestación	0.354	<0.001 ^{**}

Según la prueba de Levene, no existía una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de parto y el peso del niño.

Variables	F	Tipo de parto			P
		Medias(\pm DE)			
Peso del niño (gramos)	0.192	Espontáneo	Cesárea	Instrumental	0.826
			7.57(3.16)	7.45(2.71)	

Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

4.5.3.2. Índice ponderal

La exposición transplacentaria a contaminantes químicos puede estar relacionada con el índice ponderal con el que nacen los niños, por eso, se ha estudiado la influencia de los niveles de pesticidas/TEXB en el índice ponderal (IP) del recién nacido, mediante el test de Spearman, cuando ambas variables se consideraron como continuas, y mediante el test de Mann-Whitney, cuando la variable IP se recodificó en dos categorías (<25 ó ≥ 25 g/cm³). También, se enfrentó la variable presencia/ausencia de pesticidas/TEXB a la variable IP categorizada en los dos grupos anteriormente descritos (Tablas de contingencia).

Además, con objeto de analizar la influencia del número de pesticidas organoclorados por placenta en el IP, se utilizó la Prueba de Levene.

Por último, se aplicó el test de correlación Spearman, para estudiar la relación entre el IP y perímetro cefálico, y las tablas de contingencia, para ver las posibles asociaciones estadísticas entre IP, tipo de parto y semanas de gestación.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre el índice ponderal al nacer y pesticidas organoclorados

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de endosulfán-lactona y el IP del niño, con niveles mayores de este pesticida en

niños con menor IP. Además, existía una tendencia a la asociación estadística ente los niveles de endosulfán-éter y el IP, pero en este caso la asociación era positiva (a mayores niveles del pesticida, mayores IP en los niños).

Pesticidas	Índice ponderal			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
o,p' DDT	-0.001	0.987	-0.003	0.973
p,p' DDT	0.028	0.756	0.061	0.505
o,p' DDD	-0.096	0.291	-0.111	0.222
p,p' DDE	-0.043	0.635	0.019	0.833
ΣDDE	-0.059	0.514	-0.009	0.926

Pesticidas	Índice ponderal			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.027	0.769	0.127	0.196
E-II	-0.071	0.435	-0.131	0.148
E-éter	0.142	0.115	0.151	0.096⁺
E-lactona	-0.043	0.638	-0.196	0.030*
E-diol	0.095	0.295	0.127	0.196
E-sulfato	-0.053	0.558	-0.048	0.596
ΣEndos	-0.038	0.675	-0.036	0.695

E=Endosulfán.

Pesticidas	Índice ponderal			
	P		ρ	
	ng/g placenta	ng/g lípido	ng/g placenta	ng/g lípido
Aldrín	0.062	0.495	0.067	0.463
Endrín	-0.024	0.790	-0.045	0.624
Dieldrín	0.023	0.799	0.033	0.716

Pesticidas	Índice ponderal			
	ρ		P	
	ng/g placenta	ng/g lípido	ng/g placenta	ng/g lípido
HCB	-0.027	0.764	-0.014	0.875
Lindano	-0.024	0.794	-0.050	0.583
Mirex	-0.026	0.788	-0.055	0.542
Metoxicloro	-0.036	0.692	-0.033	0.715

HCB=Hexaclorobenceno.

Al construir las tablas de contingencia, se halló una asociación estadísticamente significativa entre el índice ponderal como variable discontinua (<25 ó ≥ 25 g/cm³) y la presencia/ausencia de endosulfán-lactona y una tendencia a la significación estadística para el o,p´DDD. Del total de madres con o,p´DDD y endosulfán-lactona en su tejido placentario, un 51.74% y un 58.97%, respectivamente, tuvo niños con un IP <25 g/cm³. Además, del total de niños con un IP <25 g/cm³, en un 55.56% y en un 42.59%, se detectó o,p´DDD y endosulfán-lactona en el tejido placentario. Y del total de niños con un IP ≥ 25 g/cm³, un 40% y un 22.86% tenían o,p´DDD y endosulfán-lactona.

Pesticidas	≥LC	Índice ponderal		χ^2	P
		<25 g/cm ³	≥25 g/cm ³		
o,p' DDT	Sí	29	38	0.004	0.949
$\rho = -0.006$	No	25	32		
p,p' DDT	Sí	29	33	0.525	0.469
$\rho = 0.065$	No	25	37		
o,p' DDD	Sí	30	28	2.963	0.085⁺
$\rho = 0.155$	No	24	42		
p,p' DDE	Sí	46	65	1.912	0.167
$\rho = -0.124$	No	8	5		
ΣDDTs	Sí	51	68	0.574	0.449
$\rho = -0.068$	No	3	2		

Pesticida	≥LC	Índice ponderal		χ^2	P
		<25 g/cm ³	≥25 g/cm ³		
E-I	Sí	32	32	2.014	0.156
$\rho = 0.128$	No	22	37		
E-II	Sí	16	14	1.541	0.214
$\rho = 0.111$	No	38	56		
E-éter	Sí	23	36	0.954	0.329
$\rho = -0.088$	No	31	34		
E-lactona	Sí	23	16	5.507	0.019*
$\rho = 0.211$	No	31	54		
E-diol	Sí	31	38	0.134	0.714
$\rho = -0.036$	No	18	19		
E-sulfato	Sí	29	33	0.525	0.469
$\rho = 0.065$	No	25	37		
ΣEndos	Sí	51	67	0.106	0.745
$\rho = -0.029$	No	3	3		

E= Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Índice ponderal		χ^2	P
		<25 g/cm ³	≥25 g/cm ³		
Aldrín	Sí	13	19	0.150	0.699
	No	41	51		
Endrín	Sí	19	25	0.004	0.951
	No	35	45		
Dieldrín	Sí	10	11	0.170	0.680
	No	44	59		

Pesticidas	≥LC	Índice ponderal		χ^2	P
		<25 g/cm ³	≥25 g/cm ³		
HCB	Sí	19	25	0.004	0.951
	No	35	45		
Lindano	Sí	38	52	0.235	0.628
	No	16	18		
Mirex	Sí	13	17	0.001	0.978
	No	41	53		
Metoxicloro	Sí	15	19	0.006	0.937
	No	39	51		

HCB= Hexaclorobenceno.

Según el test de Mann-Whitney, había una asociación estadísticamente significativa entre el IP y los niveles de endosulfán-lactona y además, existía una tendencia a una asociación entre el pesticida endosulfán-I y el IP, con concentraciones mayores de ambos pesticidas en mujeres con bebés con un IP<25g/cm³.

Pesticidas	U	IP		P
		Medias(\pm DE)		
		<25 g/cm ³	\geq 25 g/cm ³	
o,p´DDT: ng/g placenta	1752.000	1.00(3.61)	1.08(2.82)	0.384
	ng/g lípido	1679.000	21.79(118.62)	57.88(334.41)
p,p´DDT: ng/g placenta	1715.500	1.16(1.73)	1.95(7.53)	0.283
	ng/g lípido	1821.000	23.71(61.04)	102.12(516.52)
o,p´DDD: ng/g placenta	1645.000	3.39(7.23)	2.39(5.26)	0.142
	ng/g lípido	1667.000	108.15(324.47)	84.08(229.97)
p,p´DDE: ng/g placenta	1797.000	2.91(6.26)	2.44(2.62)	0.549
	ng/g lípido	1667.000	87.46(197.52)	91.76(148.62)
Σ DDTs: ng/g placenta	1834.500	7.89(10.88)	7.15(11.35)	0.681
	ng/g lípido	1884.500	252.21(407.64)	329.30(742.28)

IP niño >25g/cm³ N=54 e IP niño \geq 25g/cm³ N=71.

Pesticidas	U	IP		P	
		Medias(\pm DE)			
		<25 g/cm ³	\geq 25 g/cm ³		
E-I:	ng/g placenta	1598.000	0.77(1.58)	0.68(1.60)	0.092⁺
	ng/g lípido	1668.000	23.33(59.13)	20.26(53.93)	0.233
E-II:	ng/g placenta	1715.500	0.75(0.54)	0.95(2.13)	0.184
	ng/g lípido	1715.000	9.55(31.63)	11.22(50.76)	0.239
E-éter:	ng/g placenta	1721.500	0.12(0.14)	0.17(0.23)	0.293
	ng/g lípido	1645.000	3.45(7.87)	5.83(10.93)	0.185
E-lactona:ng/g placenta	1518.000	2.34(6.83)	1.32(4.65)	0.016*	
	ng/g lípido	1521.000	70.70(218.47)	65.72(338.80)	0.024*
E-diol:	ng/g placenta	1896.500	3.34(4.13)	4.47(6.66)	0.917
	ng/g lípido	1176.500	100.37(145.80)	203.50(310.57)	0.154
E-sulfato: ng/g placenta	1811.500	0.77(1.14)	0.74(1.18)	0.574	
	ng/g lípido	1832.000	23.16(44.84)	27.15(78.41)	0.756
Σ Endos : ng/g placenta	1832.500	8.23(10.44)	8.41(11.83)	0.674	
	ng/g lípido	1837.000	250.91(368.90)	330.89(613.11)	0.789

E=Endosulfán. IP niño >25g/cm³ N=54 e IP niño \geq 25g/cm³ N=71.

Pesticidas		U	IP		P
			Medias(\pm DE)		
			<25 g/cm ³	\geq 25 g/cm ³	
Aldrín:	ng/g placenta	1879.500	0.39(0.48)	0.45(0.67)	0.808
	ng/g lípido	1824.500	3.44(16.71)	3.82(15.46)	0.666
Endrín:	ng/g placenta	1913.500	1.61(2.54)	1.52(1.70)	0.984
	ng/g lípido	1873.500	34.28(107.43)	34.02(92.40)	0.923
Dieldrín :	ng/g placenta	1848.000	0.48(1.01)	0.48(1.14)	0.604
	ng/g lípido	1857.500	9.87(43.12)	11.83(42.48)	0.802

IP niño >25g/cm³ N=54 e IP niño \geq 25g/cm³ N=71.

Pesticidas		U	IP		P
			Medias(\pm DE)		
			<25 g/cm ³	\geq 25 g/cm ³	
HCB:	ng/g placenta	1900.500	0.75(1.36)	1.20(3.94)	0.923
	ng/g lípido	1881.500	20.99(68.68)	80.73(454.41)	0.960
Lindano:	ng/g placenta	1844.000	0.44(0.61)	0.37(0.39)	0.706
	ng/g lípido	1820.500	12.50(29.76)	11.42(29.49)	0.720
Mirex:	ng/g placenta	1914.500	0.40(0.35)	0.80(2.40)	0.987
	ng/g lípido	1888.500	5.03(14.28)	28.59(119.34)	0.992
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1885.500	0.56(0.81)	0.83(2.70)	0.843
	ng/g lípido	1881.500	9.74(33.27)	29.59(132.10)	0.957

HCB=Hexaclorobenceno. IP niño >25g/cm³ N=54 e IP niño \geq 25g/cm³ N=71.

II.- Relación entre el índice ponderal y el número de pesticidas por muestra

El IP no estaba asociado con el número de pesticidas (Test de Pearson).

Variable	Índice ponderal	
	r	P
Número de pesticidas	-0.072	0.431

III.- Relación entre el índice ponderal y la TEXB de la fracción alfa y beta

La TEXB de la fracción alfa y beta, no estaba relacionada estadísticamente de forma significativa con el índice ponderal (Test de correlación de Spearman).

TEXB	Índice ponderal			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	P	ρ	P
Alfa	-0.034	0.709	-0.029	0.750
Beta	-0.022	0.807	0.016	0.861

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según las tablas de contingencia, apareció una asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de la fracción beta y el índice ponderal. Una mayor proporción de las madres con un nivel detectable de TEXB en la fracción beta de su tejido placentario, tuvieron niños con un IP $\geq 25 \text{g/cm}^3$. No existía asociación para el caso de la fracción alfa, aún así, como en el caso de la fracción beta, mayor número de madres con TEXB en esta fracción tuvo niños con un IP $\geq 25 \text{g/cm}^3$

TEXB	$\geq \text{LC}$	Índice ponderal		χ^2	P
		$< 25 \text{g/cm}^3$	$\geq 25 \text{g/cm}^3$		
Alfa $\rho = -0.075$	Sí	35	51	0.703	0.402
	No	19	20		
Beta $\rho = -0.223$	Sí	39	64	6.719	0.009**
	No	15	7		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el IP y la TEXB de la fracción beta, con mayores valores medios para niños con mayor IP. Para el caso de la fracción alfa, no existe asociación, pero, como se puede observar, los valores medios de TEXB de esta fracción, son mayores entre niños con un IP mayor.

TEXB	U	Índice ponderal		P
		Medias(\pm DE)		
		<25g/cm ³	\geq 25g/cm ³	
Alfa:				
EeqpM/g placenta	1683.000	3.91(8.56)	5.05(12.04)	0.555
EeqpM/g lípido	1648.000	180.12(479.00)	195.26(377.31)	0.437
Beta:				
EeqpM/g placenta	1185.500	12.75(33.51)	18.10(32.39)	0.003**
EeqpM/g lípido	1165.000	584.45(1467.73)	1335.64(2532.32)	0.002**

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. IP niño >25g/cm³ N=54 e IP niño \geq 25g/cm³ N=71.

IV.- Relación entre el índice ponderal y otras variables de la encuesta

Según el test de correlación de Spearman, existía una asociación estadísticamente significativa entre el IP y el perímetro cefálico, con mayores IP en niños con mayores perímetros cefálicos.

	Índice ponderal	
	ρ	P
Perímetro cefálico	0.288	0.003**

Según las tablas de contingencia, no existía ninguna asociación estadística entre el índice ponderal y las semanas de gestación o tipo de parto, pero se observó que, un 59.70% de los niños nacidos con más de 39 semanas, y un 59.09% de los niños nacidos de forma espontánea, tenían un IP $\geq 25 \text{g/cm}^3$.

Variable	Categorías	Índice ponderal		χ^2	P
		$<25 \text{g/cm}^3$	$\geq 25 \text{g/cm}^3$		
Semanas gestación $\rho=0.044$	32-37 sem.	3	5	0.962	0.618
	>37-39 sem.	23	24		
	>39 sem.	27	40		
Tipo de parto $\rho=-0.077$	Espontáneo	36	52	0.825	0.662
	Cesárea	7	7		
	Instrumental	10	10		

4.5.3.3. Perímetro cefálico

En este apartado se ha estudiado si la exposición transplacentaria a contaminantes químicos puede influir en el perímetro cefálico del niño. En este estudio, el test de correlación de Spearman se utilizó para determinar la relación existente entre el perímetro cefálico y los niveles de pesticidas, así como los niveles de TEXB de la fracción alfa y beta, con objeto de describir la influencia de los niveles de estos compuestos en el perímetro cefálico. Las tablas de contingencia se utilizaron cuando se consideró el perímetro cefálico y los niveles de pesticidas/estrogenicidad como variables cuantitativas categóricas (Perímetro <35 ó $\geq 35 \text{cm}$; presencia/ausencia de pesticidas/TEXB), para ver si el perímetro cefálico por encima o por debajo de 35 estaba correlacionado en la detección o no en el tejido placentario de pesticidas o de TEXB. Además, se utilizó el test Mann-Whitney para relacionar la variable perímetro cefálico dividida en estos dos

grupos (<35 ó ≥35cm) con los niveles de pesticidas/TEXB encontrados en las placentas, considerados como variables continuas.

Para ver la posible asociación entre el número de pesticidas encontrados en las muestras de tejido placentario y el perímetro cefálico de la madre justo antes de quedarse embarazada, se utilizó el test de Pearson.

Además, se estudiaron las posibles asociaciones estadísticas entre la variable perímetro cefálico y otras variables de la encuesta tales como semanas de gestación y tipo de parto (Tablas de contingencia).

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre el perímetro torácico al nacer y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test de correlación de Spearman apareció una asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones de o,p´DDT y endosulfán-sulfato (ng/g placenta) y el perímetro cefálico. Para el primer pesticida, la asociación era positiva (a mayores niveles de o,p´DDT, mayor perímetro cefálico) y negativa para el segundo pesticida (a mayores niveles de endosulfán sulfato, menor perímetro cefálico).

Pesticidas	Perímetro cefálico			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	P	ρ	P
o,p´ DDT	0.243	0.011*	0.227	0.018*
p,p´ DDT	-0.064	0.510	0.003	0.974
o,p´ DDD	-0.144	0.137	-0.128	0.186
p,p´ DDE	-0.098	0.314	-0.059	0.541
ΣDDE	-0.114	0.240	-0.055	0.572

Pesticidas	Perímetro cefálico			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.139	0.152	0.120	0.218
E-II	-0.066	0.497	-0.044	0.652
E-éter	-0.123	0.204	-0.064	0.509
E-lactona	-0.148	0.126	-0.104	0.283
E-diol	0.083	0.393	0.061	0.570
E-sulfato	-0.203	0.036*	-0.069	0.480
Σ Endos	-0.050	0.606	-0.032	0.739

E=Endosulfán

Pesticidas	Perímetro cefálico			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	0.114	0.241	0.156	0.106
Endrín	-0.013	0.893	-0.023	0.816
Dieldrín	-0.076	0.434	-0.023	0.810

Pesticidas	Perímetro cefálico			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	0.038	0.700	0.020	0.840
Lindano	-0.020	0.833	-0.040	0.678
Mirex	0.027	0.783	0.020	0.838
Metoxicloro	0.016	0.870	-0.002	0.983

HCB=Hexaclorobenceno

Al construir las tablas de contingencia se halló una tendencia a la significación estadística entre la presencia/ausencia de mirex y el perímetro cefálico <35 ó ≥35cm. Del total de madres con este pesticida en el tejido placentario, un 70.83% tenían un perímetro cefálico ≥35cm. Además, del total de madres con un niño con perímetro cefálico <35cm, en un 14.29% se detectó mirex, y de las que tuvieron bebés con perímetro cefálico ≥35cm, un 34.69% tenían este pesticida en la placenta.

Pesticidas	≥LC	Perímetro cefálico		χ^2	P
		<35cm	≥35cm		
o,p' DDT $\rho = -0.107$	Sí	23	34	1.227	0.268
	No	26	25		
p,p' DDT $\rho = -0.059$	Sí	22	30	0.380	0.538
	No	27	29		
o,p' DDD $\rho = -0.063$	Sí	21	29	0.427	0.514
	No	28	30		
p,p' DDE $\rho = -0.120$	Sí	41	54	1.559	0.212
	No	8	5		
ΣDDTs $\rho = -0.065$	Sí	46	57	0.451	0.501
	No	3	2		

Pesticida	≥LC	Perímetro cefálico		χ^2	P
		<35cm	≥35cm		
E-I	Sí	26	29	0.100	0.752
	No	23	29		
E-II	Sí	11	17	0.565	0.452
	No	38	42		
E-éter	Sí	26	24	1.651	0.199
	No	23	35		
E-lactona	Sí	17	14	1.573	0.210
	No	32	45		
E-diol	Sí	22	33	2.526	0.112
	No	20	15		
E-sulfato	Sí	28	29	0.686	0.408
	No	21	30		
ΣEndos	Sí	47	56	0.062	0.804
	No	2	3		

E= Endosulfán

Pesticidas	≥LC	Perímetro cefálico		χ^2	P
		<35cm	≥35cm		
Aldrín	Sí	12	17	0.255	0.614
	No	37	42		
Endrín	Sí	14	24	1.720	0.190
	No	35	35		
Dieldrín	Sí	7	10	0.143	0.705
	No	42	49		

Pesticidas	≥LC	Perímetro cefálico		X ²	P
		<35cm	≥35cm		
HCB ρ= 0.069	Sí	19	19	0.507	0.476
	No	30	40		
Lindano ρ= 0.057	Sí	35	39	0.352	0.553
	No	14	20		
Mirex ρ= -0.174	Sí	7	17	3.269	0.071⁺
	No	42	42		
Metoxicloro ρ= 0.055	Sí	14	14	0.327	0.568
	No	35	45		

HCB= Hexaclorobenceno.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el perímetro cefálico del niño al nacer y las concentraciones de endosulfán-lactona (ng/g placenta), con niveles medios mayores en niños con un perímetro cefálico inferior a 35cm. Además, existía una tendencia a una asociación estadística entre esta variable y las concentraciones de endosulfán-éter (ng/g placenta) y endosulfán-diol (ng/g lípido), encontrando niveles medios mayores en niños con perímetro <35cm para el caso del endosulfán-éter y ≥35cm para el endosulfán-diol.

Pesticidas	U	Perímetro cefálico		P
		Medias(±DE)		
		<35cm	≥35cm	
o,p´DDT: ng/g placenta	1166.500	0.50(0.59)	1.10(3.32)	0.190
	ng/g lípido	1168.000	14.27(47.25)	24.22(107.08)
p,p´DDT: ng/g placenta	1344.500	1.77(5.16)	2.14(7.74)	0.915
	ng/g lípido	1358.500	23.66(71.13)	91.43(511.48)
o,p´DDD: ng/g placenta	1351.500	3.91(8.31)	2.45(5.17)	0.953
	ng/g lípido	1331.500	142.91(376.91)	57.85(129.13)
p,p´DDE: ng/g placenta	1162.000	4.69(11.94)	2.75(3.41)	0.207
	ng/g lípido	1106.500	129.56(334.50)	93.45(164.35)
ΣDDTs: ng/g placenta	1346.000	10.27(15.29)	7.74(11.35)	0.929
	ng/g lípido	1230.000	317.52(535.09)	266.31(546.71)

Perímetro cefálico niño <35cm N=40 y perímetro cefálico niño ≥35cm N=68.

Pesticidas	U	Perímetro cefálico		P
		Medias(±DE)		
		<35cm	≥35cm	
E-I: ng/g placenta	1341.000	0.51(0.85)	0.91(2.02)	0.898
	ng/g lípido	1336.000	15.67(45.15)	27.35(65.96)
E-II: ng/g placenta	1308.000	1.04(1.64)	0.93(1.97)	0.667
	ng/g lípido	1319.500	12.53(28.52)	10.19(25.05)
E-éter: ng/g placenta	1113.000	0.19(0.20)	0.15(0.22)	0.087⁺
	ng/g lípido	1167.000	4.58(6.49)	4.54(9.42)
E-lactona:ng/g placenta	1104.000	3.40(8.51)	0.79(2.90)	0.041*
	ng/g lípido	1120.000	81.89(233.12)	32.49(126.98)
E-diol: ng/g placenta	1166.000	2.48(3.53)	4.53(6.80)	0.208
	ng/g lípido	738.000	97.18(170.26)	164.48(266.13)
E-sulfato: ng/g placenta	1311.000	0.99(1.53)	0.79(1.09)	0.741
	ng/g lípido	1306.000	27.91(48.50)	20.50(50.61)
ΣEndos : ng/g placenta	1323.000	8.75(13.71)	8.14(10.28)	0.814
	ng/g lípido	1211.000	285.11(404.58)	271.50(428.19)

E=Endosulfán. Perímetro cefálico niño <35cm N=40 y perímetro cefálico niño ≥35cm N=68.

Pesticidas	U	Perímetro cefálico		P	
		Medias(\pm DE)			
		<35cm	\geq 35cm		
Aldrín:	ng/g placenta	1208.000	0.37(0.45)	0.49(0.72)	0.212
	ng/g lípido	1203.000	2.27(10.85)	5.26(19.80)	0.198
Endrín:	ng/g placenta	1356.500	2.17(3.40)	1.41(1.19)	0.979
	ng/g lípido	1340.000	57.98(148.47)	26.94(63.92)	0.882
Dieldrín :	ng/g placenta	1353.000	0.58(1.49)	0.46(0.92)	0.944
	ng/g lípido	1351.000	9.20(29.23)	8.77(38.95)	0.928

Perímetro cefálico niño <35cm N=40 y perímetro cefálico niño \geq 35cm N=68.

Pesticidas	U	Perímetro cefálico		P	
		Medias(\pm DE)			
		<35cm	\geq 35cm		
HCB:	ng/g placenta	1327.000	0.52(0.70)	0.88(1.81)	0.805
	ng/g lípido	1338.500	14.35(52.45)	32.32(123.34)	0.872
Lindano:	ng/g placenta	1121.500	0.42(0.49)	0.38(0.55)	0.112
	ng/g lípido	1135.000	15.22(36.80)	9.12(25.13)	0.140
Mirex:	ng/g placenta	1197.000	0.38(0.55)	0.82(2.43)	0.154
	ng/g lípido	1237.000	6.78(24.73)	28.14(120.34)	0.289
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1204.000	0.64(0.87)	0.84(2.77)	0.192
	ng/g lípido	1209.000	16.91(48.31)	26.69(132.40)	0.206

HCB=Hexaclorobenceno. Perímetro cefálico niño <35cm N=40 y perímetro cefálico niño \geq 35cm N=68.

II.- Relación entre el perímetro cefálico y el número de pesticidas por muestra

No apareció una asociación estadística entre el número de pesticidas por muestra y el perímetro cefálico (Test de Pearson).

Variable	Perímetro cefálico	
	r	P
Número de pesticidas	0.011	0.908

III.- Relación entre el perímetro cefálico y la TEXB de la fracción alfa y beta

La TEXB de la fracción alfa y beta, no estaba asociado significativamente con el perímetro cefálico del bebé (Test de correlación de Spearman).

TEXB	Perímetro cefálico			
	ng/g placenta		ng/g lípido	
	ρ	P	ρ	P
Alfa	0.127	0.192	0.149	0.123
Beta	0.045	0.643	0.037	0.845

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

No existía asociación estadística entre el perímetro cefálico y la TEXB de la fracción alfa y beta. Pero se observa que un 53.42% y un 55.06% de las mujeres con presencia de TEXB en alfa y beta, tuvieron niños con un perímetro cefálico ≥ 35 cm (Tablas de contingencia).

TEXB	\geq LC	Perímetro cefálico		χ^2	P
		<35cm	≥ 35 cm		
Alfa $\rho = 0.035$	Sí	34	39	0.132	0.716
	No	15	20		
Beta $\rho = -0.019$	Sí	40	49	0.037	0.847
	No	9	10		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al aplicar el test de Mann-Whitney, se encontró una tendencia a la asociación estadística entre la fracción beta expresada en Eeq pM/g placenta y el perímetro cefálico, con mayores niveles medios de TEXB en tejido placentario de madres con niños con un perímetro ≥ 35 cm.

TEXB	U	Perímetro cefálico		P
		Medias(\pm DE)		
		<35cm	≥ 35 cm	
Alfa:				
EeqpM/g placenta	1183.000	3.29(7.29)	4.72(11.89)	0.509
EeqpM/g lípido	1214.000	150.77(397.73)	198.10(454.70)	0.653
Beta:				
EeqpM/g placenta	971.000	9.45(20.38)	20.96(40.48)	0.089⁺
EeqpM/g lípido	998.500	739.30(1853.78)	1133.71(2375.50)	0.131

Perímetro cefálico niño <35cm N=40 y perímetro cefálico niño ≥ 35 cm N=68.

IV.- Relación entre el perímetro cefálico y otras variables de la encuesta

Según las tablas de contingencia, existía una asociación estadísticamente significativa entre el perímetro cefálico y las semanas de gestación. Los niños nacidos con una edad gestacional entre 32 y 37 semanas, tenían todos un perímetro cefálico <35cm, los nacidos con >37-39 semanas, se repartían más o menos en los dos grupos (56.52% tenían un perímetro ≥ 35 cm) y la mayoría de los nacidos con una edad gestacional superior a las 39 semanas, tenían un perímetro cefálico superior a los 35cm.

Variable	Categorías	P. cefálico		χ^2	P
		<35cm	≥35cm		
Semanas gestación $\rho=0.336$	32-37 sem.	6	0	16.411	>0.001**
	>37-39sem.	20	26		
	>39sem.	14	42		
Tipo de parto $\rho=0.171$	Espontáneo	32	46	3.845	0.146
	Cesárea	5	7		
	Instrumental	3	15		

4.5.3.4. Edad gestacional

Es sabido que el feto es muy vulnerable a la exposición a disruptores endocrinos durante su vida intrauterina, y que esta exposición puede estar relacionada con un nacimiento prematuro (nacimiento por lo menos dos semanas antes de lo esperado). Este estudio se ha centrado en ver si los niveles de compuestos químicos a los que ha estado expuesto el feto, pueden estar relacionados con las semanas de gestación del niño. Se estudió mediante la correlación de Spearman, la relación existente entre las semanas de gestación y los niveles de pesticidas, así como la relación entre la primera variable y los niveles de carga estrogénica, con objeto de describir la influencia de los niveles de compuestos organoclorados en tejido placentario en las semanas de gestación. Además, se calcularon tablas de contingencia con el fin de ver la influencia de la presencia/ausencia de pesticidas/TEXB en la edad gestacional (32-37/>37-39/>39 semanas). También se estudió la relación entre la variable cuantitativa continua niveles de pesticidas/TEXB de alfa y beta en los tejidos placentarios en función de la edad gestacional (Test de Kruskal-Wallis).

Además, se utilizó el test ANOVA de un factor, para ver la relación existente entre el número de pesticidas, y la edad gestacional.

Por último, se categorizó el peso con el que nacieron los niños en función de las semanas de gestación, en dos grupos, pequeño para la edad gestacional y normal para la edad gestacional. Tal y como se ha dicho con anterioridad, los

criterios para dicha división fueron dos: considerar como punto de corte para considerar un niño normal o pequeño para la edad gestacional, el percentil 5% de los pesos en función de las semanas de gestación de la tabla recogida en el estudio de De Doubilet y colaboradores (1997b), o considerar como niño pequeño para la edad gestacional cuando su peso era igual o menor a dos veces la DE (≤ 2 DE) del peso medio de la población de estudio en función de las semanas de gestación con que nació.

La correlación era estadísticamente significativa a nivel $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.01$ (+).

I.- Relación entre las semanas de gestación y pesticidas organoclorados

Ninguno de los pesticidas fue significativamente asociado con las semanas de gestación cuando utilizamos el test de correlación de Spearman. Solamente, el endosulfán-diol tendía a la significación, encontrando mayores niveles de este pesticida en niños con un mayor número de semanas de gestación.

Pesticidas	Edad gestacional			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
o,p´DDT	-0.027	0.655	-0.016	0.792
p,p´DDT	0.011	0.850	0.016	0.787
o,p´DDD	0.029	0.637	0.051	0.400
p,p´DDE	-0.040	0.507	-0.032	0.594
ΣDDTs	0.002	0.979	0.048	0.430

Pesticidas	Edad gestacional			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
E-I	0.028	0.640	0.039	0.514
E-II	0.014	0.821	0.012	0.848
E-éter	0.039	0.522	0.086	0.154
E-lactona	0.020	0.737	0.019	0.748
E-diol	0.109	0.099⁺	0.100	0.131
E-sulfato	-0.094	0.119	-0.079	0.191
Σ Endos	0.069	0.252	0.086	0.156

E=Endosulfán.

Pesticidas	Edad gestacional			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Aldrín	-0.062	0.304	-0.065	0.283
Endrín	0.041	0.503	0.038	0.524
Dieldrín	0.084	0.162	0.089	0.138

Pesticidas	Edad gestacional			
	ρ	P	ρ	P
	ng/g placenta		ng/g lípido	
HCB	0.002	0.971	0.004	0.948
Lindano	-0.001	0.990	-0.011	0.857
Mirex	0.081	0.178	0.058	0.337
Metoxicloro	-0.002	0.968	-0.001	0.991

HCB=Hexaclorobenceno.

Al construir las tablas de contingencia, se halló una asociación estadísticamente significativa entre la presencia o ausencia de diodrín en el tejido placentario y las semanas de gestación. Del total de madres que presentaban este compuesto, un 38.89% tuvieron bebés con una edad gestacional de 37-39 semanas y 61.11% con niños de >39 semanas. Por otro lado, del total de niños nacidos con edad gestacional entre 32 y 37 semanas, un 0% tenían este compuesto, de los nacidos con >37-39 semanas, un 19.26%, y de los de >39 semanas, un 21.43%.

Pesticidas	≥LC	Edad gestacional			χ^2	P
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas		
o,p' DDT $\rho = 0.013$	Sí	6	59	78	0.484	0.785
	No	7	50	76		
p,p' DDT $\rho = -0.020$	Sí	3	54	69	3.561	0.169
	No	10	55	85		
o,p' DDD $\rho = -0.087$	Sí	4	51	80	2.527	0.283
	No	9	58	74		
p,p' DDE $\rho = 0.053$	Sí	12	103	140	1.210	0.546
	No	1	6	14		
ΣDDTs $\rho = 0.082$	Sí	13	108	149	2.328	0.312
	No	0	1	5		

Pesticidas	≥LC	Edad gestacional			χ^2	P
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas		
E-I	Sí	7	63	83	0.524	0.769
	No	6	45	71		
E-II	Sí	2	34	49	1.730	0.421
	No	11	75	105		
E-éter	Sí	7	52	79	0.410	0.815
	No	6	57	75		
E-lactona	Sí	4	38	54	0.100	0.951
	No	9	71	100		
E-diol	Sí	5	56	82	0.280	0.870
	No	4	35	47		
E-sulfato	Sí	7	61	77	0.920	0.631
	No	6	48	77		
Σ Endos	Sí	13	105	146	1.533	0.465
	No	0	4	8		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Edad gestacional			χ^2	P
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas		
Aldrín	Sí	2	35	39	2.573	0.276
	No	11	74	115		
Endrín	Sí	3	35	55	1.102	0.576
	No	10	74	99		
Dieldrín	Sí	0	21	33	5.999	0.050*
	No	13	88	121		

Pesticidas	≥LC	Edad gestacional			χ^2	P
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas		
HCB	Sí	3	44	68	2.454	0.293
	No	10	65	86		
Lindano	Sí	9	87	110	2.632	0.268
	No	4	22	44		
Mirex	Sí	3	27	39	0.038	0.981
	No	10	82	115		
Metoxicloro	Sí	2	36	48	1.892	0.388
	No	11	73	106		

HCB=Hexaclorobenceno.

Según el test de Kruskal-Wallis, no existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de pesticidas organoclorados encontrados en el tejido placentario y las semanas de gestación con que nacieron los niños.

Pesticidas	χ^2	Edad gestacional			P
		Medias(±DE)			
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas	
o,p´DDT: ng/g pla	0.348	0.58(0.72)	0.68(0.88)	0.83(2.24)	0.840
	0.366	6.83(15.73)	11.63(28.02)	20.96(79.95)	
p,p´DDT: ng/g pla	2.926	0.43(0.42)	1.89(6.37)	1.33(3.46)	0.232
	2.955	4.18(9.69)	70.01(407.77)	41.75(132.03)	
o,p´DDD: ng/g pla	2.205	1.66(3.26)	2.42(6.15)	2.04(3.50)	0.332
	2.890	30.73(76.08)	70.70(243.53)	57.99(111.19)	
p,p´DDE: ng/g pla	0.229	5.74(11.26)	3.55(7.38)	3.21(5.80)	0.892
	0.03	146.25(269.20)	97.90(211.09)	109.48(186).15	
ΣDDTs: ng/g pla	0.910	7.81(14.21)	7.90(11.48)	6.80(8.71)	0.790
	0.773	195.64(333.25)	252.87(506.61)	233.98(334.94)	

Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112 y >39 semanas N=156.

Pesticidas		χ^2	Edad gestacional			P
			Medias(\pm DE)			
			32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas	
E -I:	ng/g pla	0.677	0.34(0.35)	0.63(1.07)	1.02(3.02)	0.713
	ng/g lip	0.406	5.98(9.64)	15.66(34.40)	32.36(88.41)	0.816
E-II:	ng/g pla	1.778	0.58(0.19)	1.28(4.71)	0.92(1.67)	0.411
	ng/g lip	1.812	2.57(1.69)	17.78(102.50)	12.52(50.03)	0.404
E-éter:	ng/g pla	0.157	0.14(0.12)	0.18(0.33)	0.17(0.24)	0.924
	ng/g lip	0.711	2.26(3.46)	5.36(21.23)	6.65(16.80)	0.701
E-lactona:	ng/g pla	0.441	1.18(3.79)	1.55(6.07)	0.96(3.04)	0.802
	ng/g lip	0.130	35.79(111.12)	39.20(160.37)	31.76(108.25)	0.937
E-diol:	ng/g pla	1.273	2.48(2.42)	4.11(4.84)	4.72(6.01)	0.529
	ng/g lip	0.719	80.86(116.43)	146.62(259.99)	171.07(341.98)	0.698
E-sulfato:	ng/g pla	0.788	1.62(2.90)	1.03(2.20)	0.91(2.74)	0.674
	ng/g lip	0.545	53.38(129.03)	34.19(123.44)	31.19(78.67)	0.762
ΣEndos:	ng/g pla	0.773	5.25(5.51)	8.12(15.02)	7.97(9.95)	0.679
	ng/g lip	1.104	171.99(208.48)	264.56(455.57)	288.63(511.32)	0.576

E=Endosulfán. Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112 y >39 semanas N=156.

Pesticidas		χ^2	Edad gestacional			P
			Medias(\pm DE)			
			32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas	
Aldrín:	ng/g pla	2.250	0.29(0.19)	0.48(0.79)	0.55(0.84)	0.325
	ng/g lip	2.417	0.28(0.90)	6.29(19.96)	10.87(41.64)	0.299
Endrín:	ng/g pla	0.624	2.30(3.62)	1.54(2.21)	1.92(4.94)	0.732
	ng/g lip	0.678	32.74(77.96)	22.44(79.54)	33.27(91.67)	0.713
Dieldrín :	ng/g pla	3.483	0.25(0.00)	0.49(0.91)	0.51(0.95)	0.176
	ng/g lip	3.592	0.25(0.00)	7.41(31.88)	12.62(42.31)	0.166

Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112 y >39 semanas N=156.

Pesticidas		χ^2	Edad gestacional			P
			Medias(\pm DE)			
			32-37	>37-39	>39	
			semanas	semanas	semanas	
HCB:	ng/gpla	3.341	0.31(0.11)	0.91(2.12)	0.78(1.54)	0.189
	ng/g lip	3.453	2.40(1.12)	28.69(105.56)	20.51(67.71)	0.178
Lindano:	ng/gpla	0.320	0.32(0.22)	0.46(0.59)	0.43(0.46)	0.852
	ng/g lip	0.827	4.86(5.68)	13.95(33.42)	12.41(31.91)	0.661
Mirex:	ng/gpla	0.093	0.37(0.29)	0.50(0.69)	0.76(2.41)	0.954
	ng/g lip	0.110	8.97(27.05)	10.61(45.42)	20.07(88.39)	0.946
Metoxicloro:	ng/gpla	1.575	0.36(0.34)	0.72(1.51)	0.93(2.34)	0.455
	ng/g lip	1.609	2.41(7.73)	13.91(44.07)	23.60(99.07)	0.447

HCB=Hexaclorobenceno. Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112 y >39 semanas N=156.

II.- Relación entre las semanas de gestación y el número de pesticidas por muestra

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas en tejido placentario y la variable semanas de gestación (Test ANOVA de un factor).

Variable	F	Edad gestacional			P	
		Medias(\pm DE)				
			32-37	>37-39	>39	
			semanas	semanas	semanas	
Número de pesticidas	2.080		6.00(2.42)	7.80(2.30)	7.62(3.05)	0.127

Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112 y >39 semanas N=156.

III.- Relación entre las semanas de gestación y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar las semanas de gestación con la TEXB de la fracción alfa y beta, no se vio relación significativa en ninguno de los casos (Test de correlación de Spearman).

TEXB	Edad gestacional			
	ρ		P	
	ng/g placenta		ng/g lípido	
Alfa	-0.087	0.153	-0.057	0.352
Beta	0.006	0.925	0.025	0.676

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Según las tablas de contingencia, se encontró una tendencia a una asociación significativa entre la presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción beta, y las semanas de gestación. Un total de 236 muestras, presentaron un valor medible de estrogenicidad en la fracción beta, de los cuales, un 54.66% eran muestras de niños con una edad gestacional superior a las 39 semanas, valores muy parecidos para el caso de la fracción alfa (un 53.23% de las muestras pertenecía a niños de edad gestacional >39 semanas), aunque en este caso no existía asociación estadística. Además, del total de niños con una edad gestacional entre 32 y 37 semanas, un 76.92% y 100% tenían niveles detectables de TEXB en la fracción alfa y en la beta. Entre los que nacieron con >37-39 semanas, un 75.68% y 84.69%, tenían niveles cuantificables de ambas fracciones. Y de los niños nacidos con más de 39 semanas, un 68.59% y un 82.69% tenían presencia de alfa y beta.

TEXB	≥LC	Edad gestacional			χ ²	P
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas		
Alfa ρ= 0.077	Sí	10	84	107	1.801	0.406
	No	3	27	49		
Beta ρ= 0.076	Sí	13	94	129	4.750	0.093⁺
	No	0	17	27		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al aplicar el test de Kruskal-Wallis, no apareció asociación estadística entre los niveles cuantificados de TEXB de alfa y beta y las semanas de gestación. Aún así, para el caso de alfa, los mayores niveles de carga se encontraron en los tejidos placentarios de madres que dieron a luz niños con una edad gestacional entre 32-37 semanas y entre >37-39 semanas para beta.

TEXB	χ ²	Edad gestacional			P
		Medias(±DE)			
		32-37 semanas	>37-39 semanas	>39 semanas	
Alfa:EeqpM/					
g placenta	4.077	5.16(11.21)	4.09(11.93)	3.98(10.03)	0.130
g lípido	2.311	120.17(177.88)	176.14(369.72)	171.95(434.20)	0.315
Beta:EeqpM/					
g placenta	0.115	14.44(27.77)	23.26(92.03)	19.34(39.04)	0.944
g lípido	0.071	685.01(1276.80)	993.42(2097.11)	1234.93(2973.56)	0.965

TEXB= Carga estrogénica total efectiva. Edad gestacional de 32-37 semanas N=13, >37-39 semanas N=112, >39 semanas N=156.

IV.- Relación entre las semanas de gestación y otras variables de la encuesta

Según el test Mann-Whitney, las semanas de gestación no estaban asociadas de manera estadísticamente significativa con el tipo de parto, pero eran ligeramente menores entre madres que tuvieron un parto por cesárea.

Variable	χ^2	Tipo de parto			P
		Medias(\pm DE)			
Edad gestacional	0.057	Esponáneo	Cesárea	Instrumental	0.972
				39.41(1.37)	

Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 y instrumentales N=45.

V.- Tamaño para la edad gestacional

El número de niños nacidos con bajo peso para la edad gestacional, considerando como tales, aquellos bebés con pesos por debajo del percentil 5% de los pesos fijados en la tabla recogida en un apartado anterior, era de 18.

Se categorizó los niños de nuestro estudio en dos grupos [pequeños para la edad gestacional (N=18) y normales para la edad gestacional], y se aplicaron los test estadísticos, tablas de contingencia y test de Mann-Whitney. En este apartado, solamente se han recogido aquellas asociaciones que fueron halladas estadísticamente significativas [$p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*)] o con tendencia a la significación [$p \leq 0.1$ (⁺)].

Al construir las tablas de contingencia, se halló una asociación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia en tejido placentario de o,p'DDT y el tamaño para la edad gestacional y una tendencia a la significación estadística entre la variable de estudio y p,p'DDT y mirex. Del total de niños pequeños para la edad gestacional, un 22.22%, un 27.78% y un 43.75% de sus madres tenían o,p'DDT, p,p'DDT y mirex en su tejido placentario. En cambio, de los niños que fueron normales para la edad gestacional, un 53.39%, un 48.21% y un 32.11% de sus madres, tenían estos compuestos.

Pesticidas	≥LC	Tamaño para la edad gestacional		χ^2	P
		Pequeño	Normal		
o,p' DDT $\rho = -0.165$	Sí	4	134	5.836	0.016*
	No	14	117		
p,p' DDT $\rho = -0.112$	Sí	5	121	3.300	0.069⁺
	No	13	130		
Mirex $\rho = 0.107$	Sí	8	61	3.035	0.081⁺
	No	10	190		

Al construir las tablas de contingencia, también apareció una asociación estadísticamente significativa entre el ser pequeño o normal para la edad gestacional y la presencia/ausencia de TEXB en la fracción alfa. El 50% y 73.71% de los niños con TEXB en alfa tenían un tamaño pequeño y normal para la edad gestacional, respectivamente.

TEXB	≥LC	Tamaño para la edad gestacional		χ^2	P
		Pequeño	Normal		
Alfa $\rho = -0.134$	Sí	9	185	4.839	0.028*
	No	9	66		

Según el test de Mann-Whitney, se mantenía la asociación estadísticamente significativa para el caso del o,p' DDT, y la tendencia a la significación estadística para el caso del p,p' DDT y mirex. Además, apareció una tendencia a una asociación estadísticamente significativa con las concentraciones de endosulfán-lactona (ng/g lípido) y el endrín (ng/g placenta). Los niveles medios eran mayores entre los niños normales para la edad gestacional para todos los pesticidas, exceptuando para el caso del mirex, con

niveles medios mayores en tejidos placentarios de madres que dieron a luz niños de pequeño tamaño para la edad gestacional.

Pesticidas	U	Tamaño para la edad gestacional		P
		Medias(\pm DE)		
		Pequeño	Normal	
o,p´DDT: ng/g plac	1340.500	0.39(0.55)	0.67(0.82)	0.006**
	ng/g lip	1287.000	6.44(24.62)	13.97(36.28)
p,p´DDT: ng/g pla	1625.000	0.66(0.98)	1.59(4.97)	0.072⁺
	ng/g lip	1526.000	12.51(34.43)	56.01(189.00)
E-lactona: ng/g pla	1731.000	0.17(0.36)	1.23(4.63)	0.127
	ng/g lip	1513.000	3.78(11.91)	36.66(135.84)
Endrín: ng/g pla	1706.500	0.93(0.65)	1.81(4.19)	0.098⁺
	ng/g lip	1668.000	14.99(56.56)	29.53(88.68)
Mirex: ng/g pla	1811.000	1.89(5.32)	0.56(1.36)	0.171
	ng/g lip	1596.500	13.71(81.34)	15.44(73.30)

Pequeño para la edad gestacional N=18 y normal para la edad gestacional N=251.

Según el test de Mann-Whitney, existía una tendencia a la asociación estadísticamente significativa entre la TEXTB de la fracción alfa y el tamaño para la edad gestacional. Los niños con peso normal según las semanas de gestación a las que nacieron, tenían madres con niveles medios de TEXTB de la fracción alfa más elevados que aquellos nacidos con un peso por debajo del esperado.

TEXB	U	Tamaño para la edad gestacional		P
		Medias(\pm DE)		
		Pequeño	Normal	
Alfa:EeqpM/				
g placenta	1586.000	1.09(2.18)	4.42(11.36)	0.212
g lípido	1457.000	38.03(64.50)	186.00(412.25)	0.086⁺

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Pequeño para la edad gestacional N=18 y normal para la edad gestacional N=251.

Al intentar asociar el tamaño para la edad gestacional con el resto de variables de la encuesta, solamente apareció una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de estudios de la madres y ser pequeño o normal para la edad gestacional, y una tendencia a la significación estadística entre esta última y la percepción de la exposición a compuestos químicos por parte del hombre (Tablas de contingencia). Del total de niños con pequeño tamaño, el 61.11% tenía madres con estudios medios y el 38.49% tenía padres con exposición a sustancias químicas.

Variable	Categorías	Tamaño para la edad gestacional		χ^2	P
		Pequeño	Normal		
Nivel de estudios	Sin/primarios	5	135	6.430	0.040*
	Medios	11	75		
$\rho = -0.025$	Superiores	1	41		
Percepción exposición	Sí	5	36	2.790	0.095⁺
	No	13	215		
$\rho = 0.102$					

Si se consideraba como niño pequeño para la edad gestacional aquel cuyo peso estaba al menos dos veces por debajo de la DE ($\leq -2DE$) para la edad gestacional, basado en datos derivados de la población de estudio, el número de niños descendía a seis. Aunque este número no era suficiente para realizar estudios estadísticos, se estudiaron las características de las madres de este grupo particular de niños. En líneas generales, las características de estos seis casos particulares no diferían del total (N=308). Los valores medios de edad, IMC, ganancia de peso de la madre y la distribución de frecuencias de paridad, tipo de trabajo, nivel de estudios del padre y de la madre, no presentaban diferencias del grupo final. Solamente aparecieron diferencias en la variable ruralidad, ya que la proporción de madres que vivían en un área rural era mayor en este grupo particular (N=4, 41.56%), en el hábito tabáquico, puesto que un mayor número de madres fumaban (N=3, 50%) y una mayor percepción de la exposición a productos químicos paterna (N=3, 50%). Con respecto a los niveles de pesticidas y TEXB de las fracciones alfa y beta en el tejido placentario, en casi todos los casos eran menores, exceptuando las concentraciones de mirex y metoxicloro, cuyos niveles estaban por encima de los niveles medios de la población de estudio (mirex= 4.14 ± 0.37 ng/g placenta y metoxicloro= 1.04 ± 0.25 ng/g placenta). Tampoco el número de pesticidas medio por muestra era mayor para este grupo particular. En estos seis casos, la frecuencia de aparición de p,p'DDE (100%), dieldrín (100%), o,p'DDT (100%), endosulfán-sulfato (83.33%), mirex (50%), sumatoria de DDTs (100%) y sumatoria de endosulfanes (100%), era mayor que en el total.

4.5.3.5. Tipo de parto

En este apartado se relacionó el tipo de parto con la presencia o ausencia de valores medibles de compuestos químicos organoclorados o mezcla de compuestos en el tejido placentario (Tablas de contingencia), y se estudiaron las asociaciones con los niveles de estos compuestos/mezclas de compuestos (Test de Kruskal-Wallis).

El test aplicado para ver la relación entre el número de pesticidas por muestra y el tipo de parto fue el test ANOVA de un factor.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01(**)$, $p \leq 0.05(*)$ y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1(+)$.

I.- Relación entre el tipo de parto y pesticidas organoclorados

Al relacionar la variable tipo de parto, dividida en tres grupos (espontáneo, cesárea e instrumental) con la presencia/ausencia de pesticidas, ninguno de estos últimos tenía una asociación significativa con el tipo de parto.

Pesticidas	≥LC	Tipo de parto			χ^2	P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
o,p' DDT	Sí	109	13	23	2.251	0.325
$\rho = 0.033$	No	95	20	21		
p,p' DDT	Sí	91	15	22	0.424	0.809
$\rho = -0.037$	No	113	18	22		
o,p' DDD	Sí	97	17	22	0.232	0.890
$\rho = -0.023$	No	107	16	22		
p,p' DDE	Sí	190	30	41	0.220	0.896
$\rho = 0.007$	No	14	3	3		
ΣDDTs	Sí	13	108	149	1.832	0.381
$\rho = 0.082$	No	0	1	5		

Pesticidas	≥LC	Tipo de parto			χ^2	P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
E-I	Sí	110	20	24	0.477	0.788
$\rho = -0.014$	No	93	13	20		
E-II	Sí	62	7	16	2.059	0.357
$\rho = -0.025$	No	142	26	28		
E-éter	Sí	101	20	19	2.319	0.314
$\rho = 0.022$	No	103	13	25		
E-lactona	Sí	69	12	15	0.082	0.960
$\rho = -0.007$	No	135	21	29		
E-diol	Sí	100	18	24	0.406	0.816
$\rho = 0.015$	No	64	11	12		
E-sulfato	Sí	107	17	23	0.010	0.995
$\rho = 0.003$	No	97	16	21		
ΣEndos	Sí	13	105	146	0.977	0.614
$\rho = 0.067$	No	0	4	8		

E=Endosulfán

Pesticidas	≥LC	Tipo de parto			χ^2	P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
Aldrín	Sí	50	9	16	2.606	0.272
$\rho = -0.094$	No	154	24	28		
Endrín	Sí	72	10	15	0.317	0.853
$\rho = 0.018$	No	132	23	29		
Dieldrín	Sí	40	8	9	0.378	0.828
$\rho = -0.017$	No	164	25	35		

Pesticidas	≥LC	Tipo de parto			χ^2	P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
HCB	Sí	84	13	19	0.115	0.944
	No	120	20	25		
Lindano	Sí	152	28	30	2.794	0.247
	No	52	5	14		
Mirex	Sí	66	5	15	4.256	0.119
	No	138	28	29		
Metoxicloro	Sí	66	5	15	4.256	0.119
	No	138	28	29		

HCB=Hexaclorobenceno.

Mediante el test de Kruskal-Wallis, se vio una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de parto y lindano, con mayores niveles de este pesticida entre madres que tuvieron un parto espontáneo.

Pesticidas	χ^2	Tipo de parto			P
		Medias(±DE)			
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental	
o,p´DDT:ng/g pla	0.579	1.00(0.86)	1.58(1.84)	1.02(0.65)	0.749
	ng/g lip	0.834	26.43(49.25)	29.96(40.54)	
p,p´DDT:ng/g pla	0.930	1.82(1.94)	1.34(1.59)	1.75(1.39)	0.628
	ng/g lip	1.000	63.99(116.20)	23.77(47.39)	
o,p´DDD:ng/g pla	0.083	3.50(4.10)	1.99(2.38)	3.33(3.16)	0.959
	ng/g lip	0.223	110.16(140.49)	32.71(53.06)	
p,p´DDE:ng/g pla	0.991	3.07(4.02)	2.47(2.51)	3.25(4.35)	0.609
	ng/g lip	1.656	106.49(176.76)	76.82(133.13)	
∑DDTs: ng/g pla	1.665	5.80(6.09)	4.65(4.72)	6.09(5.24)	0.435
	ng/g lip	2.256	203.60(287.80)	122.01(160.35)	

Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

Pesticidas	χ^2	Tipo de parto			P	
		Medias(\pm DE)				
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
E -I:	ng/g pla	0.505	1.05(1.47)	1.17(2.48)	1.17(1.09)	0.777
	ng/g lip	0.179	39.07(64.33)	43.84(95.70)	22.67(23.15)	0.914
E-II:	ng/g pla	2.607	1.51(1.72)	1.00(0.22)	1.85(1.99)	0.272
	ng/g lip	2.605	29.83(64.29)	3.80(7.40)	29.03(53.79)	0.272
E-éter:	ng/g pla	0.793	0.33(0.51)	0.23(0.24)	0.36(0.67)	0.673
	ng/g lip	1.383	13.52(30.97)	7.80(14.19)	18.00(48.37)	0.501
E-lactona:	ng/g pla	0.043	2.38(4.94)	2.17(3.68)	3.82(7.23)	0.979
	ng/g lip	0.153	77.11(161.35)	77.43(119.34)	84.43(157.18)	0.926
E-diol:	ng/g pla	1.947	6.70(4.99)	5.42(3.99)	8.07(5.30)	0.378
	ng/g lip	0.964	252.30(299.32)	302.46(688.40)	191.73(135.08)	0.618
E-sulfato:	ng/g pla	0.785	1.83(3.44)	0.72(0.58)	1.39(1.33)	0.675
	ng/g lip	0.612	57.73(92.97)	47.14(102.53)	43.16(65.22)	0.736
Σ Endos:	ng/g pla	2.029	7.11(8.19)	6.04(5.70)	8.85(10.81)	0.363
	ng/g lip	2.452	217.72(259.14)	300.80(784.76)	258.78(396.66)	0.315

E=Endosulfán. Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

Pesticidas	χ^2	Tipo de parto			P	
		Medias(\pm DE)				
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
Aldrín:	ng/g pla	1.660	1.27(1.48)	1.42(1.36)	0.65(0.26)	0.436
	ng/g lip	1.403	31.53(47.76)	35.92(68.74)	6.25(9.82)	0.496
Endrín:	ng/g pla	0.256	2.97(2.39)	3.49(2.97)	2.92(2.34)	0.880
	ng/g lip	0.315	65.20(90.09)	73.59(110.52)	52.54(61.09)	0.854
Dieldrín :	ng/g pla	0.106	1.73(1.95)	0.62(0.17)	0.82(0.56)	0.948
	ng/g lip	0.315	54.34(71.54)	7.42(9.79)	49.95(95.35)	0.854

Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

Pesticidas		χ^2	Tipo de parto			P
			Medias(\pm DE)			
			Espontáneo	Cesárea	Instrumental	
HCB:	ng/gpla	0.087	1.26(1.50)	1.47(1.87)	1.03(1.07)	0.958
	ng/g lip	0.202	41.66(75.02)	30.20(55.08)	20.67(38.50)	0.904
Lindano:	ng/gpla	6.647	0.56(0.55)	0.52(0.40)	0.44(0.62)	0.036*
	ng/g lip	7.468	20.29(39.48)	16.53(33.05)	11.88(44.51)	0.024*
Mirex:	ng/gpla	0.925	1.26(1.13)	0.92(0.56)	1.38(1.39)	0.630
	ng/g lip	0.738	49.61(106.66)	62.07(142.12)	51.12(124.90)	0.692
Metoxicloro:	ng/gpla	3.814	1.77(2.25)	1.22(0.69)	1.37(0.91)	0.148
	ng/g lip	3.925	62.06(141.11)	23.29(25.13)	22.99(20.44)	0.141

HCB=Hexaclorobenceno. Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

II.- Relación entre el tipo de parto y el número de pesticidas por muestra

El número de pesticidas no estaba asociado con el tipo de parto (Test ANOVA de un factor).

Variable	F	Tipo de parto			P
		Medias(\pm DE)			
Nº pesticidas	0.083	Espontáneo	Cesárea	Instrumental	0.921
				7.57(3.16)	

Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

III.- Relación entre el tipo de parto y la TEXTB de la fracción alfa y beta

Al relacionar la variable tipo de parto con la presencia o ausencia de estrogenicidad, la fracción alfa tendía a una asociación estadísticamente significativa con el tipo de parto. La mayor parte de los niños que tenían un valor medible de TEXTB en la fracción alfa y beta, nacieron de forma espontánea (77% y 73.33%, respectivamente).

TEXB	≥LC	Tipo de parto			χ ²	P
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental		
Alfa ρ=0.077	Sí	154	19	31	5.050	0.080⁺
	No	53	15	14		
Beta ρ= 0.064	Sí	178	28	36	1.171	0.557
	No	29	6	9		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Al utilizar el test de Kruskal-Wallis para relacionar la variable tipo de parto con los niveles de estrogenicidad encontrados en las placentas de niños nacidos de forma natural, por cesárea o usando algún tipo de instrumento, se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos para los niveles de estrogenicidad de la fracción alfa. Los nacidos de forma espontánea, poseían mayores valores medios de estrogenicidad en la fracción que los nacidos por cesárea o usando algún instrumento.

TEXB	χ ²	Tipo de parto			P
		Medias±DE			
		Espontáneo	Cesárea	Instrumental	
Alfa: EeqpM/					
g placenta	6.910	4.94(12.30)	2.35(7.09)	2.62(5.57)	0.032*
g lípido	8.952	210.46(452.01)	61.26(169.13)	126.05(287.64)	0.011*
Beta:EeqpM/					
g placenta	0.754	23.29(73.67)	14.94(27.82)	13.77(32.54)	0.686
g lípido	2.098	1286.01(2890.19)	472.47(864.42)	773.48(1667.43)	0.350

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Partos espontáneos N=208, cesáreas N=34 e instrumentales N=45.

4.5.3.6. Estación del año

La exposición medioambiental a compuestos químicos puede variar dependiendo de la época del año, debido al uso de diferentes compuestos en diferentes estaciones del año. Por esta razón, se ha intentado ver si los niveles de compuestos químicos encontrados en el tejido placentario de los niños variaban en función del momento de nacimiento. Para ello, se construyeron las tablas de contingencia, para relacionar la variable presencia/ausencia ($> LC$ o $< LC$, respectivamente) de pesticidas o estrogenicidad positiva/negativa en las muestras de tejido placentario con la variable estación del año. Además, también se utilizó el test de Kruskal-Wallis para correlacionar los niveles de pesticidas o niveles de estrogenicidad con las diferentes estaciones del año en las que nacieron los niños.

También se ha estudiado la influencia de la estación del año en el número de pesticidas por muestra, mediante el test ANOVA de un factor.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendía a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la estación del año y pesticidas organoclorados

Mediante tablas de contingencia se vio una relación estadísticamente significativa para toda la familia de DDTs estudiados y para casi todos los endosulfanes (Endo-II, Endo-éter, Endo-lactona, Endo-diol) como podemos ver en las tablas recogidas más abajo. La presencia ($\geq LC$) o ausencia ($< LC$) de aldrín y lindano también fue asociada significativamente con la estación del año. Para el caso de presencia/ausencia de niveles medibles de o,p'DDT, p,p'DDT, o,p'DDD, endosulfán-II y aldrín, el número de niños nacidos en primavera cuyo tejido placentario poseía estos compuestos era mayor que en el resto de las estaciones, seguido de los nacidos en verano. En cambio, para el caso de p,p'DDE, sumatoria de DDTs, endosulfán-éter, endosulfán-diol, endosulfán-sulfato y lindano, el número de niños nacidos con este pesticida en el tejido placentario era mayor en verano, seguido de los nacidos en primavera.

Pesticidas	≥LC	Estación				χ^2	P
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
o,p' DDT $\rho = 0.028$	Sí	55	54	15	34	21.886	<0.001**
	No	35	55	39	15		
p,p' DDT $\rho = 0.061$	Sí	57	39	10	33	40.873	<0.001**
	No	33	70	44	16		
o,p' DDD $\rho = -0.069$	Sí	47	44	24	32	9.277	0.026*
	No	43	65	30	17		
p,p' DDE $\rho = 0.067$	Sí	87	101	45	47	9.863	0.033*
	No	3	8	9	2		
ΣDDTs $\rho = 0.054$	Sí	90	106	50	49	9.567	0.014*
	No	0	3	4	0		

Pesticidas	≥LC	Estación				χ^2	P
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
E-I $\rho = 0.093$	Sí	52	63	25	23	3.606	0.307
	No	38	45	29	26		
E-II $\rho = -0.035$	Sí	36	26	12	19	9.369	0.025*
	No	54	83	42	30		
E-éter $\rho = 0.008$	Sí	36	70	26	20	14.131	0.003**
	No	54	39	28	29		
E-lactona $\rho = 0.112$	Sí	30	52	13	11	14.052	0.003**
	No	60	57	41	38		
E-diol $\rho = 0.028$	Sí	45	78	10	21	26.337	<0.001**
	No	45	17	9	23		
E-sulfato $\rho = 0.068$	Sí	48	58	27	21	1.731	0.630
	No	42	51	27	28		
ΣEndos $\rho = 0.084$	Sí	87	107	49	46	5.431	0.143
	No	3	2	5	3		

E=Endosulfán.

Pesticidas	≥LC	Estación				χ ²	P
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
Aldrín	Sí	34	24	10	16	9.169	0.027*
	No	56	85	44	33		
Endrín	Sí	29	44	19	11	5.034	0.169
	No	61	65	35	38		
Dieldrín	Sí	14	26	11	10	2.109	0.550
	No	76	83	43	39		

Pesticidas	≥LC	Estación				χ ²	P
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
HCB	Sí	35	49	18	24	3.390	0.335
	No	55	60	36	25		
Lindano	Sí	60	85	50	31	16.286	<0.001**
	No	30	24	4	18		
Mirex	Sí	26	31	8	10	4.970	0.174
	No	64	78	46	39		
Metoxicloro	Sí	24	35	16	17	1.184	0.757
	No	66	74	38	32		

HCB=Hexaclorobenceno.

Si en vez de relacionar la presencia/ausencia de pesticidas con la estación del año, se comparan los niveles de estos pesticidas en niños nacidos en primavera, con los niveles de estos compuestos en niños nacidos en verano, en otoño o en invierno, el test utilizado es el Kruskal-Wallis. Para el caso de la familia de los DDTs, se hallaron asociaciones estadísticamente significativas para el caso de los pesticidas o,p'DDT, p,p'DDT, p,p'DDE, o,p'DDD (ng/g lípido) y sumatoria de DDTs. Los niveles medios de todos ellos en tejido placentario

eran mayores en primavera, excepto para el caso de p,p'DDT y p,p'DDE que eran mayores en invierno y otoño, respectivamente. Para el caso de la familia de los endosulfanes, aparecieron asociaciones significativas entre la estación del año y los niveles de endosulfán-I, endosulfán-II, endosulfán-éter, endosulfán-lactona, endosulfán-diol y sumatoria de endosulfanes. Los niveles medios de pesticidas encontrados en el tejido placentario eran mayores en primavera para el caso de Endo-I y Σ Endos, en invierno, para endo-éter, en verano para endo-diol, verano y otoño para endo-lactona y otoño para endosulfán-II. Por último, existía una asociación estadísticamente significativa, para el caso del pesticida aldrín, encontrando niveles mayores de este pesticida en niños nacidos en primavera.

Pesticidas	χ^2	Estación del año				P
		Medias(\pm DE)				
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
o,p'DDT:						
ng/gplac	35.702	1.12(2.88)	0.80(2.22)	0.49(0.94)	0.68(0.70)	<0.001**
ng/g lípido	38.404	36.45(102.48)	26.30(167.61)	6.85(22.30)	11.58(23.77)	0.001**
p,p'DDT:						
ng/gplac	21.886	1.72(3.81)	1.01(2.80)	1.31(6.92)	1.97(5.70)	<0.001**
ng/g lípido	18.814	54.38(136.51)	16.31(45.22)	82.83(563.24)	66.33(197.08)	<0.001**
o,p'DDD:						
ng/gplac	5.541	1.71(2.34)	1.91(4.95)	3.20(6.24)	2.18(4.65)	0.136
ng/g lípido	6.729	58.86(116.15)	67.55(267.06)	69.05(144.03)	61.72(129.70)	0.081⁺
p,p'DDE:						
ng/gplac	40.620	4.64(7.65)	3.06(6.99)	2.78(5.79)	2.25(2.31)	0.001**
ng/g lípido	30.136	146.75(208.06)	90.50(202.96)	77.04(199.71)	79.71(100.51)	0.001**
ΣDDTs:						
ng/gplac	27.451	8.60(9.15)	6.17(9.73)	7.09(10.40)	6.55(11.02)	<0.001**
ng/g lípido	20.627	289.05(366.79)	214.61(494.77)	232.92(582.55)	235.22(343.36)	<0.001**

Niños nacidos en primavera N=93, verano N=110, otoño N=56 e invierno N=49.

Pesticidas	χ^2	Estación del año				P
		Medias(\pm DE)				
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
E -I:						
ng/gplac	10.311	1.27(3.39)	0.51(0.71)	0.46(1.21)	0.96(2.77)	0.016*
ng/g lípido	7.414	36.42(71.76)	16.20(42.52)	8.00(26.60)	31.20(99.96)	0.060⁺
E-II:						
ng/gplac	10.739	1.08(1.70)	0.71(0.73)	1.52(6.55)	1.12(2.32)	0.013*
ng/g lípido	10.017	17.97(52.97)	3.87(18.25)	24.19(143.15)	16.46(59.00)	0.018*
E-éter:						
ng/gplac	7.652	0.20(0.40)	0.18(0.31)	0.13(0.14)	0.27(0.69)	0.054⁺
ng/g lípido	8.988	8.80(29.15)	5.30(11.81)	3.28(7.04)	10.86(37.70)	0.029*
E-lactona:						
ng/gplac	14.619	1.24(4.05)	1.50(4.80)	1.50(6.27)	0.40(0.98)	0.002**
ng/g lípido	13.785	33.69(96.99)	63.55(294.53)	44.67(178.13)	11.85(36.53)	0.003**
E-diol:						
ng/gplac	18.245	4.24(5.30)	5.60(5.95)	3.60(5.49)	2.61(3.70)	<0.001**
ng/g lípido	13.913	145.12(258.37)	214.61(379.27)	159.65(330.77)	74.35(99.64)	0.003**
E-sulfato:						
ng/gplac	4.804	1.54(4.00)	0.79(1.36)	0.62(1.14)	0.57(1.02)	0.187
ng/g lípido	4.881	55.49(98.08)	30.05(63.83)	17.49(45.63)	12.77(27.35)	0.181
ΣEndos:						
ng/gplac	49.219	9.63(10.79)	8.83(9.34)	5.24(18.07)	5.42(8.58)	<0.001**
ng/g lípido	35.726	329.96(462.97)	346.97(621.57)	173.95(480.76)	174.45(235.72)	<0.001**

E=Endosulfán. Niños nacidos en primavera N=93, verano N=110, otoño N=56 e invierno N=49.

Pesticidas	χ^2	Estación del año				P
		Medias(\pm DE)				
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
Aldrín:						
ng/gplac	11.312	0.70(1.15)	0.39(0.39)	0.30(0.10)	0.57(0.85)	0.010**
ng/glípidos	10.308	15.28(52.26)	4.98(17.31)	0.54(1.79)	8.69(24.04)	0.016*
Endrín:						
ng/gplac	4.776	2.20(6.48)	1.60(1.91)	1.77(2.09)	1.21(1.29)	0.189
ng/glípidos	3.981	41.65(122.78)	22.81(64.79)	29.73(64.21)	10.03(29.40)	0.264
Dieldrín:						
ng/gplac	1.470	0.60(1.35)	0.47(0.97)	0.49(0.82)	0.49(0.66)	0.689
ng/glípidos	1.597	14.46(53.19)	7.04(20.99)	7.43(20.94)	13.39(45.94)	0.660

Pesticidas	χ^2	Estación del año				P
		Medias(\pm DE)				
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
HCB:						
ng/gplac	3.015	0.65(0.86)	0.93(3.08)	1.44(3.38)	0.72(1.04)	0.389
ng/g lípidos	3.313	14.31(43.07)	46.92(355.96)	54.32(164.69)	18.89(36.41)	0.346
Lindano:						
ng/gplac	4.363	0.53(0.66)	0.44(0.67)	0.39(0.51)	0.38(0.44)	0.225
ng/glípidos	3.623	17.63(41.65)	12.56(29.56)	10.27(29.56)	8.05(15.57)	0.305
Mirex:						
ng/gplac	5.241	0.63(0.98)	0.67(2.14)	0.37(0.56)	0.85(2.72)	0.155
ng/glípidos	3.037	17.71(98.17)	15.11(53.89)	8.29(47.27)	19.85(63.99)	0.386
Metoxicloro:						
ng/gplac	0.678	1.13(2.22)	0.45(0.37)	0.43(0.48)	1.26(3.50)	0.878
ng/glípidos	0.830	14.60(121.02)	8.63(29.93)	3.10(10.72)	27.23(82.54)	0.842

HCB=Hexaclorobenceno. Niños nacidos en primavera N=93, verano N=110, otoño N=56 e invierno N=49.

II.- Relación entre la estación del año y el número de pesticidas por muestra

Según el test ANOVA de un factor, existía una relación estadísticamente significativa entre la estación del año en la que nació el niño y el número de pesticidas encontrado en su tejido placentario, siendo mayor el número en verano, seguido de la primavera.

Variable	F	Estación del año				P
		Medias(\pm DE)				
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
Nº pesticidas	4.769	7.82(3.19)	8.02(2.62)	6.28(2.43)	7.75(3.35)	0.003**

Niños nacidos en primavera N=93, verano N=110, otoño N=56 e invierno N=49.

III.- Relación entre la estación del año y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al relacionar los niveles de estrogenicidad de la fracción alfa y beta encontrados en los tejidos placentarios con las estaciones del año en las que nacen los niños, apareció una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de estrogenicidad de la fracción beta y las estaciones del año, asociación que no se encontró en la fracción alfa. Entre las mujeres que tenían en su placenta un valor medible de TEXB de alfa y beta, un 28.90% y un 30.50% tuvieron bebés en primavera, un 35.32% y 20.08% en verano, un 19.27% y un 20.07% en otoño y finalmente, un 16.51% y un 29.35% en invierno.

TEXB	≥LC	Estación del año				χ ²	P
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
Alfa ρ=-0.062	Sí	63	77	42	36	1.292	0.731
	No	30	32	14	12		
Beta ρ=-0.079	Sí	79	85	52	43	7.872	0.049*
	No	14	24	4	5		

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

Si en vez de relacionar si existe o no estrogénicidad en la fracción alfa o beta de las muestras de tejido placentario con las diferentes estaciones del año donde nacen los niños, se relacionaba los niveles de estrogénicidad con las estaciones del año, la asociación entre la fracción beta y las estaciones aumentaba su significación y aparecía una asociación entre la fracción alfa y las diferentes estaciones. Los niveles medios mayores de TEXB de alfa aparecían en tejidos de madres que dieron a luz en otoño, y en invierno para beta.

TEXB	χ ²	Estación del año				P
		Medias(±DE)				
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
Alfa:						
EeqpM/						
g plac	12.805	1.99 (4.65)	3.75 (9.75)	8.76 (18.37)	5.08 (10.72)	0.005**
g lip	8.340	87.10(185.26)	144.40(384.05)	337.02(635.39)	267.43(440.79)	0.040*
Beta:						
EeqpM/						
g plac	24.622	15.68 (33.37)	8.93 (21.22)	36.49 (130.72)	39.24 (52.82)	<0.001**
g lip	30.939	1064.92(2506.23)	485.82(1756.18)	1111.86(2176.98)	2516.18(3590.10)	<0.001**

TEXB=Carga estrogénica total efectiva. Niños nacidos en primavera N=93, verano N=110, otoño N=56, invierno N=49.

4.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DEL CUESTIONARIO Y LA EXPOSICIÓN A PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y CARGA ESTROGÉNICA TOTAL EFECTIVA EN MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO. ANÁLISIS MULTIVARIADO

4.6.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MADRE

Para llevar a cabo el análisis multivariado se ha considerado, en todos los casos, la presencia de cada uno de los pesticidas en tejido placentario, carga estrogénica total efectiva (TEXB) y número de pesticidas por muestra de tejido placentario, como variables continuas dependientes. El conjunto de variables cualitativas o cuantitativas categóricas independientes ha sido el mismo que en el análisis bivariado, a excepción de las semanas de gestación y el tipo de actividad laboral que han sido categorizados de forma particular. Las variables independientes han sido:

- Edad de la madre en el momento del parto: ≤ 32 ó > 32 años
- Índice de masa corporal antes del embarazo: < 25 ó ≥ 25 Kg/m²
- Ganancia de peso durante el embarazo: ≤ 12 ó > 12 Kg
- Lugar de residencia: rural/urbana
- Actividad laboral madre: agricultura sí/agricultura no
- Paridad: primípara/multípara
- Hábito tabáquico durante el embarazo: fumadora/no fumadora
- Peso del niño al nacer: < 2500 ó ≥ 2500 g
- Índice ponderal del niño: < 25 ó ≥ 25 g/cm³
- Semanas de gestación: < 37 ó ≥ 37 semanas

El test utilizado en todos los casos ha sido el test ANOVA de dos vías, modelo general lineal.

4.6.1.1. Edad de la madre e índice de masa corporal

El número de madres con edad ≤ 32 años e IMC $< 25 \text{ Kg/m}^2$ era de 115, con edad ≤ 32 años e IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ era de 39, con edad > 32 años e IMC $< 25 \text{ Kg/m}^2$ era de 104 y finalmente, con una edad > 32 años e IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ era de 50.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la edad de la madre, el IMC y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, se hallaron tendencias a la significación estadística entre las variables edad de la madre, IMC, los niveles de p,p'DDE (ng/g lípido) y aldrín (ng/g lípido). Para el caso del p,p'DDE, el valor medio de este pesticida era mayor en el grupo de las mujeres con edad ≤ 32 años y $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ (media = 159.81 ± 237.11 ng/g lípido) y menor para las de edad ≤ 32 años e IMC $< 25 \text{ Kg/m}^2$ (media = 88.601 ± 139.93 ng/g lípido). Para el caso del aldrín, los valores medios mayores se encontraron entre las madres con edad ≤ 32 años e IMC $< 25 \text{ Kg/m}^2$ (43.37 ± 120.54 ng/g lípido) y los valores medios menores para el grupo de mujeres con edad > 32 años e IMC $< 25 \text{ Kg/m}^2$ (media = 17.06 ± 46.69 ng/g lípido).

Pesticidas	Edad +IMC	
	F	P
o,p'DDT: ng/gplacenta	1.255	0.263
	0.881	0.349
p,p'DDT: ng/gplacenta	1.430	0.233
	0.126	0.723
o,p'DDD: ng/gplacenta	0.276	0.600
	0.406	0.525
p,p'DDE: ng/gplacenta	0.000	0.999
	2.807	0.095⁺
Σ DDTs: ng/gplacenta	0.874	0.351
	0.000	0.989

Pesticidas		Edad +IMC	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.181	0.671
	ng/g lípido	0.080	0.777
E-II:	ng/gplacenta	0.021	0.884
	ng/g lípido	0.101	0.751
E-éter:	ng/gplacenta	1.348	0.247
	ng/g lípido	1.442	0.231
E-lactona:	ng/gplacenta	1.414	0.235
	ng/g lípido	0.355	0.552
E-diol:	ng/gplacenta	0.219	0.640
	ng/g lípido	0.276	0.600
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.096	0.757
	ng/g lípido	0.001	0.971
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.324	0.569
	ng/g lípido	0.001	0.972

E=Endosulfán.

Pesticidas		Edad +IMC	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	2.950	0.087⁺
	ng/g lípido	0.937	0.334
Endrín:	ng/gplacenta	1.984	0.160
	ng/g lípido	1.821	0.178
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.126	0.723
	ng/g lípido	1.528	0.217

Pesticidas		Edad +IMC	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.072	0.789
	ng/g lípido	0.319	0.573
Lindano:	ng/gplacenta	0.335	0.563
	ng/g lípido	0.262	0.609
Mirex:	ng/gplacenta	1.514	0.219
	ng/g lípido	0.510	0.476
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.981	0.323
	ng/g lípido	0.024	0.876

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre la edad de la madre, el IMC y el número de pesticidas por muestra

No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de pesticidas y las variables edad de la madre e IMC; aún así, el número medio de pesticidas era mayor entre el grupo de las mujeres con edad >32 años e IMC ≥ 25 Kg/m² (8.18 ± 3.24 pesticidas por muestra) y menor entre el grupo de madres con edad >32 años e IMC <25 Kg/m² (7.30 ± 2.62 pesticidas por muestra) (Test ANOVA de dos vías).

Variable	Edad +IMC	
	F	P
Número de pesticidas	2.031	0.155

III.- Relación entre la edad de la madre, el IMC y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la edad de la madre, IMC y TEXB de la fracción beta. Los niveles medios mayores de estrogénicidad en beta los poseían los tejidos placentarios de las madres con edad ≤ 32 años e IMC ≥ 25 Kg/m² [media=47.55(± 152.76) Eeq pM/g placenta o 1675.73(± 3558.62) Eeq pM/g lípido]. Los niveles medios menores se encontraron en el grupo de mujeres con edad ≤ 32 años e IMC < 25 Kg/m² [media=11.38(± 25.49) Eeq pM/g placenta o 694.23(± 1654.43) Eeq pM/g lípido].

TEXB	Edad +IMC	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.470	0.493
EeqpM/g lip	0.072	0.789
Beta: EeqpM/g plac	7.556	0.006*
EeqpM/g lip	8.200	0.004*

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.2. Edad de la madre y ganancia de peso

Al combinar las variables edad de la madre en el momento del parto con la ganancia de peso durante el mismo, el número de madres con edad ≤ 32 años y ganancia de peso ≤ 12 Kg era 72, edad ≤ 32 años y ganancia de peso > 12 Kg era de 81, edad < 32 años y ganancia de peso ≤ 12 Kg era de 82 y edad < 32 años y ganancia de peso > 12 Kg era de 71.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la edad de la madre, la ganancia de peso y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, se encontró una tendencia a la significación estadística entre la variable edad de la madre, ganancia de peso y los niveles de los pesticidas endosulfán-éter (ng/g lípido) y endosulfán-sulfato (ng/g lípido). Los niveles medios mayores de endosulfán-éter se encontraron en mujeres con edad ≤ 32 años y ganancia de peso > 12 Kg (media \pm DE=10.57 \pm 37.32 ng/g lípido), en cambio, los valores medios menores se cuantificaron en el grupo de madres con edad > 32 años y ganancia de peso > 12 Kg con una media \pm DE de 4.42 \pm 12.65 ng/g lípido, aunque seguido muy de cerca por madres con edad ≤ 32 años y ganancia de peso ≤ 12 Kg (media \pm DE=4.45 \pm 11.92 ng/g lípido). Para el caso del endosulfán-sulfato los niveles medios mayores se encontraron entre el grupo de las madres con edad > 32 años y ganancia de peso ≤ 12 Kg con una media \pm DE de 50.77 \pm 187.33 ng/g lípido y los niveles medios menores entre las madres con una edad > 32 años y ganancia de peso > 12 Kg con una media \pm DE de 14.79 \pm 32.53 ng/g lípido.

Pesticidas	Edad+Ganancia de peso	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.004	0.948
	ng/g lípido	0.349
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.398	0.529
	ng/g lípido	0.379
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.271	0.603
	ng/g lípido	0.161
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.581	0.447
	ng/g lípido	0.708
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.294	0.588
	Ng/g lípido	0.070

Pesticidas		Edad+Ganancia de peso	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.08	0.776
	ng/g lípido	2.197	0.139
E-II:	ng/gplacenta	0.790	0.375
	ng/g lípido	1.383	0.241
E-éter:	ng/gplacenta	0.753	0.386
	ng/g lípido	2.994	0.085⁺
E-lactona:	ng/gplacenta	0.516	0.473
	ng/g lípido	0.440	0.508
E-diol:	ng/gplacenta	0.379	0.539
	ng/g lípido	0.349	0.555
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.019	0.891
	ng/g lípido	3.433	0.065⁺
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.623	0.430
	ng/g lípido	0.559	0.455

E=Endosulfán.

Pesticidas		Edad+Ganancia de peso	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	1.032	0.310
	ng/g lípido	1.328	0.250
Endrín:	ng/gplacenta	2.170	0.142
	ng/g lípido	2.508	0.114
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.109	0.741
	ng/g lípido	0.247	0.620

Pesticidas		Edad+Ganancia de peso	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.760	0.384
	ng/g lípido	1.079	0.300
Lindano:	ng/gplacenta	0.698	0.404
	ng/g lípido	1.729	0.190
Mirex:	ng/gplacenta	0.318	0.573
	ng/g lípido	0.338	0.561
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.215	0.643
	ng/g lípido	0.027	0.870

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre la edad de la madre, la ganancia de peso y el número de pesticidas por muestra

No apareció ninguna asociación estadística entre el número de pesticidas por muestra, la edad de la madre y la ganancia de peso. El número medio de pesticidas por muestra era mayor entre las mujeres con edad ≤ 32 años y con una ganancia de peso ≤ 12 Kg (7.93 ± 3.12 pesticidas/muestra) y menor entre el grupo de mujeres ≤ 32 años y ganancia de peso > 12 Kg (7.34 ± 2.99 pesticidas por muestra).

Variable	Edad +Ganancia de peso	
	F	P
Número de pesticidas	0.094	0.760

III.- Relación entre la edad de la madre, la ganancia de peso y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, no se encontró ninguna asociación estadística con la TEXB de alfa o beta, aunque los niveles medios de TEXB en la fracción alfa eran mayores en las mujeres con edad >32 años y ganancia de peso de más de 12Kg (5.98 ± 10.22 Eeq pM/g placenta o 132.04 ± 305.17 Eeq pM/g lípido). El grupo de mujeres con niveles medios menores de TEXB de alfa era el de madres con edad ≤ 32 años y ganancia de peso ≤ 12 Kg (2.73 ± 7.03 ng/g placenta o 127.48 ± 373.21 ng/g lípido).

TEXB	Edad +Ganancia de peso	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.006	0.941
EeqpM/g lip	0.786	0.376
Beta: EeqpM/g plac	0.041	0.839
EeqpM/g lip	0.001	0.982

TEXB= Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.3. Edad de la madre y paridad

El número total de madres con edad ≤ 32 años y primíparas era de 93, con edad ≤ 32 años y multíparas era de 59, con edad >32 años y primíparas era de 49, y con edad >32 años y multíparas era de 105.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la edad de la madre, la paridad y pesticidas organoclorados

Según el test ANOVA de dos vías, la edad de la madre junto con la paridad, estaban estadísticamente relacionados con los niveles medios de

p,p'DDE (ng/g lípido) y dieldrín (ng/g lípido). Los niveles medios mayores de p,p'DDE se encontraron entre las madres primíparas y con edad mayor de 32 años (146.98 ± 279.75 ng/g lípido) frente a las primíparas con edad ≤ 32 años (96.54 ± 153.46 ng/g lípido) que presentaban los niveles medios inferiores. Los niveles medios mayores de dieldrín (ng/g lípido), se encontraron en mujeres con edad >32 años y primíparas (18.21 ± 61.63 ng/g lípido) y los niveles medios menores entre mujeres con edad >32 años y multíparas (5.63 ± 30.21 ng/g lípido). Además, existía una tendencia a la asociación estadística entre las variables edad, paridad y los niveles de p,p'DDD y aldrín. Los niveles medios mayores de p,p'DDD (ng/g placenta), se encontraron entre el grupo de mujeres con edad ≤ 32 años y primíparas (2.57 ± 5.59 ng/g placenta) y los niveles medios menores entre mujeres con edad ≤ 32 años y multíparas (1.18 ± 1.75 ng/g placenta). Los niveles medios mayores de aldrín (ng/g placenta), se hallaron entre las mujeres con edad >32 años y multíparas (0.57 ± 1.01 ng/g placenta) y los menores entre mujeres con edad ≤ 32 años y primíparas (0.33 ± 0.16 ng/g placenta).

Pesticidas	Edad +Paridad	
	F	P
o,p'DDT: ng/gplacenta	1.411	0.236
	ng/g lípido	0.899 0.344
p,p'DDT: ng/gplacenta	0.166	0.684
	ng/g lípido	0.185 0.668
o,p'DDD: ng/gplacenta	3.467	0.064⁺
	ng/g lípido	2.713 0.101
p,p'DDE: ng/gplacenta	1.238	0.267
	ng/g lípido	4.036 0.045*
Σ DDTs: ng/gplacenta	0.290	0.590
	ng/g lípido	0.081 0.777

Pesticidas		Edad +Paridad	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	1.514	0.219
	ng/g lípido	0.224	0.636
E-II:	ng/gplacenta	1.265	0.262
	ng/g lípido	2.035	0.155
E-éter:	ng/gplacenta	0.256	0.613
	ng/g lípido	0.013	0.909
E-lactona:	ng/gplacenta	0.071	0.791
	ng/g lípido	1.280	0.259
E-diol:	ng/gplacenta	0.036	0.849
	ng/g lípido	0.684	0.409
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.054	0.816
	ng/g lípido	0.000	0.984
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.004	0.950
	ng/g lípido	0.513	0.474

E=Endosulfán.

Pesticidas		Edad +Paridad	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	3.123	0.078⁺
	ng/g lípido	1.245	0.265
Endrín:	ng/gplacenta	0.000	0.994
	ng/g lípido	0.559	0.455
Dieldrín:	ng/gplacenta	1.761	0.186
	ng/g lípido	5.636	0.018*

Pesticidas		Edad +Paridad	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.439	0.508
	ng/g lípido	0.767	0.382
Lindano:	ng/gplacenta	0.269	0.604
	ng/g lípido	0.038	0.846
Mirex:	ng/gplacenta	1.260	0.263
	ng/g lípido	0.935	0.334
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1.680	0.196
	Ng/g lípido	0.336	0.562

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre la edad de la madre, la paridad y el número de pesticidas por muestra

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, no apareció asociación estadísticamente significativa entre la edad junto con la paridad y el número de pesticidas por tejido placentario. Aún así, el número medio de pesticidas era mayor entre las madres primíparas y con edad ≤ 32 años (7.91 ± 3.03 pesticidas/muestra) frente a las multíparas con edad ≤ 32 años (7.19 ± 3.05 pesticidas/muestra) que presentaban los niveles medios menores.

Variable	Edad +Paridad	
	F	P
Número de pesticidas	0.516	0.473

III.- Relación entre la edad de la madre, la paridad y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al enfrentar la variable carga estrógenica total efectiva de ambas fracciones a las variables edad de la madre y paridad, no se encontró ninguna asociación estadística entre dichas variables. Aún así, las madres multíparas y de edad >32 años, eran las que tenían unos niveles de TEXB en la fracción alfa mayores (6.25 ± 11.50 Eeq pM/g placenta o 263.44 ± 494.13 Eeq pM/g lípido), y las que presentaban los niveles medios menores era el grupo de las primíparas con edad ≤ 32 años (2.53 ± 7.56 Eeq pM/g placenta o 109.54 ± 270.04 Eeq pM/g lípido). Para el caso de beta, las madres multíparas con edad ≤ 32 años presentaban los niveles medios más elevados (27.23 ± 122.67 Eeq pM/g placenta o 1316 ± 2332.59 Eeq pM/g lípido) y las primíparas con edad ≤ 32 años tenían los niveles medios menores (16.22 ± 37.02 Eeq pM/g placenta o 809 ± 2584.58 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Edad +Paridad	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.270	0.604
EeqpM/g lip	0.386	0.535
Beta: EeqpM/g plac	0.299	0.585
EeqpM/g lip	0.033	0.857

TEXB=Carga estrógenica total efectiva.

4.6.1.4. Edad de la madre y hábito tabáquico

El número de madres con edad ≤ 32 años y fumadoras durante el embarazo fue de 44, con edad ≤ 32 años y no fumadoras fue de 109, con edad >32 años y fumadoras fue de 41, y por último, con edad >32 años y no fumadoras fue de 114.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre la edad de la madre, hábito tabáquico y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, se hallaron tendencias a la significación estadística entre las variables estudiadas y los niveles de lindano (ng/g placenta) y mirex. Los niveles medios de estos pesticidas eran mayores para el grupo de mujeres con edad ≤ 32 años y no fumadoras (0.54 ± 0.88 ng/g placenta), en el caso del lindano, y entre las mujeres de edad ≤ 32 años y fumadoras (1.03 ± 3.37 ng/g placenta o 20.60 ± 56.03 ng/g lípido) para el caso del mirex. Y los valores medios mínimos entre el grupo de mujeres con edad ≤ 32 años y fumadoras (0.31 ± 0.26 ng/g placenta) para el caso del lindano y no fumadoras con edad ≤ 32 años (0.43 ± 0.63 ng/g placenta o 10.16 ± 49.38 ng/g lípido) para el caso del mirex.

Pesticidas	Edad +Hábito tabáquico	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	1.491	0.223
	ng/g lípido	0.776
p,p´DDT: ng/gplacenta	1.124	0.290
	ng/g lípido	0.017
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.224	0.636
	ng/g lípido	1.179
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.511	0.475
	ng/g lípido	0.424
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.000	0.986
	ng/g lípido	0.000

Pesticidas		Edad +Hábito tabáquico	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.266	0.607
	ng/g lípido	1.438	0.231
E-II:	ng/gplacenta	1.841	0.176
	ng/g lípido	1.302	0.255
E-éter:	ng/gplacenta	0.022	0.882
	ng/g lípido	0.156	0.693
E-lactona:	ng/gplacenta	1.827	0.177
	ng/g lípido	0.126	0.723
E-diol:	ng/gplacenta	0.028	0.868
	ng/g lípido	0.114	0.736
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.098	0.754
	ng/g lípido	0.075	0.784
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.879	0.349
	ng/g lípido	1.089	0.297

E=Endosulfán.

Pesticidas		Edad +Hábito tabáquico	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.000	1.000
	ng/g lípido	0.067	0.796
Endrín:	ng/gplacenta	0.869	0.352
	ng/g lípido	1.461	0.228
Dieldrín:	ng/gplacenta	1.216	0.271
	ng/g lípido	1.585	0.209

Pesticidas		Edad +Hábito tabáquico	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.030	0.862
	ng/g lípido	0.185	0.667
Lindano:	ng/gplacenta	3.351	0.068⁺
	ng/g lípido	0.191	0.662
Mirex:	ng/gplacenta	3.439	0.065⁺
	ng/g lípido	2.751	0.098⁺
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.830	0.363
	ng/g lípido	1.439	0.231

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre la edad de la madre, hábito tabáquico y el número de pesticidas por muestra

No se encontró asociación estadística entre el número de pesticidas por muestra, la edad de la madre y paridad, pero el número medio de pesticidas era mayor entre el grupo de mujeres con menor edad y fumadoras (7.95 ± 3.48 pesticidas por muestra) frente al grupo de mujeres con menor edad y no fumadoras (7.50 ± 2.90 pesticidas por muestra) que presentaban los niveles medios menores.

Variable	Edad +Paridad	
	F	P
Número de pesticidas	0.210	0.647

III.- Relación entre la edad de la madre, hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, tampoco apareció asociación estadísticamente significativa entre la estrogenicidad de la fracción alfa y beta y las variables edad y hábito tabáquico, pero se observó que el grupo de mujeres con edad superior a 32 y no fumadoras era el que tenía los niveles de TEXB en alfa mayores (5.38 ± 11.20 Eeq pM/g placenta o 236.52 ± 414.21 Eeq pM/g lípido), seguido de las de la misma edad pero que sí fumaron durante el embarazo (4.28 ± 6.77 Eeq pM/g placenta o 225.62 ± 493.29 Eeq pM/g lípido). Con respecto a la TEXB en beta, las madres fumadoras durante el embarazo y con edad >32 años presentaban los niveles medios más elevados (25.03 ± 50.53 Eeq pM/g placenta o 1572.56 ± 3596.14 Eeq pM/g lípido) frente al grupo de mujeres que fumaron y tenían una edad ≤ 32 años que presentaban los niveles medios menores (19.37 ± 40.63 Eeq pM/g placenta o 1352.58 ± 2800.22 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Edad +Paridad	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.503	0.479
EeqpM/g lip	0.326	0.568
Beta: EeqpM/g plac	0.195	0.659
EeqpM/g lip	0.055	0.814

TEXB=Carga estrógenica total efectiva.

4.6.1.5. Índice de masa corporal y ganancia de peso

Las madres que tenían un IMC <25 Kg/m² y ganaron ≤ 12 Kg de peso eran un total de 100, las que también tenían un IMC <25 Kg/m² pero ganaron >12 Kg eran 116, las que tenían un IMC ≥ 25 Kg y ganaron ≤ 12 Kg eran 55 y por último, las que tenían un IMC ≥ 25 Kg y ganaron >12 Kg durante el embarazo, eran un total de 36.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre IMC, ganancia de peso y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de un factor, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variables IMC, ganancia de peso y los niveles de ninguno de los pesticidas estudiados.

Pesticidas	IMC+Ganancia de peso	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.048	0.826
	ng/g lípido	0.264
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.251	0.617
	ng/g lípido	0.438
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.226	0.635
	ng/g lípido	0.739
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.039	0.845
	ng/g lípido	1.999
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.012	0.912
	ng/g lípido	2.398

Pesticidas		IMC+Ganancia de peso	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.490	0.484
	ng/g lípido	1.073	0.301
E-II:	ng/gplacenta	0.143	0.706
	ng/g lípido	0.109	0.742
E-éter:	ng/gplacenta	0.148	0.701
	ng/g lípido	0.790	0.375
E-lactona:	ng/gplacenta	0.128	0.721
	ng/g lípido	0.616	0.433
E-diol:	ng/gplacenta	1.315	0.252
	ng/g lípido	0.326	0.569
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.132	0.717
	ng/g lípido	0.177	0.675
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.708	0.401
	ng/g lípido	1.075	0.301

E=Endosulfán.

Pesticidas		IMC+Ganancia de peso	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.132	0.716
	ng/g lípido	0.263	0.615
Endrín:	ng/gplacenta	0.001	0.979
	ng/g lípido	0.094	0.759
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.067	0.793
	ng/g lípido	0.110	0.741

Pesticidas		IMC+Ganancia de peso	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.125	0.724
	ng/g lípido	0.780	0.378
Lindano:	ng/gplacenta	0.071	0.790
	ng/g lípido	0.404	0.525
Mirex:	ng/gplacenta	0.024	0.876
	ng/g lípido	0.277	0.599
Metoxicloro:	ng/gplacenta	2.469	0.117
	ng/g lípido	1.987	0.160

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre IMC, ganancia de peso y el número de pesticidas por muestra

Tampoco apareció asociación estadísticamente significativa entre la variable número de pesticidas, ganancia de peso e índice de masa corporal. Pero se observó que el número medio de pesticidas por tejido placentario era mayor entre las madres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y un cambio de peso <12Kg (7.82 \pm 2.94 pesticidas por muestra de placenta) y menor entre las madres con un IMC <25 Kg/m² y un cambio de peso >12Kg (7.06 \pm 3.01 pesticidas por muestra)

Variable	IMC+Ganancia de peso	
	F	P
Número de pesticidas	0.342	0.559

III.- Relación entre IMC, ganancia de peso y la TEXTB de la fracción alfa y beta

Por último, tampoco se encontró asociación estadística entre el IMC, la ganancia de peso y los niveles de TEXTB de la fracción alfa y beta, aunque los

niveles medios de carga estrógena en la fracción alfa eran mayores en el grupo de mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y una ganancia de peso de más de 12Kg (6.30 \pm 20.68 Eeq pM/g placenta o 234.35 \pm 580.50 Eeq pM/g lípido) y menores en el grupo de madres con IMC <25 Kg/m² y una ganancia de peso de <12 Kg (3.79 \pm 8.96 Eeq pM/g placenta o 170.24 \pm 421.80 Eeq pM/g lípido).

TEXB	IMC+Ganancia de peso	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.523	0.470
EeqpM/g lip	0.397	0.529
Beta: EeqpM/g plac	0.129	0.720
EeqpM/g lip	0.030	0.864

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.6. Índice de masa corporal y lugar de residencia

El número total de mujeres con un IMC <25 Kg/m² y una residencia rural era de 128, con IMC <25 Kg/m² y residencia urbana era de 88, IMC ≥ 25 Kg/m² y residencia rural era de 53 y por último, el número total de mujeres con IMC ≥ 25 Kg/m² y residencia urbana fue de 38.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (*).

I.- Relación entre IMC, lugar de residencia y pesticidas organoclorados

Se halló una asociación estadística con los niveles de endosulfán-diol (ng/g placenta), con niveles medios mayores en el grupo de mujeres que vivía en un área urbana e IMC ≥ 25 Kg/m² (0.29 \pm 0.80 ng/g placenta) y menores entre el grupo de mujeres que vivía en un área urbana e IMC < 25 Kg/m² (2.69 \pm 4.14 ng/g placenta).

Pesticidas	IMC+Residencia	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.414	0.521
	ng/g lípido	0.703
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.086	0.769
	ng/g lípido	0.573
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.645	0.423
	ng/g lípido	0.628
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.046	0.830
	ng/g lípido	0.305
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.606	0.437
	ng/g lípido	1.751

Pesticidas	IMC+Residencia	
	F	P
E -I: ng/gplacenta	0.082	0.774
	ng/g lípido	0.103
E-II: ng/gplacenta	0.084	0.772
	ng/g lípido	0.005
E-éter: ng/gplacenta	1.014	0.315
	ng/g lípido	0.329
E-lactona: ng/gplacenta	0.016	0.899
	ng/g lípido	0.606
E-diol: ng/gplacenta	5.296	0.022*
	ng/g lípido	0.061
E-sulfato: ng/gplacenta	0.158	0.691
	ng/g lípido	0.001
ΣEndos: ng/gplacenta	1.329	0.250
	ng/g lípido	0.010

E=Endosulfán.

Pesticidas		IMC+Residencia	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.501	0.480
	ng/g lípido	0.399	0.528
Endrín:	ng/gplacenta	1.037	0.309
	ng/g lípido	0.799	0.372
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.250	0.618
	ng/g lípido	0.034	0.854

Pesticidas		IMC+Residencia	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	1.494	0.222
	ng/g lípido	1.424	0.234
Lindano:	ng/gplacenta	0.148	0.701
	ng/g lípido	0.556	0.456
Mirex:	ng/gplacenta	1.915	0.167
	ng/g lípido	0.014	0.906
Metoxicloro:	ng/gplacenta	2.688	0.102
	ng/g lípido	0.989	0.321

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre IMC, lugar de residencia y el número de pesticidas por muestra

El número de pesticidas por muestra no estaba estadísticamente asociado con las variables IMC y lugar de residencia. A pesar de no existir asociación, se observó que los niveles más altos se encontraban en las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y un área de residencia urbana (7.94 ± 3.13 pesticidas por muestra de tejido placentario) frente a los niveles menores hallados en las mujeres con un IMC < 25 Kg/m² y un área de residencia rural (7.35 ± 2.87 pesticidas por muestra).

Variable	IMC+Residencia	
	F	P
Número de pesticidas	0.082	0.775

III.- Relación entre IMC, lugar de residencia y la TEXB de la fracción alfa y beta

La TEXB de las fracciones alfa y beta no estaba asociada estadísticamente con las variables IMC y lugar de residencia, pero los niveles medios mayores de estrogenicidad en alfa se encontraron entre las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y lugar de residencia rural (5.36 ± 17.22 Eeq pM/g placenta) y los menores concentraciones entre mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y lugar de residencia urbana (3.48 ± 7.80 Eeq pM/g placenta). Para el caso de la fracción beta, también las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y lugar de residencia rural (38.98 ± 130.85 Eeq pM/g placenta) presentaban los niveles medios mayores y las madres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y lugar de residencia urbana (11.84 ± 24.65 Eeq pM/g placenta) los valores medios menores.

TEXB	IMC+Residencia	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.549	0.460
EeqpM/g lip	0.322	0.571
Beta: EeqpM/g plac	0.812	0.368
EeqpM/g lip	0.757	0.385

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.7. Índice de masa corporal y paridad

El número total de madres con IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$ y primíparas era de 106, IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$ y multíparas 112, IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y primíparas 35, e IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y multíparas 54.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01 (**)$, $p \leq 0.05 (*)$ y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1 (+)$.

I.- Relación entre IMC, paridad y pesticidas organoclorados

La única asociación estadística que apareció al relacionar la variable IMC, paridad y los niveles de los distintos pesticidas organoclorados estudiados, fue para el caso del aldrín (ng/g placenta). Al hallar las medias de los diferentes grupos se observó que el valor medio mayor de este pesticida se encontraba en las mujeres que tenían un índice de masa corporal $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y eran multíparas ($0.75 \pm 1.37 \text{ ng/g placenta}$) y los niveles medios menores en madres con IMC $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y primíparas ($0.39 \pm 0.25 \text{ ng/g placenta}$) (Test ANOVA de dos vías, modelo general lineal).

Pesticidas	IMC+Paridad	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.870	0.352
	ng/g lípido	0.478 0.490
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.048	0.826
	ng/g lípido	0.299 0.585
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.588	0.444
	ng/g lípido	0.680 0.410
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.334	0.564
	ng/g lípido	0.179 0.673
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.981	0.323
	ng/g lípido	1.037 0.309

Pesticidas		IMC+Paridad	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.064	0.800
	ng/g lípido	0.113	0.737
E-II:	ng/gplacenta	0.299	0.585
	ng/g lípido	0.244	0.622
E-éter:	ng/gplacenta	0.577	0.448
	ng/g lípido	1.647	0.200
E-lactona:	ng/gplacenta	0.723	0.396
	ng/g lípido	0.092	0.762
E-diol:	ng/gplacenta	0.035	0.852
	ng/g lípido	0.000	0.993
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.005	0.944
	ng/g lípido	0.019	0.892
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.002	0.964
	ng/g lípido	0.011	0.918

E=Endosulfán.

Pesticidas		IMC+Paridad	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	4.730	0.030*
	ng/g lípido	0.205	0.631
Endrín:	ng/gplacenta	0.344	0.558
	ng/g lípido	0.597	0.440
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.953	0.330
	ng/g lípido	0.276	0.599

Pesticidas		IMC+Paridad	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	1.231	0.268
	ng/g lípido	0.691	0.407
Lindano:	ng/gplacenta	0.016	0.899
	ng/g lípido	0.000	0.998
Mirex:	ng/gplacenta	1.251	0.264
	ng/g lípido	1.180	0.278
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1.766	0.185
	ng/g lípido	1.205	0.273

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre IMC, paridad y el número de pesticidas por muestra

Al aplicar el test ANOVA de dos vías no se halló asociación estadística entre el número de pesticidas por muestra y las variables IMC y paridad. A pesar de no encontrar dicha asociación, el número medio de pesticidas era mayor entre las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y primíparas (8.26 ± 3.56 pesticidas/muestra), frente a las madres con IMC < 25 Kg/m² y múltiparas, que presentaban los niveles medios de pesticidas por muestra menores (7.30 ± 2.73 pesticidas/muestra).

Variable	IMC+Paridad	
	F	P
Número de pesticidas	0.107	0.743

III.- Relación entre IMC, paridad y la TEXTB de la fracción alfa y beta

El IMC y paridad, de forma conjunta, no tenían una asociación estadísticamente significativa con los niveles de TEXTB de alfa y beta. A pesar de

ello, el grupo de mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y multíparas, tenían niveles de estrogenicidad en alfa mayores que el resto de los grupos (6.07±17.44 Eeq pM/g placenta o 192.04±473.8744 Eeq pM/g lípido), frente a las madres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y primíparas, que presentaban los niveles medios menores (2.27±4.49 Eeq pM/g placenta o 161.58±320.58 Eeq pM/g lípido). Para el caso de la fracción beta, las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y multíparas, tenían niveles de estrogenicidad en beta mayores que el resto de los grupos (32.97±126.37 Eeq pM/g placenta o 1322.43±1354.28 Eeq pM/g lípido) y el grupo de mujeres con un IMC < 25 Kg/m² y primíparas, eran las que tenían niveles medios menores de TEXB de beta (15.44±32.23 Eeq pM/g placenta o 911.43±1688.88 Eeq pM/g lípido).

TEXB	IMC+Paridad	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.076	0.783
EeqpM/g lip	0.834	0.362
Beta: EeqpM/g plac	0.154	0.695
EeqpM/g lip	1.072	0.301

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.8. Índice de masa corporal y hábito tabáquico

El número total de mujeres con un IMC < 25 Kg/m² y que fumaron durante el embarazo era de 66, 153 era el total de mujeres con IMC < 25 Kg/m² y no fumadoras, 20 el total de mujeres con IMC ≥ 25 Kg/m² y fumadoras, y 69 el número de madres con IMC ≥ 25 Kg/m² y que no fumaron durante el embarazo.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre IMC, hábito tabáquico y pesticidas organoclorados

El índice de masa corporal junto con el hábito tabáquico tendía a estar estadísticamente asociado con los niveles del pesticida endosulfán-diol (ng/g placenta), con concentraciones de este compuesto mayores entre las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y que fumaron durante el embarazo (10.20 ± 11.57 ng/g placenta) con respecto a los valores medios menores en el grupo de mujeres con IMC < 25 Kg/m² y fumadoras (2.79 ± 4.06 ng/g placenta).

Pesticidas	IMC+Hábito tabáquico	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.572	0.450
	ng/g lípido	0.327
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.344	0.558
	ng/g lípido	0.048
o,p´DDD: ng/gplacenta	1.964	0.162
	ng/g lípido	0.187
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.253	0.615
	ng/g lípido	1.269
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.043	0.836
	ng/g lípido	0.000

Pesticidas		IMC+Hábito tabáquico	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	1.081	0.299
	ng/g lípido	1.334	0.249
E-II:	ng/gplacenta	0.000	0.999
	ng/g lípido	0.011	0.916
E-éter:	ng/gplacenta	1.367	0.243
	ng/g lípido	1.770	0.184
E-lactona:	ng/gplacenta	0.105	0.746
	ng/g lípido	0.125	0.724
E-diol:	ng/gplacenta	3.429	0.065⁺
	ng/g lípido	0.010	0.921
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.077	0.781
	ng/g lípido	1.349	0.246
Σ Endos:	ng/gplacenta	1.310	0.263
	ng/g lípido	0.000	0.993

E=Endosulfán.

Pesticidas		IMC+Hábito tabáquico	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.836	0.361
	ng/g lípido	1.459	0.228
Endrín:	ng/gplacenta	0.127	0.722
	ng/g lípido	0.684	0.409
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.398	0.529
	ng/g lípido	1.954	0.163

Pesticidas		IMC+Hábito tabáquico	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.005	0.942
	ng/g lípido	0.018	0.893
Lindano:	ng/gplacenta	0.573	0.450
	ng/g lípido	1.760	0.186
Mirex:	ng/gplacenta	1.097	0.296
	ng/g lípido	0.419	0.518
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.063	0.802
	ng/g lípido	0.448	0.504

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre IMC, hábito tabáquico y el número de pesticidas por muestra

El número de pesticidas por muestra no estaba estadísticamente asociado con el IMC y hábito tabáquico. El número medio de pesticidas por muestra tenía un valor muy parecido entre el grupo de mujeres con $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y que fumaban (7.85 ± 3.15 pesticidas/muestra) e $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y que no fumaban (7.88 ± 3.30 pesticidas/muestra). Los niveles medios menores se hallaron entre las madres con $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$ y que no fumaron durante el embarazo (7.36 ± 2.71 pesticidas/muestra) (Test ANOVA de dos vías).

Variable	IMC+Hábito tabáquico	
	F	P
Número de pesticidas	0.287	0.593

III.- Relación entre IMC, hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta

Tampoco existía asociación estadísticamente significativa entre las variables IMC y hábito tabáquico y la TEXB de alfa y beta, pero, a pesar de no existir dicha asociación, los valores medios de estrogenicidad de la fracción alfa eran mayores entre las mujeres con un IMC ≥ 25 Kg/m² y que no fumaron durante el embarazo (4.96 ± 15.61 Eeq pM/g placenta) y menores entre las madres con un IMC < 25 Kg/m² y que fumaron durante el embarazo (3.15 ± 5.27 Eeq pM/g placenta). En el caso de la fracción beta, el grupo de mujeres con IMC ≥ 25 Kg/m² y que no fumaron durante el embarazo (33.65 ± 115.31 Eeq pM/g placenta) tenían los niveles medios mayores, y las madres con IMC < 25 Kg/m² y que no fumaron durante el embarazo (13.85 ± 27.25 Eeq pM/g placenta) los niveles medios menores.

TEXB	IMC+Hábito tabáquico	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.454	0.501
EeqpM/g lip	0.483	0.487
Beta: EeqpM/g plac	2.559	0.111
EeqpM/g lip	2.452	0.118

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.9. Ganancia de peso y lugar de residencia

El número de madres que ganó ≤ 12 Kg durante el embarazo y que vivía en un área rural era de 85, el número de madres con una ganancia de peso ≤ 12 Kg y residencia urbana fue de 70, con ganancia de peso > 12 Kg y residencia rural un total de 95, y por último, con ganancia de peso > 12 Kg y que vivía en una residencia urbana un total de 57.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre ganancia de peso, lugar de residencia y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, la ganancia de peso, junto con la residencia, estaban asociados estadísticamente con los niveles de endrín (ng/g lípido) y las variables ganancia de peso y residencia, con niveles mayores de este compuesto en madres con una ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ y que vivían en un área urbana (57.84 ± 139.66 ng/g lípido) con respecto a aquellas que vivían en un área urbana pero ganaron $> 12\text{Kg}$ (15.65 ± 49.27 ng/g lípido) que presentaban los niveles medios menores. Además, apareció una tendencia a la asociación estadística con la sumatoria de DDTs (ng/g lípido), con valores medios mayores entre las madres que ganaron $\leq 12\text{Kg}$ durante el embarazo y que vivían en un área urbana (393.40 ± 752.76 ng/g lípido) y menores entre las que ganaron $\leq 12\text{Kg}$ y vivían en un área rural (197.47 ± 377.86 ng/g lípido).

Pesticidas	Ganancia de peso+Residencia	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.647	0.422
	ng/g lípido	0.270
p,p´DDT: ng/gplacenta	1.846	0.175
	ng/g lípido	2.226
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.040	0.842
	ng/g lípido	0.105
p,p´DDE: ng/gplacenta	1.048	0.307
	ng/g lípido	2.232
Σ DDTs: ng/gplacenta	1.389	0.239
	ng/g lípido	3.230

Pesticidas		Ganancia de peso+Residencia	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.136	0.712
	ng/g lípido	0.419	0.518
E-II:	ng/gplacenta	0.696	0.405
	ng/g lípido	0.024	0.876
E-éter:	ng/gplacenta	0.482	0.488
	ng/g lípido	0.200	0.655
E-lactona:	ng/gplacenta	0.379	0.538
	ng/g lípido	0.417	0.519
E-diol:	ng/gplacenta	1.321	0.251
	ng/g lípido	1.790	0.182
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.216	0.643
	ng/g lípido	0.002	0.964
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.018	0.895
	ng/g lípido	0.872	0.351

E=Endosulfán.

Pesticidas		Ganancia de peso+Residencia	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.041	0.840
	ng/g lípido	0.016	0.900
Endrín:	ng/gplacenta	1.890	0.170
	ng/g lípido	5.344	0.021*
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.053	0.819
	ng/g lípido	0.000	0.998

Pesticidas		Ganancia de peso+Residencia	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.246	0.620
	ng/g lípido	1.695	0.194
Lindano:	ng/gplacenta	0.100	0.752
	ng/g lípido	0.102	0.750
Mirex:	ng/gplacenta	0.412	0.521
	ng/g lípido	2.045	0.154
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1.156	0.283
	ng/g lípido	2.581	0.109

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre ganancia de peso, lugar de residencia y el número de pesticidas por muestra

El número de pesticidas por muestra no estaba asociado con las variables ganancia de peso y residencia; aún así, las mujeres que vivían en una zona urbana y que ganaron $\leq 12\text{Kg}$, tenían un número medio de pesticidas por tejido placentario mayor que el resto de los grupos (7.92 ± 2.83 pesticidas/muestra) (Test ANOVA de dos vías) y las que vivían en un área rural y ganaron $>12\text{Kg}$, presentaron los niveles medios menores (7.24 ± 2.89 pesticidas/muestra).

Variable	Ganancia de peso+Residencia	
	F	P
Número de pesticidas	0.094	0.759

III.- Relación entre ganancia de peso, lugar de residencia y la TEXB de la fracción alfa y beta

Tampoco se halló asociación estadística al aplicar el test ANOVA de dos vías, entre las variables ganancia de peso y lugar de residencia y la TEXB de la fracción alfa y beta. Aún así, las mujeres que vivían en una zona rural y que ganaron más de 12 Kg, eran las que tenían mayores niveles medios de estrogenicidad de alfa en su tejido placentario (5.46 ± 15.06 Eeq pM/g placenta o 220.28 ± 513.17 Eeq pM/g lípido) y las que vivían en un área rural y ganaron ≤ 12 Kg los niveles medios menores (3.37 ± 7.05 Eeq pM/g placenta o 147.15 ± 316.15 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Ganancia de peso+Residencia	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.602	0.438
EeqpM/g lip	0.733	0.392
Beta: EeqpM/g plac	0.656	0.419
EeqpM/g lip	0.607	0.437

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.10. Ganancia de peso y paridad

El número total de mujeres con una ganancia de peso ≤ 12 Kg y primíparas era 63, con ganancia de peso ≤ 12 Kg y multíparas era de 93, con ganancia de peso > 12 Kg y primíparas era de 80, y con ganancia de peso > 12 Kg y multíparas era de 72.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre ganancia de peso, paridad y pesticidas organoclorados

Se encontró una asociación estadística significativa entre los niveles de endosulfán-I (ng/g lípido), lindano (ng/g lípido) y las variables ganancia de peso y paridad. Los niveles medios mayores de endosulfán-I se encontraron entre las mujeres con una ganancia de peso >12Kg y primíparas (31.94 ± 99.45 ng/g lípido) y los niveles medios mayores de lindano entre las mujeres con una ganancia de peso ≤ 12 Kg y múltiparas (20.41 ± 42.24 ng/g lípido). Los niveles medios menores se encontraron entre mujeres múltiparas que ganaron >12Kg (9.84 ± 19.67 ng/g lípido) para el caso del endosulfán-I y entre mujeres con una ganancia de peso >12Kg y múltiparas (7.49 ± 22.05 ng/g lípido) para el caso del lindano. También existía una tendencia a la asociación estadística con los niveles de p,p'DDE (ng/g lípido) y endosulfán-II. En ambos casos, las primíparas con una ganancia de peso >12 Kg tenían niveles mayores (131.68 ± 254.33 ng/g lípido y 1.61 ± 5.65 ng/g placenta o 29.43 ± 123.37 ng/g lípido, respectivamente) y niveles menores entre el grupo de madres múltiparas con una ganancia de peso >12 Kg (72.31 ± 147.61 ng/g lípido y 0.55 ± 2.14 ng/g placenta o 1.86 ± 6.57 ng/g lípido, respectivamente).

Pesticidas	Ganancia de peso+Paridad	
	F	P
o,p'DDT: ng/gplacenta	0.000	0.997
	ng/g lípido	0.426
p,p'DDT: ng/gplacenta	0.778	0.378
	ng/g lípido	0.508
o,p'DDD: ng/gplacenta	0.005	0.946
	ng/g lípido	0.739
p,p'DDE: ng/gplacenta	0.369	0.544
	ng/g lípido	2.998
Σ DDTs: ng/gplacenta	0.036	0.850
	ng/g lípido	0.015

Pesticidas		Ganancia de peso+Paridad	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.801	0.372
	ng/g lípido	5.144	0.024*
E-II:	ng/gplacenta	2.736	0.099⁺
	ng/g lípido	3.730	0.054⁺
E-éter:	ng/gplacenta	0.371	0.543
	ng/g lípido	0.058	0.810
E-lactona:	ng/gplacenta	1.206	0.273
	ng/g lípido	0.005	0.946
E-diol:	ng/gplacenta	0.075	0.784
	ng/g lípido	0.406	0.525
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.302	0.583
	ng/g lípido	0.345	0.558
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.714	0.399
	ng/g lípido	1.582	0.209

E=Endosulfán.

Pesticidas		Ganancia de peso+Paridad	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.575	0.449
	ng/g lípido	2.313	0.129
Endrín:	ng/gplacenta	1.904	0.169
	ng/g lípido	0.184	0.668
Dieldrín:	ng/gplacenta	1.373	0.242
	ng/g lípido	0.543	0.462

Pesticidas		Ganancia de peso+Paridad	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.226	0.635
	ng/g lípido	1.111	0.293
Lindano:	ng/gplacenta	2.950	0.087⁺
	ng/g lípido	8.258	0.004^{**}
Mirex:	ng/gplacenta	0.115	0.735
	ng/g lípido	0.943	0.332
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.275	0.601
	ng/g lípido	2.361	0.125

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre ganancia de peso, paridad y el número de pesticidas por muestra

El número de pesticidas por muestra no estaba asociado estadísticamente con las variables ganancia de peso y paridad, aunque las mujeres con una ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ y primíparas tenían mayor número medio de pesticidas por muestra (8.03 ± 3.14 pesticidas por muestra de tejido placentario), frente a las madres múltiparas y con ganancia de peso $> 12\text{Kg}$, que presentaron el número medio de pesticidas menor (7.01 ± 2.70 pesticidas por muestra).

Variable	Ganancia de peso+paridad	
	F	P
Número de pesticidas	0.254	0.615

III.- Relación entre ganancia de peso, paridad y la TEXB de la fracción alfa y beta

Tampoco apareció una asociación estadísticamente significativa entre la ganancia de peso, paridad y niveles de estrogenicidad de la fracción alfa y beta. A pesar de no existir asociación estadística, se observó que la estrogenicidad de la fracción alfa era mayor entre mujeres que ganaron >12Kg y que eran multíparas (7.12±8.20 Eeq pM/g placenta o 264.73±565.20 Eeq pM/g lípido) y menor entre el grupo de madres que ganaron >12Kg y que eran primíparas (1.99±5.10 Eeq pM/g placenta o 103.59±251±251.21 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Ganancia de peso+Paridad	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.265	0.607
EeqpM/g lip	0.075	0.784
Beta: EeqpM/g plac	0.815	0.367
EeqpM/g lip	1.866	0.173

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.11. Ganancia de peso y hábito tabáquico

El número de mujeres que ganaron ≤12Kg y fumaron era de 63, que ganaron ≤12Kg y no fumaron era de 93, con ganancia de peso >12Kg y fumadoras era de 80, y con ganancia de peso >12Kg y no fumadoras era de 72.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre ganancia de peso, hábito tabáquico y pesticidas organoclorados

No apareció ninguna asociación estadísticamente significativa entre ganancia de peso, hábito tabáquico y niveles de pesticidas.

Pesticidas	Ganancia de peso+Hábito tabáquico	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.119	0.730
	ng/g lípido	0.288
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.005	0.941
	ng/g lípido	0.100
o,p´DDD: ng/gplacenta	1.189	0.277
	ng/g lípido	0.885
p,p´DDE: ng/gplacenta	2.131	0.145
	ng/g lípido	1.230
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.281	0.596
	ng/g lípido	0.113

Pesticidas	Ganancia de peso+Hábito tabáquico	
	F	P
E -I: ng/gplacenta	1.713	0.192
	ng/g lípido	0.937
E-II: ng/gplacenta	0.775	0.379
	ng/g lípido	0.760
E-éter: ng/gplacenta	0.034	0.854
	ng/g lípido	0.085
E-lactona: ng/gplacenta	0.758	0.385
	ng/g lípido	0.038
E-diol: ng/gplacenta	2.243	0.135
	ng/g lípido	0.767
E-sulfato: ng/gplacenta	0.590	0.443
	ng/g lípido	0.023
ΣEndos: ng/gplacenta	0.273	0.602
	ng/g lípido	0.167

E=Endosulfán.

Pesticidas	Ganancia de peso+Hábito tabáquico	
	F	P
Aldrín: ng/gplacenta	0.297	0.586
ng/g lípido	0.021	0.884
Endrín: ng/gplacenta	0.700	0.403
ng/g lípido	0.629	0.428
Dieldrín: ng/gplacenta	1.277	0.259
ng/g lípido	0.054	0.817

Pesticidas	Ganancia de peso+Hábito tabáquico	
	F	P
HCB: ng/gplacenta	0.006	0.938
ng/g lípido	0.349	0.555
Lindano: ng/gplacenta	0.025	0.874
ng/g lípido	0.004	0.948
Mirex: ng/gplacenta	0.061	0.805
ng/g lípido	0.801	0.371
Metoxicloro: ng/gplacenta	0.641	0.424
ng/g lípido	0.590	0.443

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre ganancia de peso, hábito tabáquico y el número de pesticidas por muestra

Según el test ANOVA de dos vías, no existía ninguna asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas por muestra y la ganancia de peso y hábito tabáquico. Las madres no fumadoras y con una ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ y las fumadoras con una ganancia de peso $>12\text{Kg}$, eran las que tenían un número medio de pesticidas mayor (7.85 ± 2.89 y 7.84 ± 2.91 pesticidas/muestra, respectivamente). Las mujeres que no fumaron y

que ganaron >12Kg, presentaban los niveles medios menores (7.15 ± 2.89 pesticidas por muestra).

Variable	Ganancia de peso+Hábito tabáquico	
	F	P
Número de pesticidas	0.899	0.344

III.- Relación entre ganancia de peso, hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta

Tampoco apareció asociación estadística al aplicar el test ANOVA de dos vías entre las variables ganancia de peso, hábito tabáquico y TEXB de alfa y beta. Aún así, las madres que no fumaban y que ganaron más de 12Kg (5.20 ± 14.31 Eeq pM/g placenta o 213.96 ± 489.00 Eeq pM/g lípido), seguido de las que fumaban y también ganaron más de 12 Kg (4.42 ± 10.86 Eeq pM/g placenta o 170.82 ± 356.27 Eeq pM/g lípido), eran las que tenían los niveles medios más altos de TEXB en la fracción alfa. Los niveles medios menores se encontraron en madres que no fumaron y con ganancia de peso ≤ 12 Kg (3.56 ± 8.62 Eeq pM/g placenta o 130.04 ± 306.87 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Ganancia de peso+Hábito tabáquico	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.180	0.672
EeqpM/g lip	2.462	0.118
Beta: EeqpM/g plac	0.223	0.637
EeqpM/g lip	0.522	0.471

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.12. Lugar de residencia y actividad laboral durante el embarazo

El número de madres que vivían en una zona rural y que trabajaban en el campo fue de 12, 123 vivían en una zona rural pero no trabajaban en la agricultura, 3 vivían en un área urbana y trabajaban en agricultura y 172 vivían en una zona urbana y no trabajaban en el campo.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre lugar de residencia, actividad laboral y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, no apareció ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variables ruralidad y actividad laboral (trabajo en agricultura o no) y los niveles de de los diferentes pesticidas estudiados.

Pesticidas	Residencia+Actividad laboral	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.075	0.785
	ng/g lípido	0.753
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.075	0.784
	ng/g lípido	0.769
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.053	0.818
	ng/g lípido	0.911
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.163	0.687
	ng/g lípido	0.962
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.000	0.989
	ng/g lípido	0.962

Pesticidas		Residencia+Actividad laboral	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.011	0.915
	ng/g lípido	0.085	0.770
E-II:	ng/gplacenta	0.082	0.775
	ng/g lípido	0.101	0.750
E-éter:	ng/gplacenta	0.118	0.731
	ng/g lípido	0.008	0.929
E-lactona:	ng/gplacenta	0.296	0.587
	ng/g lípido	0.501	0.480
E-diol:	ng/gplacenta	0.020	0.887
	ng/g lípido	1.175	0.279
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.251	0.617
	ng/g lípido	0.081	0.776
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.091	0.764
	ng/g lípido	0.744	0.389

E=Endosulfán.

Pesticidas		Residencia+Actividad laboral	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.128	0.721
	ng/g lípido	0.499	0.481
Endrín:	ng/gplacenta	0.208	0.649
	ng/g lípido	0.290	0.591
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.006	0.937
	ng/g lípido	0.236	0.628

Pesticidas		Residencia+Actividad laboral	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.028	0.866
	ng/g lípido	0.109	0.741
Lindano:	ng/gplacenta	0.114	0.736
	ng/g lípido	0.249	0.618
Mirex:	ng/gplacenta	0.072	0.788
	ng/g lípido	0.233	0.637
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.338	0.562
	ng/g lípido	0.826	0.364

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre lugar de residencia, actividad laboral y el número de pesticidas por muestra

Tampoco apareció una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas por muestra de tejido placentario, lugar de residencia y actividad laboral. Aún así, se observó que el grupo de mujeres que vivían en una zona rural y trabajaban en agricultura, tenían niveles medios de pesticidas más elevados que el resto de la población (9.33 ± 2.08 pesticidas/muestra), seguido de las que también trabajaban en el campo pero vivían en un área urbana (8.08 ± 3.32 pesticidas/muestra).

Variable	Residencia+Actividad laboral	
	F	P
Número de pesticidas	0.140	0.626

III.- Relación entre lugar de residencia, actividad laboral y la TEXB de la fracción alfa y beta

La carga estrogénica total efectiva de alfa y beta tampoco estaba asociada con las variables ruralidad y actividad laboral. Pero, las mujeres que trabajaban en agricultura y que vivían en un área rural poseían niveles mayores de TEXB en alfa (4.87 ± 6.71 Eeq pM/ g placenta), seguido de cerca de las que vivían en un área rural y no trabajaban en agricultura (4.22 ± 12.17 Eeq pM/ g placenta).

TEXB	Ruralidad+Actividad laboral	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.017	0.896
EeqpM/g lip	0.264	0.608
Beta: EeqpM/g plac	0.000	0.994
EeqpM/g lip	0.947	0.331

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.13. Actividad laboral y percepción de la exposición a productos químicos

El número de madres que trabajaba en agricultura y que percibió exposición a productos químicos durante el embarazo fue de 6, 9 eran agricultoras pero no percibieron exposición, 30 no trabajaban en el campo y percibieron estar expuestas y 257 no eran agricultoras y no expuestas.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre actividad laboral, percepción de exposición y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías, apareció una tendencia a la asociación estadística entre las variables actividad laboral, percepción de la

exposición a compuestos químicos por parte de las madres durante el embarazo y los niveles de los pesticidas endosulfán-lactona (ng/g lípido), aldrín (ng/g lípido) y lindano (ng/g lípido). Los niveles medios de endosulfán-lactona eran mayores en el grupo de mujeres que no trabajaban en agricultura y que reconocían haber estado expuestas a sustancias químicas durante el embarazo (143.40 ± 527.22 ng/g lípido) y menores entre el grupo de mujeres agricultoras y que afirmaron estar expuestas (25.14 ± 29.35 ng/g lípido). Para el caso del aldrín, los niveles medios de este compuesto eran mayores en el tejido placentario de madres que sí estuvieron expuestas a productos químicos y que trabajaban en agricultura (27.65 ± 55.17 ng/g lípido) y menores entre madres no expuestas pero que sí trabajaban en agricultura (0.28 ± 0.08 ng/g lípido). Por último, los niveles medios de lindano eran mayores en los tejidos placentarios de madres que trabajaban en agricultura y afirmaron estar expuestas a productos químicos (31.66 ± 58.07 ng/g lípido) y los menores entre madres que negaron estar expuestas y agricultoras (5.60 ± 6.52 ng/g lípido).

Pesticidas	Actividad laboral+Percepción de exposición	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.020	0.887
	ng/g lípido	0.483
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.240	0.624
	ng/g lípido	0.156
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.116	0.734
	ng/g lípido	0.161
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.595	0.441
	ng/g lípido	2.516
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.840	0.360
	ng/g lípido	0.260

Pesticidas		Actividad laboral+Percepción de exposición	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.318	0.573
	ng/g lípido	0.447	0.504
E-II:	ng/gplacenta	0.522	0.470
	ng/g lípido	0.284	0.595
E-éter:	ng/gplacenta	0.496	0.482
	ng/g lípido	0.163	0.687
E-lactona:	ng/gplacenta	1.884	0.171
	ng/g lípido	2.808	0.095⁺
E-diol:	ng/gplacenta	0.000	0.987
	ng/g lípido	0.007	0.935
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.159	0.690
	ng/g lípido	0.012	0.913
Σ Endos:	ng/gplacenta	0.373	0.542
	ng/g lípido	0.391	0.532

E=Endosulfán.

Pesticidas		Actividad laboral+Percepción de exposición	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	2.402	0.122
	ng/g lípido	3.345	0.068⁺
Endrín:	ng/gplacenta	0.590	0.443
	ng/g lípido	0.557	0.456
Dieldrín:	ng/gplacenta	1.011	0.316
	ng/g lípido	2.451	0.119

Pesticidas		Actividad laboral+Percepción de exposición	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	1.185	0.277
	ng/g lípido	0.717	0.398
Lindano:	ng/gplacenta	0.344	0.564
	ng/g lípido	3.295	0.071⁺
Mirex:	ng/gplacenta	0.206	0.650
	ng/g lípido	0.061	0.806
Metoxicloro:	ng/gplacenta	2.053	0.153
	ng/g lípido	0.118	0.731

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre actividad laboral, percepción de exposición y el número de pesticidas por muestra

Al aplicar el test ANOVA de un factor, apareció una asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas por muestra y las variables actividad laboral y percepción de la exposición a productos químicos. El número medio de pesticidas mayor se encontró entre las mujeres que percibieron estar expuestas y que trabajaban en agricultura (11.00 ± 2.68 pesticidas por muestra de tejido placentario), frente a las que negaron exposición pero sí trabajaban en agricultura que presentaban los niveles medios menores (6.55 ± 2.88 pesticidas por muestra de tejido placentario).

Variable	Actividad laboral+Percepción de exposición	
	F	P
Número de pesticidas	7.430	0.007**

III.- Relación entre actividad laboral, percepción de exposición y la TEXB de la fracción alfa y beta

Los niveles de TEXB de la fracción beta (Eeq pM/g lípido) tendían a estar asociados con la actividad laboral y con la percepción de exposición a contaminantes químicos que las madres tenían. Las madres expuestas y que trabajaban en agricultura tenían los niveles medios mayores de TEXB de beta (2901.75 ± 6840.32 Eeq pM/g lípido) y las mujeres que no trabajaban en agricultura y admitieron haber estado expuestas a sustancias químicas presentaban los niveles medios menores (654.22 ± 1310.13 Eeq pM/g lípido). A pesar de no existir dicha asociación para el caso de alfa, los niveles medios de TEXB de alfa eran mayores entre madres que afirmaron haber estado expuestas y que no trabajaban en agricultura (6.61 ± 13.53 Eeq pM/g placenta o 247.39 ± 430.06 Eeq pM/g lípido), seguido de cerca de las madres que negaron exposición y que no trabajaban en agricultura (5.48 ± 7.34 Eeq pM/g placenta o 228.12 ± 317.51 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Actividad laboral+Percepción de exposición	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.612	0.435
EeqpM/g lip	0.907	0.342
Beta: EeqpM/g plac	0.065	0.799
EeqpM/g lip	3.738	0.054⁺

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.14. Lugar de residencia y paridad

El número de madres que vivían en un área rural y que eran primíparas era de 78, el número de mujeres que vivían en un área rural pero eran múltiparas era de 104, el total de madres que vivían en un área urbana y eran primíparas era de 62 y el número total que vivían en un área urbana y eran múltiparas era de 64.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01(**)$, $p \leq 0.05(*)$ y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1(+)$.

I.- Relación entre lugar de residencia, paridad y pesticidas organoclorados

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre lugar de residencia, paridad y los niveles de o,p´DDT (ng/g placenta), endosulfán-éter (ng/g placenta) y metoxicloro (ng/g lípido). Con niveles medios mayores entre las mujeres que vivían en un área urbana y eran primíparas para el caso del o,p´DDT (1.50 ± 4.47 ng/g placenta), que vivían en un área rural y eran primíparas para el caso de endosulfán-éter (0.26 ± 0.51 ng/g placenta) y que vivían en un área urbana y eran multíparas para el caso del metoxicloro (47.63 ± 154.23 ng/g lípido). Los niveles medios menores se encontraron entre las madres multíparas con residencia urbana (0.61 ± 0.58 ng/g placenta) para el caso del o,p´DDT, primíparas y residencia urbana (0.12 ± 0.11 ng/g placenta) para el caso de endosulfán-éter y multíparas y residencia rural (7.42 ± 30.99 ng/g lípido) para el caso del metoxicloro. Además, apareció una tendencia a la significación estadística entre el lugar de residencia, paridad y los niveles de endosulfán-I (ng/g placenta) y mirex (ng/g placenta). En el primer caso, las primíparas que vivían en una residencia urbana tenían mayores niveles de este compuesto (1.57 ± 4.55 ng/g placenta), y en el segundo caso, los niveles mayores se encontraron entre primíparas con residencia rural (0.80 ± 2.57 ng/g placenta). Los niveles medios menores se encontraron entre primíparas con residencia rural (14.04 ± 32.67 ng/g lípido) para el caso del endosulfán-I y multíparas con residencia rural (0.42 ± 0.50 ng/g placenta) para el mirex.

Pesticidas	Residencia+Paridad	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	4.200	0.041*
	ng/g lípido	0.087⁺
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.024	0.876
	ng/g lípido	0.328
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.001	0.973
	ng/g lípido	0.960
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.017	0.898
	ng/g lípido	0.981
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.274	0.601
	ng/g lípido	0.244

Pesticidas	Residencia+Paridad	
	F	P
E -I: ng/gplacenta	2.763	0.098⁺
	ng/g lípido	0.233
E-II: ng/gplacenta	0.497	0.481
	ng/g lípido	0.734
E-éter: ng/gplacenta	5.254	0.023*
	ng/g lípido	0.157
E-lactona: ng/gplacenta	0.502	0.479
	ng/g lípido	0.387
E-diol: ng/gplacenta	0.318	0.573
	ng/g lípido	0.989
E-sulfato: ng/gplacenta	2.279	0.132
	ng/g lípido	0.336
ΣEndos: ng/gplacenta	0.533	0.466
	ng/g lípido	0.512

E=Endosulfán.

Pesticidas		Residencia+Paridad	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.121	0.728
	ng/g lípido	0.250	0.618
Endrín:	ng/gplacenta	0.307	0.580
	ng/g lípido	1.467	0.227
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.582	0.446
	ng/g lípido	0.042	0.839

Pesticidas		Residencia+Paridad	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.216	0.642
	ng/g lípido	0.905	0.342
Lindano:	ng/gplacenta	0.825	0.365
	ng/g lípido	0.107	0.743
Mirex:	ng/gplacenta	3.069	0.081⁺
	ng/g lípido	2.155	0.143
Metoxicloro:	ng/gplacenta	1.025	0.312
	ng/g lípido	5.081	0.025*

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre lugar de residencia, paridad y el número de pesticidas por muestra

Al aplicar el test ANOVA de dos vías apareció una tendencia a la asociación estadística entre el número de pesticidas por muestra y las variables lugar de residencia y paridad. Las madres que vivían en un área rural y que eran primíparas presentaban un número medio de pesticidas por tejido placentario mayor que el resto (8.05 ± 3.14 pesticidas por muestra) y las mujeres que eran

multíparas y con residencia rural (7.06 ± 2.87 pesticidas por muestra) los niveles medios menores.

Variable	Residencia+Paridad	
	F	P
Número de pesticidas	3.824	0.051 ⁺

III.- Relación entre lugar de residencia, paridad y la TEXB de la fracción alfa y beta

No existía asociación estadística entre la TEXB de la fracción alfa o beta y las variables lugar de residencia y paridad, pero a pesar de no existir dicha asociación, se observó que las madres con residencia rural y multíparas tenían unos niveles medios mayores de TEXB de alfa (6.32 ± 15.16 Eeq pM/g placenta o 253.84 ± 536.09 Eeq pM/g lípido) y los niveles medios menores se encontraron entre las mujeres con residencia rural y primíparas (1.96 ± 4.37 Eeq pM/g placenta o 93.45 ± 197.22 Eeq pM/g lípido). Para el caso de la fracción beta, los niveles medios mayores se encontraron en madres que vivían en un área rural y eran multíparas (28.52 ± 99.07 Eeq pM/g placenta o 759.06 ± 1625.98 Eeq pM/g lípido) y los niveles medios menores en madres que vivían en un área urbana y eran primíparas (9.29 ± 20.53 Eeq pM/g placenta o 1085.68 ± 2536.78 Eeq pM/g lípido).

TEXB	Residencia+Paridad	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	1.162	0.282
EeqpM/g lip	2.092	0.149
Beta: EeqpM/g plac	0.019	0.891
EeqpM/g lip	1.249	0.265

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.1.15. Lugar de residencia y hábito tabáquico

El número de madres que vivían en un área rural y que fumaron durante el embarazo fue de 51, el número de mujeres que vivían en un área rural pero que no fumaron fue de 130, el total de madres que vivían en un área urbana y eran fumadoras fue de 36 y el número total que vivían en un área urbana y no fumaron fue de 90.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre lugar de residencia, hábito tabáquico y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de endosulfán-I (ng/g lípido), ruralidad y hábito tabáquico, así como una tendencia a dicha asociación entre los niveles de o,p´DDD (ng/g placenta) y sumatoria de DDTs (ng/g placenta). Los niveles medios mayores de endosulfán-I se encontraron entre las mujeres fumadoras y con residencia urbana (49.31 ± 137.78 ng/g lípido), y para el caso de o,p´DDD y sumatoria de DDTs, los niveles medios mayores se encontraron entre las mujeres que no fumaban y que residían en área urbana (1.22 ± 3.71 ng/g placenta y 9.45 ± 13.54 ng/g placenta, respectivamente). En cambio, el grupo de mujeres que vivía en un área rural y fumaba, presentaba los niveles medios menores de endosulfán-I (5.87 ± 12.27 ng/g lípido). El grupo de mujeres que vivía en un área rural y fumó durante el embarazo, presentó los niveles medios menores de o,p´DDD (0.58 ± 0.59 ng/g lípido) y el grupo de madres que vivía en un área rural y no fumó durante el embarazo, tenía los niveles medios menores de sumatoria de DDTs (5.53 ± 6.44 ng/g placenta).

Pesticidas	Residencia+Hábito tabáquico	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.862	0.354
	ng/g lípido	0.566
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.002	0.967
	ng/g lípido	0.243
o,p´DDD: ng/gplacenta	2.840	0.093⁺
	ng/g lípido	2.036
p,p´DDE: ng/gplacenta	1.470	0.226
	ng/g lípido	0.209
ΣDDTs: ng/gplacenta	3.086	0.080⁺
	ng/g lípido	1.758

Pesticidas	Residencia+Hábito tabáquico	
	F	P
E -I: ng/gplacenta	0.271	0.603
	ng/g lípido	4.466
E-II: ng/gplacenta	0.031	0.861
	ng/g lípido	0.044
E-éter: ng/gplacenta	0.029	0.866
	ng/g lípido	0.062
E-lactona: ng/gplacenta	0.047	0.828
	ng/g lípido	0.163
E-diol: ng/gplacenta	0.854	0.356
	ng/g lípido	0.427
E-sulfato: ng/gplacenta	0.021	0.884
	ng/g lípido	0.139
ΣEndos: ng/gplacenta	0.190	0.663
	ng/g lípido	0.393

E=Endosulfán.

Pesticidas	Residencia+Hábito tabáquico	
	F	P
Aldrín: ng/gplacenta	0.022	0.883
	ng/g lípido	0.224
Endrín: ng/gplacenta	0.947	0.331
	ng/g lípido	1.433
Dieldrín: ng/gplacenta	0.055	0.815
	ng/g lípido	0.045

Pesticidas	Residencia+Hábito tabáquico	
	F	P
HCB: ng/gplacenta	0.765	0.382
	ng/g lípido	1.046
Lindano: ng/gplacenta	1.318	0.252
	ng/g lípido	0.485
Mirex: ng/gplacenta	1.792	0.182
	ng/g lípido	0.660
Metoxicloro:ng/gplacenta	0.477	0.490
	ng/g lípido	1.437

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre lugar de residencia, hábito tabáquico y el número de pesticidas por muestra

No existía asociación estadísticamente significativa entre el lugar de residencia, hábito tabáquico y número de pesticidas en tejido placentario. A pesar de no existir dicha asociación, los niveles medios mayores se encontraron en mujeres que fumaban y vivían en una zona urbana (8.35 ± 2.92 pesticidas por muestra de tejido placentario) y los niveles medios menores en madres que fumaban y vivían en una zona rural (7.44 ± 3.18 pesticidas por muestra), media

muy parecida a la encontrada en el grupo de mujeres con una residencia rural y no fumadoras (7.50 ± 2.97 pesticidas por muestra).

Variable	Residencia+Hábito tabáquico	
	F	P
Número de pesticidas	1.239	0.267

III.- Relación entre lugar de residencia, hábito tabáquico y la TEXB de la fracción alfa y beta

No existía asociación estadísticamente significativa entre la TEXB de alfa o beta, lugar de residencia y hábito tabáquico. Aún así, las madres que vivían en una zona urbana y que fumaban tenían niveles medios de TEXB de alfa mayores que el resto de los grupos de estudio (5.64 ± 12.82 Eeq pM/g placenta o $265.556.87$ Eeq pM/g lípido). Los niveles medios menores se encontraron en madres que vivían en una zona urbana y que no fumaron durante el embarazo (3.56 ± 8.25 Eeq pM/g placenta o 142.20 ± 308.40 Eeq pM/g lípido) (Test ANOVA de dos vías).

TEXB	Residencia+Hábito tabáquico	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	1.558	0.213
EeqpM/g lip	1.668	0.198
Beta: EeqpM/g plac	0.220	0.640
EeqpM/g lip	0.869	0.352

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.2. CARACTERÍSTICAS DEL NIÑO

4.6.2.1. Peso del niño y edad gestacional

El número de niños con un peso <2500g y con menos de 37 semanas de gestación era solamente 1, con peso <2500g pero con ≥ 37 semanas 6, con un peso ≥ 2500 g y con menos de 37 semanas 12 y con un peso ≥ 2500 g y con ≥ 37 semanas 269.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre peso del niño, edad gestacional y pesticidas organoclorados

Al aplicar el test ANOVA de dos vías apareció una tendencia a la significación estadística entre peso del niño, edad gestacional y niveles de p,p'DDE (ng/g lípido), con mayores niveles medios entre niños con peso ≥ 2500 g y <37 semanas (380.06 ± 710.07 ng/g lípido). Solamente un niño nació con peso <2500g y <37 semanas (media de p,p'DDE=0.50 ng/g lípido). Entre los niños nacidos con una edad gestacional ≥ 37 semanas, el valor medio de p,p'DDE para los que pesaron <2500g fue de 113.12 ± 166.90 ng/g lípido y para los que pesaron ≥ 2500 g fue de 102.00 ± 174.90 ng/g lípido.

Pesticidas	Peso+Edad gestacional	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.146	0.703
	ng/g lípido	0.063
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.033	0.858
	ng/g lípido	0.017
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.022	0.881
	ng/g lípido	0.014
p,p´DDE: ng/gplacenta	2.243	0.135
	ng/g lípido	3.074
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.549	0.459
	ng/g lípido	0.283

Pesticidas	Peso+Edad gestacional	
	F	P
E -I: ng/gplacenta	0.008	0.930
	ng/g lípido	0.001
E-II: ng/gplacenta	0.009	0.926
	ng/g lípido	0.000
E-éter: ng/gplacenta	0.042	0.838
	ng/g lípido	0.000
E-lactona: ng/gplacenta	0.074	0.786
	ng/g lípido	0.095
E-diol: ng/gplacenta	0.012	0.912
	ng/g lípido	0.013
E-sulfato: ng/gplacenta	0.446	0.505
	ng/g lípido	0.769
ΣEndos: ng/gplacenta	0.085	0.770
	ng/g lípido	0.115

E=Endosulfán.

Pesticidas	Peso+Edad gestacional	
	F	P
Aldrín: ng/gplacenta	0.108	0.743
	ng/g lípido	0.469
Endrín: ng/gplacenta	0.002	0.961
	ng/g lípido	0.003
Dieldrín: ng/gplacenta	0.006	0.938
	ng/g lípido	0.021

Pesticidas	Peso+Edad gestacional	
	F	P
HCB: ng/gplacenta	0.021	0.884
	ng/g lípido	0.010
Lindano: ng/gplacenta	0.000	0.992
	ng/g lípido	0.024
Mirex: ng/gplacenta	0.746	0.389
	ng/g lípido	0.150
Metoxicloro:ng/gplacenta	0.000	0.997
	ng/g lípido	0.055

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre peso del niño, edad gestacional y el número de pesticidas por muestra

El número de pesticidas por muestra no estaba estadísticamente asociado con el peso y edad gestacional, pero el número medio de pesticidas era mayor entre los bebés que pesaban ≥ 2500 g y que tenían una edad gestacional ≥ 37 semanas (7.72 ± 3.11 pesticidas/muestra). Los niveles medios menores se encontraron en niños con peso < 2500 g y menos de 37 semanas (5.00 pesticidas/muestra).

Variable	Peso+Edad gestacional	
	F	P
Número de pesticidas	0.001	0.973

III.- Relación entre peso del niño, edad gestacional y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al aplicar el test ANOVA de un factor no apareció significación estadística entre las variables peso del niño, edad gestacional y los niveles de TEXB de la fracción alfa o beta. Aún así, se observó que los niveles de estrogenicidad de la fracción alfa eran mayores entre el grupo de los niños que pesaron ≥ 2500 g y nacieron con menos de 37 semanas de edad gestacional (6.90 ± 16.56 Eeq pM/g placenta o 87.38 ± 206.71 Eeq pM/g lípido). Solamente un niño nació con peso < 2500 g y < 37 semanas, con un valor medio de TEXB de alfa de 0.12 Eeq pM/g placenta o 0.12 Eeq pM/g lípido). Los niveles medios de TEXB de alfa en niños que nacieron con ≥ 37 semanas y con peso < 2500 g y ≥ 2500 g fueron de 3.71 ± 5.02 Eeq pM/g placenta o 15.49 ± 73.6 Eeq pM/g lípido y 13.68 ± 33.02 Eeq pM/g placenta o 30.99 ± 94.62 Eeq pM/g lípido, respectivamente.

TEXB	Peso+Edad gestacional	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	0.096	0.757
EeqpM/g lip	0.022	0.882
Beta: EeqpM/g plac	0.017	0.895
EeqpM/g lip	0.051	0.821

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.6.2.2. Índice ponderal del niño y edad gestacional

El número de niños con un $IP < 25 \text{g/cm}^3$ y con menos de 37 semanas de edad gestacional fue de 2, con $IP < 25 \text{g/cm}^3$ pero con ≥ 37 semanas 51, con un $IP \geq 25 \text{g/cm}^3$ y con menos de 37 semanas 2 y con un $IP \geq 25 \text{g/cm}^3$ y con ≥ 37 semanas 66.

En todos los casos, se consideró la significación estadística para $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*) y tendencia a la significación estadística a nivel $p \leq 0.1$ (+).

I.- Relación entre índice ponderal del niño, edad gestacional y pesticidas organoclorados

No existía asociación estadística entre el índice ponderal, la edad gestacional y los niveles de los pesticidas estudiados (Test ANOVA de dos vías).

Pesticidas	Índice ponderal+Edad gestacional	
	F	P
o,p´DDT: ng/gplacenta	0.009	0.923
	ng/g lípido	0.964
p,p´DDT: ng/gplacenta	0.082	0.775
	ng/g lípido	0.809
o,p´DDD: ng/gplacenta	0.001	0.978
	ng/g lípido	0.909
p,p´DDE: ng/gplacenta	0.047	0.829
	ng/g lípido	0.915
ΣDDTs: ng/gplacenta	0.001	0.979
	ng/g lípido	0.908

Pesticidas		Índice ponderal+Edad gestacional	
		F	P
E -I:	ng/gplacenta	0.079	0.780
	ng/g lípido	0.024	0.877
E-II:	ng/gplacenta	0.016	0.901
	ng/g lípido	0.002	0.969
E-éter:	ng/gplacenta	1.568	0.213
	ng/g lípido	0.501	0.481
E-lactona:	ng/gplacenta	2.364	0.127
	ng/g lípido	2.330	0.130
E-diol:	ng/gplacenta	0.020	0.889
	ng/g lípido	0.034	0.797
E-sulfato:	ng/gplacenta	0.313	0.577
	ng/g lípido	0.061	0.806
ΣEndos:	ng/gplacenta	0.656	0.420
	ng/g lípido	0.399	0.529

E=Endosulfán.

Pesticidas		Índice ponderal+Edad gestacional	
		F	P
Aldrín:	ng/gplacenta	0.097	0.755
	ng/g lípido	0.001	0.974
Endrín:	ng/gplacenta	0.047	0.829
	ng/g lípido	0.000	0.992
Dieldrín:	ng/gplacenta	0.000	0.997
	ng/g lípido	0.002	0.962

Pesticidas		Índice ponderal+Edad gestacional	
		F	P
HCB:	ng/gplacenta	0.004	0.953
	ng/g lípido	0.005	0.944
Lindano:	ng/gplacenta	0.123	0.727
	ng/g lípido	0.007	0.935
Mirex:	ng/gplacenta	0.052	0.820
	ng/g lípido	0.071	0.790
Metoxicloro:	ng/gplacenta	0.017	0.895
	ng/g lípido	0.036	0.849

HCB=Hexaclorobenceno.

II.- Relación entre índice ponderal del niño, edad gestacional y el número de pesticidas por muestra

No apareció asociación estadísticamente significativa entre el número de pesticidas por muestra, el índice ponderal y la edad gestacional. A pesar de no existir dicha asociación estadística se observó que el número medio de pesticidas por muestra de tejido placentario era mayor entre los bebés con un $IP < 25 \text{g/cm}^3$ y con ≥ 37 semanas de edad gestacional (7.72 ± 3.11 pesticidas/muestra) y los niveles medios menores se encontraron en niños con $IP < 25 \text{g/cm}^3$ y < 37 semanas (5.50 ± 0.70 pesticidas/muestra).

Variable	Índice ponderal+Edad gestacional	
	F	P
Número de pesticidas	0.326	0.569

III.- Relación entre índice ponderal del niño, edad gestacional y la TEXB de la fracción alfa y beta

Al aplicar el test ANOVA de un factor entre estas variables, apareció una tendencia a la asociación significativa para el caso de la fracción alfa (Eeq pM/g placenta) y las variables índice ponderal y edad gestacional. Los niveles medios de carga estrógena eran mayores en los tejidos placentarios de madres que dieron a luz niños con $IP \geq 25 \text{ g/cm}^3$ y con ≥ 37 semanas de gestación (20.41 ± 28.70 Eeq pM/g placenta o 254.69 ± 360.02 Eeq pM/g lípido). Solamente dos niños nacieron con $IP < 25 \text{ g/cm}^3$ y < 37 semanas, con un valor medio de TEXB de alfa de 0.16 ± 0.61 Eeq pM/g placenta o 3.16 ± 4.30 Eeq pM/g lípido). Los niveles medios de TEXB de alfa en niños que nacieron con ≥ 37 semanas y con $IP < 25 \text{ g/cm}^3$ y $\geq 25 \text{ g/cm}^3$ fueron de 4.14 ± 8.77 Eeq pM/g placenta o 191.38 ± 491.62 Eeq pM/g lípido y 4.73 ± 11.55 Eeq pM/g placenta o 198.88 ± 384.93 Eeq pM/g lípido, respectivamente.

TEXB	Índice ponderal+Edad gestacional	
	F	P
Alfa: EeqpM/g plac	3.265	0.073⁺
EeqpM/g lip	0.309	0.579
Beta: EeqpM/g plac	0.045	0.832
EeqpM/g lip	0.131	0.718

TEXB=Carga estrogénica total efectiva.

4.7. ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD HORMONAL Y/O TÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO PLACENTARIO MEDIANTE EL ENSAYO YEAST ESTROGEN SCREEN (YES) Y COMPARACIÓN CON LA OBTENIDA EN EL ENSAYO E-SCREEN

De la cohorte de muestras recogidas (n=308), se seleccionaron aleatoriamente un total de 40 con objeto de someter a análisis los extractos placentarios mediante el ensayo biológico Yeast Estrogen Screen (YES) y comparar estos resultados con los obtenidos en el ensayo biológico E-Screen.

El ensayo E-Screen fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Médicas de Hospital Clínico de Granada, y el ensayo YES fue llevado a cabo en el Centre for Toxicology de la School of Pharmacy de la Universidad de Londres.

Se extrajo una cantidad de 3.2 gramos de cada una de estas muestras usando el método previamente descrito en el apartado de material y métodos. Una vez extraídas, se pasaron por el HPLC para su separación en la fracción alfa (xenoestrógenos organohalogenados) y beta (otros xenoestrógenos que eluyen junto a hormonas esteroideas endógenas). Ambos extractos fueron alícuotados en dos partes iguales, una para el ensayo E-Screen y el otro para el ensayo YES.

En el caso del ensayo E-Screen se estimó la actividad correspondiente a la fracción completa (1:1) y diluida en medio experimental a un quinto (1:5) y un décimo (1:10), para la totalidad de las muestras y en el caso del YES se estimó la actividad correspondiente a alícuotas de entre 200-400µL de la fracción completa diluida en 1mL de etanol.

Se presentan a continuación los datos estadísticos sobre la frecuencia y la cuantificación de carga estrogénica total efectiva (TEXB) en las 40 muestras de tejido placentario utilizando ambos métodos. El apartado 4.7.1. recoge las características principales de la población de estudio. Los apartados 4.7.2.1. y

4.7.2.2. recogen la frecuencia de positividad, así como, la media aritmética, su correspondiente desviación estándar, mediana, valores mínimo y máximo de la carga estrogénica total efectiva de las fracciones alfa y beta, expresadas en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido en los ensayos E-Screen y YES.

El contenido medio de lípidos por muestra fue de $3.00 \pm 1.64\%$, con un valor mínimo de 0.85% y un valor máximo de 7.89%. Alrededor del 28.3% de las muestras testadas mostraban un efecto proliferativo mayor en la dilución 1:5 que en la dilución 1:1, sugiriendo un efecto tóxico parcial en las células MCF-7, que desaparecía después de dilución. La toxicidad en los extractos fue ensayado cuando el efecto parcial agonista fue mostrado en la presencia de 100 pM de estradiol. En el caso del ensayo YES, alrededor del 22.5% de las muestras testadas mostraban toxicidad cuando las alícuotas de 400 μ L de las muestras fueron transferidas al medio de ensayo conteniendo las levaduras.

El apartado 4.7.2.3. recoge las correlaciones entre las fracción alfa y la beta expresadas en las tres unidades de estudio (Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido), calculadas mediante el test de Spearman. El apartado 4.7.3. incluye el análisis bivariado realizado para determinar estadísticamente qué método es más adecuado para la determinación de la carga estrogénica total de las muestras de tejido placentario.

4.7.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las principales características de la población de estudio (N=40) vienen recogidas en las tablas siguientes. Como podemos observar, en términos generales, las características de este subgrupo no difieren de la población de estudio total. Alrededor de un 50% de las mujeres residía en un área rural (<10 000 habitantes), frecuencia muy próxima a las obtenidas en la cohorte final (41.56%). La edad media de las madres de este grupo de estudio en el momento del parto fue de alrededor de 30 años, media un poco inferior a la de las madres del estudio total, que fue de 32 años. El IMC de las madres antes del embarazo fue de 22.37 ± 3.45 Kg/m² (23.49 ± 4.13 Kg/m² para el grupo entero), valor dentro del rango considerados por la OMS como normal y el incremento medio del peso

durante el embarazo fue de 12.86Kg, valor prácticamente igual al del total de la cohorte (12.78 Kg). La edad de la primera menarquia fue de 12 años y 5 meses, diferenciándose en dos meses en el valor medio del total de la población (12.67±1.50). Un 60% de las madres era multípara, valor muy parecido al total de la población (53.9%). El nivel educacional de este grupo de estudio era más elevado que el de la población final, ya que un 37.5% de las mujeres tenía estudios primarios, un 10% menos que la frecuencia de estudios primarios de la población final (49.5%), habiendo, por tanto, mayor número de mujeres con estudios secundarios (32.5%) y universitarios (30.0%) con respecto a la cohorte final (29% y 17.6%, respectivamente). Sólo un 7.7% de las mujeres llevaban a cabo labores en el campo, valor algo mayor al total de las mujeres (4.9%).

Variables	FrecuenciaN(%)	Media (±DE)	Mediana	Rango
Madres				
Edad (años)		29.66±4.95	28.00	18.00-39.00
IMC (Kg/m²)		22.37±3.45	21.66	17.72-36.85
Ganancia de peso (Kg)		12.86±6.20	12.00	3.00-34.00
Edad de la menarquia (años)		12.52±1.63	13.00	9.00-17.00
Embarazos				
<i>Primípara</i>	16(40)			
<i>Multípara</i>	24(60)			
Residencia				
<i>Rural</i>	19(46.2)			
<i>Urbana</i>	21(53.8)			
Nivel educacional				
<i>Estudios primarios</i>	15(37.5)			
<i>Estudios medios</i>	17(32.5)			
<i>Estudios universitarios</i>	8(30.0)			
Empleo				
<i>Hogar</i>	9(23.1)			
<i>Agricultura</i>	3(7.7)			
<i>Otros</i>	28(69.2)			

DE = Desviación Estándar. Rural=<10.000 habitantes y urbano= \geq 10.000 habitantes. IMC= Índice de masa corporal.

Con respecto al bebé, el peso medio en el momento del parto fue de 3420.26±429.79g y el índice ponderal en el momento del nacimiento fue de 28.02±7.77 Kg/m³ (3306.46±452.06g y 25.71±4.28 Kg/m³ respectivamente, para el total de la población). Más del 95% de los niños, tanto en este subgrupo como el grupo total, nació con más de 37 semanas de gestación (no prematuros) y el 77.5% de los partos fue espontáneo, valor muy parecido al total de la población (72.7%).

Variables	Frecuencia N(%)	Media (±DE)	Mediana	Rango
Niños				
Peso al nacer (g)		3420.26±429.79	3455.00	2390.0-4310.0
IP en el parto (g/cm³)		28.02±7.77	26.09	20.62-54.84
Semanas gestación				
32-37 semanas	2(5.0)			
37-39 semanas	11(27.5)			
>39 semanas	27(67.5)			
Tipo de parto				
Espontáneo	31(77.5)			
Cesárea	2(5.0)			
Instrumental	7(17.5)			

DE = Desviación Estándar. IP= Índice Ponderal en el momento del parto

Finalmente, la edad media de los padres (32.44±4.08 años) era algo menor a la de la población total (34.60±5.86 años), tal y como ocurría en el caso de las madres. También se repite el patrón de un mayor nivel educacional entre los padres de este subgrupo, aproximadamente un 10% menos del total de los padres poseían estudios primarios (43.6%), con respecto a los padres de la cohorte final (52.44%), aumentando por tanto, el porcentaje de padres con estudios secundarios (28.2%) o universitarios (28.2%) con respecto a la población total (22.47% y 17.92%, respectivamente). En este subgrupo no

existía, ningún padre sin estudios. El 7.5% de la población masculina trabajaba en el campo, frecuencia muy parecida a la encontrada en el grupo final (7.1%).

VARIABLES	Frecuencia N(%)	Media (±DE)	Mediana	Rango
Padres				
Edad (años)		32.44±4.08	33.00	24.00-43.00
Nivel educacional				
<i>Estudios primarios</i>	18(43.6)			
<i>Estudios medios</i>	11(28.2)			
<i>Estudios universitarios</i>	11(28.2)			
Empleo				
<i>Agricultura</i>	3(7.5)			
<i>Otros</i>	37(92.5)			

DE= Desviación Estándar

4.7.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.7.2.1. Resultados del análisis estadístico para la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa en el ensayo E-Screen y YES

Los valores de equivalentes de estradiol para cada extracto de placenta fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación de la curva dosis-respuesta de estradiol, construida a tal efecto en ambos ensayos. Los valores se expresan en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido.

Un 62.5% de las muestras presentaba estrogénicidad medible mediante el ensayo E-Screen, con un valor medio de 7.18±11.37 Eeq pM/g placenta (equivalente a 310.67±559.72 Eeq pM/g lípido).

Para el caso del ensayo YES, un 50% de las muestras presentaban estrogenicidad medible, con un valor medio de 6.63 ± 11.04 Eeq pM/g placenta (equivalente a 292.29 ± 546.01 Eeq pM/g lípido).

TEXB-Alfa							
Presencia(\geq LC) (%)(N)		Eeq pM/mL		Eeq pM/g plac.		Eeq pM/g lip.	
E-Screen	YES	E-Screen	YES	E-Screen	YES	E-Screen	YES
62.5%(25)	50%(20)						
Media		12.52	11.61	7.18	6.63	310.67	292.29
DE		19.89	19.35	11.37	11.04	559.72	546.01
Mediana		3.25	1.24	1.85	0.77	47.48	31.16
Máximo		83.25	94.25	46.31	54.20	2286.48	2645.89

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. DE=Desviación estándar.

4.7.2.2. Resultados estadísticos para la carga estrogénica total efectiva en la fracción beta en el ensayo E-Screen y YES

Los valores de equivalentes de estradiol para cada extracto placentario fueron obtenidos al interpolar los valores de la proliferación de la curva dosis-respuesta de estradiol, construida a tal efecto en ambos ensayos. Los están expresados en Eeq pM/mL de medio de cultivo, Eeq pM/g placenta, y Eeq pM/g lípido.

El número de muestras positivas de los extractos de la fracción beta ensayados en el E-Screen fue de 35 (87.5%). La media fue de 30.55 ± 51.27 Eeq pM/g placenta (equivalente a 1258.78 ± 2222.93 Eeq pM/g lípido).

El número de muestras positivas de los extractos de la fracción beta ensayados en el YES fue de 29 (72.55%). La media en el caso del YES fue de 54.86 ± 55.06 Eeq pM/g placenta (equivalente a 2365.02 ± 3117.88 Eeq pM/g lípido).

TEXB-Beta							
Presencia(\geq LC) (%)(N)		Eeq pM/mL		Eeq pM/g plac.		Eeq pM/g lip.	
E-Screen	YES	E-Screen	YES	E-Screen	YES	E-Screen	YES
87.5(35)	72.5(29)						
Media		53.33	95.76	30.55	54.86	1258.78	2365.02
DE		89.66	96.68	51.27	55.06	2222.93	3117.88
Mediana		20.63	81.23	11.86	46.69	482.11	148.22
Máximo		350.00	390.37	199.74	222.53	11452.60	13129.42

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. DE=Desviación estándar. LC=Límite de cuantificación.

4.7.2.3. Correlación entre la carga estrogénica total efectiva en la fracción alfa y beta en muestras de tejido placentario mediante el ensayo E-Screen y YES.

Se ha estudiado mediante la aplicación del test estadístico de correlación Rho de Spearman la relación existente entre la carga estrogénica total efectiva (TEXB) en la fracción alfa y beta en ambos ensayo.

I.- Ensayo E-Screen

En el ensayo E-Screen, los valores de la TEXB en la fracción alfa y beta, fueron significativamente asociados cuando se expresaron en Eeq pM/mL ($\rho=0.428$, $p=0.006$), Eeq pM/g placenta ($\rho=0.424$, $p=0.006$), y Eeq pM/g lípido ($\rho=0.458$, $p=0.003$).

TEXB-Beta	TEXB-Alfa		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL	0.006**	0.005**	0.014*
Eeq(pM)/g plac.	0.007**	0.006**	0.018*
Eeq(pM)/g lipid	0.002**	0.002**	0.003**

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$

II.- Ensayo YES

En el ensayo YES, los valores de la TEXTB en la fracción alfa y beta, también fueron significativamente asociados cuando se expresaron en Eeq pM/mL ($\rho=0.324$, $p=0.041$), Eeq pM/g placenta ($\rho=0.315$, $p=0.048$), y Eeq pM/g lípido ($\rho=0.448$, $p=0.004$). En las tablas siguientes se exponen los resultados de dicho análisis.

TEXTB-Beta	TEXTB-Alfa		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL	0.041*	0.043*	0.017*
Eeq(pM)/g plac.	0.048*	0.048*	0.022*
Eeq(pM)/g lipid	0.024*	0.025*	0.004**

TEXTB=Carga estrógena total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$

4.7.3. ANÁLISIS BIVARIADO

4.7.3.1. Presencia/ausencia de estrogenicidad en ambos ensayos: Tablas de contingencia

Cuando se enfrentó la variable dicotómica presencia/ausencia ($<LC$ o $\geq LC$) de estrogenicidad de la fracción alfa obtenida mediante el ensayo E-Screen frente a la variable dicotómica presencia/ausencia de estrogenicidad de la fracción alfa obtenida mediante el ensayo YES, se vio que no existía una diferencia significativa ($p=0.744$) entre ambos ensayos. En el caso de la fracción beta, tampoco se halló una diferencia significativa ($p=0.517$).

		TEXB-Alfa YES		χ^2	p
		Sí	No		
TEXB-Alfa E-Screen	Sí	13	12	0.107	0.744
	No	7	8		
P=0.052					

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$

		TEXB-Beta YES		χ^2	p
		Sí	No		
TEXB-Beta E-Screen	Sí	26	9	0.420	0.517
	No	3	2		
$p=0.106$					

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$

4.7.3.2. Valores de estrogenicidad obtenidos en ambos ensayos: Test de Mann-Whitney

Como podemos observar en la tabla siguiente, al aplicar el test de Mann-Whitney no se hallaron diferencias significativas entre los valores de estrogenicidad obtenidos en la fracción alfa de ambos ensayos al expresar los resultados en Eeq pM/mL ($p=0.520$; media en el ensayo E-Screen= 12.52 ± 19.89 ; y en el YES = 11.61 ± 19.35), Eeq pM/g placenta ($p=0.540$; media en el ensayo E-Screen= 7.18 ± 11.37 ; y en el YES= 6.63 ± 11.04), y Eeq pM/g lípido ($p=0.533$; media en el ensayo E-Screen= 310.67 ± 559.72 ; y en el YES= 292.29 ± 546.01).

Con respecto a la fracción beta, sí existían diferencias significativas, aunque no muy fuertes, entre utilizar un ensayo u otro, si los valores se expresaban en Eeq pM/mL ($p=0.049$; media en el ensayo E-Screen= 53.33 ± 89.66 ; y media en el ensayo YES= 95.76 ± 96.68) y expresados en Eeq pM/g placenta ($p=0.047$; media en el ensayo E-Screen= 30.55 ± 51.27 ; y media en el ensayo YES= 54.86 ± 55.06). Al expresar los valores de estrogenicidad en Eeq pM/mL, las diferencias significativas desaparecían ($p=0.112$; media ensayo E-Screen= 1258.78 ± 2222.93 ; y media en el ensayo YES= 2365.02 ± 3117.88).

TEXB	U	Ensayo biológico		p
		E-Screen	YES	
Alfa				
Eeq(pM)/mL	736.00	12.52±19.89	11.61±19.35	0.520
Eeq(pM)/gpla	739.00	7.18±11.37	6.63±11.04	0.540
Eeq(pM)/glip	738.00	310.67±559.72	292.29±546.01	0.533

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$ y tendencia a la significación $p \leq 0.1$.

TEXB	U	Ensayo biológico		p
		E-Screen	YES	
Beta				
Eeq(pM)/mL	596.50	53.33±89.66	95.76±96.68	0.049*
Eeq(pM)/gpla	594.50	30.55±51.27	54.86±55.06	0.047*
Eeq(pM)/glip	635.50	1258.78±2222.93	2365.02±3117.88	0.112

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$ y tendencia a la significación $p \leq 0.1$.

4.7.3.3. Valores de estrogenicidad obtenidos en ambos ensayos: Test de Spearman

Como podemos observar en la tabla siguiente, al aplicar el test de correlaciones de Spearman, no se hallaron diferencias significativas entre los valores de estrogenicidad obtenidos en la fracción alfa de ambos ensayos al expresar los resultados en Eeq pM/mL ($\rho=0.031$; $p=0.849$), Eeq pM/g placenta ($\rho=0.037$; $p=0.822$) o Eeq pM/g lípido ($\rho=0.017$; $p=0.917$) y tampoco entre los valores de estrogenicidad obtenidos en la fracción beta de ambos ensayos al expresar los resultados en Eeq pM/mL ($\rho=-0.047$; $p=0.774$), Eeq pM/g placenta ($\rho=-0.047$; $p=0.771$) o Eeq pM/g lípido ($\rho=0.124$; $p=0.445$).

TEXB alfa-E.Screen	TEXB alfa-YES		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL	0.849	0.809	0.949
Eeq(pM)/g plac.	0.864	0.822	0.966
Eeq(pM)/g lipid	0.861	0.825	0.917

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$ y tendencia a la significación $p \leq 0.1$.

TEXB beta-E.Screen	TEXB beta-YES		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL	0.774	0.812	0.865
Eeq(pM)/g plac.	0.730	0.771	0.901
Eeq(pM)/g lipid	0.812	0.822	0.445

TEXB=Carga estrógenica total efectiva. Significación estadística $p \leq 0.05$ y tendencia a la significación $p \leq 0.1$.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Se estima en más de 110.000 las sustancias químicas producidas por el hombre desde el inicio de la revolución industrial, que no tienen paragón con las existentes de forma natural en el medio ambiente. Pero fue a partir de los años cuarenta del siglo pasado cuando comenzó la producción masiva y la liberación medioambiental de la mayoría de estos compuestos químicos, de tal manera que, hoy día, una media de 2.000 sustancias químicas nuevas se incorporan anualmente al censo de sustancias relacionadas con la actividad humana.

La mujer embarazada y su entorno resultan, pues, fácilmente expuestos a estos compuestos tanto desde el momento de su fabricación como a través de los procesos de distribución, uso y degradación final. La exposición ocurre porque muchas de estas sustancias químicas forman parte de las actividades ordinarias en el modo de vida actual y tiene lugar ya sea de manera conocida y

programada, o bien como consecuencia de un proceso no intencionado, accidental o simplemente inadvertido. De esta manera, si en el medio ambiente donde habita la mujer embarazada se encuentran estas sustancias antropogénicas, éstas tienen un fácil acceso al microambiente en el que se resuelve la maduración del embrión/feto.

La exposición infantil a compuestos hormonalmente activos tiene en la etapa intrauterina una de sus fases más críticas (Bern, 1992; Jacobson & Jacobson, 1996; Reichrtova et al., 1999). Está bien documentada la movilización de la grasa corporal materna que tiene lugar durante el embarazo (Hunt & Orr, 1992; Olea et al., 1999; Waliszewski et al., 2001), lo que supone una importante liberación a la sangre desde los depósitos lipofílicos de los compuestos organoclorados que la madre ha acumulado en su tejido adiposo, fundamentalmente. Tanto la liposolubilidad de los contaminantes como la persistencia de los mismos, junto a la exposición silenciosa a lo largo de años a través de fuentes tan diversas como la alimentaria, ambiental y laboral, contribuyen al aumento paulatino, en función de la edad del individuo, de muchos de estos residuos (Hura et al., 1999; Sala et al., 2001; Waliszewski et al., 2001; Falcon et al., 2004). A través de la placenta el feto se impregna de la exposición histórica de la madre (Saxena et al., 1981a; Martínez et al., 1993; Hura et al., 1999; Weisskopf et al., 2005), que pasa ahora a acumularse en su propio tejido adiposo, cuando este empieza a ser cuantitativamente importante al final del embarazo y durante la lactancia. A este respecto, la determinación en el tejido placentario de contaminantes organoclorados, es un proceso digno de ser investigado que merece "a priori" más atención de la que hasta ahora se le ha dado.

La exposición medioambiental a contaminantes químicos representa un problema para el embrión/feto desde el mismo momento en que estos alcanzan la placenta y la sangre fetal (Falcon et al., 2004). Los estudios en animales y datos epidemiológicos descriptivos sugieren que los cánceres relacionados con las hormonas pueden tener su origen en el periodo intrauterino, y que los periodos pre y perinatal pueden constituir un momento de una importancia capital para el riesgo de padecer futuros tumores (Ekbom, 1998). Además, también ha

sido denunciado que el incremento en la frecuencia de trastornos en el desarrollo del aparato genitourinario en el hombre, que va desde el cáncer testicular (Adami et al., 1994; Forman & Moller, 1994), la criptorquidia e hipospadia (Olea et al., 1999; Hosie et al., 2000), daños en la función testicular (Auger et al., 1995; Swan et al., 1997), así como la menor cantidad seminal (Carlsen et al., 1992), podrían estar relacionados con una mayor exposición en útero a disruptores endocrinos (Sharpe & Skakkebaek, 1993).

En el presente trabajo se ha hecho un esfuerzo importante para caracterizar la exposición materno-infantil, atendiendo tanto a las variables que condicionan la exposición de la madre como del padre y haciendo un énfasis especial en la exposición efectiva durante la gestación. Por esta razón, la obtención de medidas objetivas de cuantificación química y de actividades hormonales en placenta es un pilar fundamental del diseño del trabajo. Sin embargo, no se ha desdeñado el papel de la exposición durante la vida de la madre y el padre antes de la concepción del individuo motivo de estudio, abordando el rol de exposición con una doble aproximación: la encuesta epidemiológica con un amplio cuestionario y la medida de exposición a un grupo selecto de compuestos químicos de carácter lipofílico y acumulable.

Es cierto que la utilización de la encuesta epidemiológica y su cuestionario como fuente de obtención de datos deja al investigador a merced de la calidad de la misma, le obliga en muchas ocasiones a enfrentarse a problemas de legibilidad o ausencia de anotaciones y puede limitarle, en definitiva, las posibilidades de obtención de información (Burnum, 1989). En este trabajo se ha hecho especial hincapié en que estos problemas no ocurrieran ya que las encuestas fueron traducidas a cuestionarios en inglés, los cuales se están tratando de forma conjunta en el marco del estudio epidemiológico europeo que ampara este trabajo.

La elección de una población femenina como base de estudio para este trabajo no es fruto del azar. La sospecha de una asociación entre actividad laboral con uso de compuestos químicos y exposición medioambiental, nos obliga a estudiar en profundidad la exposición prenatal del niño a pesticidas a través de la placenta, ya sean procedentes de los que la madre ha acumulado

durante su vida, ya sean por exposición directa en el curso del embarazo. La preocupación del grupo de trabajo en que se encuadra este estudio por la exposición materno-infantil y las fases más tempranas del desarrollo nos inclinó a efectuar este análisis en una población femenina del sureste peninsular. La estadística descriptiva de cada una de las variables consideradas en la encuesta epidemiológica nos ha permitido hacer una aproximación a las características de la población de estudio, con objeto de compararla con otras series establecidas por este mismo grupo de trabajo y establecer el grado de similitud entre esta serie y otras desarrolladas por otros grupos de investigación.

En el presente estudio, los pesticidas organoclorados y metabolitos que se seleccionaron para su análisis fueron o,p´DDT, p,p´DDT, p,p´DDE, p,p´DDD, metoxicloro, mirex, lindano, hexaclorobenceno, aldrín, endrín y dieldrín, endosulfán-I, endosulfán-II, endosulfán-éter, endosulfán-lactona, endosulfán-diol y endosulfán-sulfato debido a que: i) se acumulan en tejido biológicos humanos (Campoy et al., 2001b; Botella et al., 2004; Cerrillo et al., 2005a; Cerrillo et al., 2005b; López-Espinosa et al., 2006), ii) algunos de estos compuestos, o sus metabolitos, pueden actuar como potenciales carcinógenos al poseer una alta afinidad por el ADN (Jobling & Sumpter, 1993; Skakkebaek et al., 1998), y iii) pueden interferir sobre la homeostasis hormonal dado su efecto hormonal, estrogénico y antiandrogénico, ya probado en ensayos *in vitro e in vivo* (Soto et al., 1995; Kelce et al., 1995; Andersen et al., 1999; Rivas et al., 2001).

Los pesticidas organoclorados analizados en este estudio tienen actividad hormonal, por lo que entran en la clasificación de disruptores endocrinos. Algunos de estos pesticidas organoclorados se consideran como agonistas estrogénicos totales, como es el caso del o-p'DDT, o agonistas estrogénicos parciales, en el resto de los casos, con una eficacia estrogénica con respecto a estradiol muy variable. Así por ejemplo, el lindano presenta un valor de eficacia estrogénica que apenas si alcanza el 30% de la atribuida al estrógeno natural, mientras que la eficacia del endosulfán supera el 65% (Soto et al., 1995). La potencia proliferativa en los ensayos *in vitro*, le sirvió a Soto y colaboradores para ordenarlos en función de la concentración mínima a la que desencadenan un efecto estrogénico. Siguiendo este criterio son o,p'-DDD, p,p'-DDT,

metoxicloro y endosulfán-I y -II los pesticidas organoclorados más potentes. Sólo mirex, endosulfán-sulfato y endosulfán-lactona son inactivos en los ensayos de estrogenicidad, aunque el primero se ha encontrado asociado a una mayor frecuencia de enfermedades de carácter hormonal (Moysich et al., 1998). Además del efecto agonista estrogénico, se hace necesario recordar que ha sido igualmente descrita la interferencia con el sistema androgénico para algunos de los pesticidas considerados aquí, como es el caso del p,p'DDE (Kelce et al., 1995; Kojima et al., 2003), que junto a los fungicidas vinclozolina y procloraz y al herbicida linurón (Vingard et al., 2002) engrosan actualmente la lista de los antagonistas androgénicos.

Muchos de los compuestos incluidos en el presente trabajo, aun estando regulados en su uso, como es el caso del DDT, contaminante en las formulaciones de dicofol (Van de Plassche et al., 2003), o el dieldrín, están presentes en el medio en que se desenvuelve el embrión-feto-niño. Otra parte de los compuestos estudiados tienen un uso restringido, por lo que difícilmente van a acceder al niño a través de productos de consumo diario. Tal es el caso de metoxicloro o lindano. Desgraciadamente, el empleo de estos compuestos en otras aplicaciones distintas a las agrícolas, como los preparados farmacológicos o su uso autorizado para el tratamiento de plantas ornamentales en parques y jardines urbanos, determina que la exposición infantil sea un hecho factible. Por último, otros grupos de organoclorados bioacumulables han sido incluidos en el presente trabajo por su empleo, autorizado y frecuente, en las prácticas agrícolas actuales. Este lugar lo ocupa el endosulfán, número uno en ventas en Andalucía y pesticida organoclorado de importante empleo en la agricultura intensiva.

Aunque en la actualidad hay un mayor control en el empleo de algunos pesticidas organoclorados en la agricultura y algunos de ellos fueron prohibidos hace años, los niveles de exposición de la población humana son tan importantes como en el pasado, debido, entre otras razones, a que algunos de estos compuestos aún se emplean en las tareas agrícolas, a la elevada persistencia de estas sustancias, al transporte aéreo desde regiones donde se usan compuestos prohibidos en España, a la contaminación en formulaciones autorizadas o a su empleo fraudulento (Porta et al., 2002). A este respecto, la

medida de exposición a múltiples residuos, en lugar de uno o unos pocos, se plantea como una alternativa digna de consideración ya que el efecto conjunto - sinérgico, aditivo o combinado- de estos compuestos ha sido tenido en consideración, tan solo en contadas ocasiones.

En diferentes partes del mundo se han descrito la transferencia de pesticidas organoclorados a través de la placenta al bebé (Rogan et al., 1986b; Rhainds et al., 1999; Longnecker et al., 1999; Sala et al., 2001; Falcon et al., 2004). Por eso, es de gran interés hacer un diagnóstico real y objetivo del nivel de impregnación actual de la exposición transplacentaria del feto/bebé, que permita tanto comparar nuestra región con otras áreas geográficas, así como evaluar la efectividad de las medidas de prevención de la exposición puestas en marcha y las posibles consecuencias de dicha exposición.

Se ha de señalar que todas las pacientes incluidas en el estudio dieron a luz en el Hospital Clínico Universitario de Granada, circunstancia que puede limitar las conclusiones generales del trabajo en lo que respecta a su aplicación a la población general, ya que no todas las mujeres de Granada y pueblos cercanos vienen a dar a luz a dicho hospital, pero sí que puede representar con suficiente verosimilitud la exposición real de la región que el Hospital Clínico atiende sanitariamente.

Durante el periodo de reclutamiento (20 meses), se produjeron 4455 alumbramientos de varones en el hospital, de los que se recogieron datos de un total de 668 individuos (15% de los varones nacidos) y de estos se escogieron aleatoriamente un total de 308 de los que se disponía del cuestionario, examen físico del niño y muestra biológica de placenta.

La población de madres incluidas en el estudio se trataba de mujeres jóvenes, de edad media 32 años, menos de la mitad de las participantes vivían en áreas rurales de <10.000 habitantes (41.56%), desarrollaron trabajos agrícolas un 4.9% y un 11.7% manifestaron haber estado expuestas ocupacionalmente a compuestos químicos (pesticidas, desinfectantes, productos fitosanitarios y productos usados en peluquería). La mayor parte declararon estar casadas en el momento de la entrevista o conviviendo con su pareja (99.6%) y poseer bajo nivel escolar (53.4% sin estudios o estudios primarios). La

media del IMC (índice de masa corporal) de las madres (23.49 Kg/m²) antes del embarazo, las englobaba dentro del grupo de normal IMC (19-24.99 Kg/m²), según la clasificación de la OMS. Destaca que pocas mujeres (27.6%) declararon fumar durante el embarazo y que aún menos admitieron consumir alcohol en exceso (solamente dos mujeres afirmaron haber bebido en exceso alcohol durante el embarazo). La dieta seguida por las madres durante los nueve meses de embarazo, se podía considerar próxima a las recomendaciones de la dieta mediterránea.

En cuanto a los antecedentes de vida reproductiva constatamos los siguientes datos: un 53.9% de las participantes habían estado embarazadas con anterioridad, de las cuales el 73.50% habían tenido sólo un hijo. Un 47.1% declararon haber tomado anticonceptivos antes de quedarse embarazadas.

Atendiendo a las características de los padres en el estudio y de forma resumida se evidencia que, la edad media era de 34 años, la mayoría tenía bajo nivel educacional (59.61% no tenían estudios o estudios primarios) y solamente un 7.1% trabajaba en la agricultura. Por otra parte, un 16.61% de las madres encuestadas tenía percepción de la exposición de sus parejas a productos químicos durante el embarazo (pesticidas, fertilizantes, lejía, amoníaco, silicona, pegamentos, gasolina, disolventes, desinfectantes y radiación gamma).

Por último, en cuanto a las características antropométricas de los recién nacidos, se puso de manifiesto que, el valor medio de su peso al nacer era de 3306.46 g. Tan sólo un 4.5% presentaba bajo peso al nacer (<2500 g), según la clasificación de la OMS. El índice ponderal medio era de 25.71 g/cm³, la longitud de 50.77cm y el perímetro cefálico de 34.80 cm. La edad gestacional media fue de 39.38 semanas. Además, el 72.5% nacieron de forma espontánea y las estaciones del año donde se reclutaron mayor número de muestras fueron primavera (30.2%) y verano (35.7%).

Aunque la transferencia del pesticida organoclorado DDT de la madre al feto fue denunciada por primera vez en 1949 (Finnegan et al., 1949), pocos estudios han prestado atención al estudio de la presencia de pesticidas OCs en la placenta. Hasta la fecha han sido publicados algunos trabajos en la India (Saxena et al., 1980a; Saxena et al., 1981a; Saxena et al., 1981b; Siddiqui &

Saxena, 1985; Siddiqui et al., 2003), Oriente Medio (Polishuk et al., 1977), EE.UU. (O'Leary et al., 1970b; Cooper et al., 2001) y Europa (Eckenhansen et al., 1981; Bosse et al., 1996; Hura et al., 1999; Reichrtova et al., 1999; Falcon et al., 2004) y entre ellos tres estudios realizados por nuestro grupo de trabajo más recientemente (Cerrillo et al., 2005a; Olmos et al., 2006; López-Espinosa et al., 2006).

En la mayoría de los trabajos publicados sobre exposición transplacentaria a compuestos organoclorados, la cuantificación se ha realizado en el suero obtenido de sangre de cordón umbilical (Waliszewski et al., 2000b; Sala et al., 2001; Butler et al., 2003), pero en este trabajo se eligió estudiar la exposición mediante la cuantificación de los pesticidas organoclorados en tejido placentario bajo la premisa conceptual de que este tejido puede proporcionar información a dos niveles distintos: i) el grado de impregnación de la madre con respecto a estas sustancias y ii) el grado de exposición del feto. Además, la placenta es un espécimen biológico que no necesita un procedimiento invasivo para conseguir la muestra, es abundante y de fácil recolección (Payan et al., 1995; Iyengar & Rapp, 2001; Kaiglova et al., 2001).

Una dificultad a la hora de comparar nuestros resultados con los de otros trabajos que también han medido niveles de organoclorados en el tejido placentario, es la forma de expresión de los mismos, ya que estos lo han hecho indistintamente o bien por peso o bien por contenido lipídico de la placenta. Ambas formas de expresión han sido recogidas en el presente trabajo para facilitar así la comparación con un mayor rango de publicaciones. Falcon et al., (Falcon et al., 2004) en su estudio expresaron las concentraciones de DDT y HCH por gramo de tejido, argumentando que la capacidad de retención de OCs difería entre los lípidos de la placenta y de otros tejidos. Hamel et al. (2003) también decidieron no expresar los resultados de contaminación de residuos pesticidas en términos de contenido lipídico, argumentando que los efectos de una importante alteración del metabolismo de los lípidos durante el embarazo condicionan el contenido lipídico de la placenta. Sin embargo, Shen et al. (Shen et al., 2005) mantuvo la expresión de las concentraciones en una base lipídica para permitir la comparación con otros tejidos.

Desde nuestro punto de vista, hay que tener cuidado con la comparación de concentraciones de sustancias químicas lipofólicas en el tejido placentario con datos derivados de ajuste de la concentración de lípidos en sangre/suero o placenta. Primero, porque el tejido placentario sorprende por su bajo contenido en grasa (<3%), por lo que la determinación química del residuo resulta en valores más próximos a los niveles séricos que a los de tejido graso. Y segundo, parece ser que cuando se comparan los valores de pesticidas en placenta de nuestra población de estudio con los valores en el tejido adiposo de otras poblaciones similares, en la misma área geográfica (Rivas et al., 2001; Cerrillo et al., 2005b), la expresión de los niveles de organoclorados en suero por gramo de tejido adiposo resulta, con la excepción de la familia de los DDTs, en una magnificación de la exposición a organoclorados (Waliszewski et al., 2001; Waliszewski et al., 2002; Botella et al., 2004). Todo ello nos lleva a la conclusión que hasta que no se aclaren las dudas con respecto a la afinidad de los pesticidas con los diferentes componentes del material graso y otras sustancias que puedan retenerlos o transportarlos, podría ser arriesgado expresar los resultados referidos sólo al contenido graso, magnificando los resultados para aquellas sustancias más apolares, como es el caso de la familia de los endosulfanes. Aunque, como ya se ha dicho con anterioridad, en este trabajo se han expresado las concentraciones de las dos formas, ya que así se facilita el análisis epidemiológico y la comparación bibliográfica.

Para la extracción de los compuestos de interés del tejido placentario, se puso a punto una técnica que permitía un elevado porcentaje de recuperación de los pesticidas. Se hacía necesario, además, evitar la presencia en el extracto de otros contaminantes presentes en el tejido placentario así que, se procedió a la purificación del extracto mediante HPLC siendo las fases hexano y una mezcla hexano:metanol:isopropanol (40:45:15 v/v/v), única capaz de proporcionar un alto rendimiento para compuestos como el endosulfán y derivados (Rivas, 1999; Moreno et al., 2001).

En cuanto a la determinación de los pesticidas organoclorados, se realizó por cromatografía de gases y detector de captura de electrones, cuyos límites de detección son aceptables para el grado de exposición encontrado y su

reproducibilidad es muy elevada. Para una mayor resolución en la separación de los componentes de las mezclas problema, se utilizó en nuestro estudio, una columna capilar de 30 m de longitud. Las condiciones de este análisis cromatográfico, descritas en el apartado correspondiente, se desarrollaron y validaron específicamente por nuestro grupo (Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004; Olmos, 2005; López-Espinosa et al., 2006a). Dicha metodología fue seleccionada por responder a dos requisitos importantes: i) la precisión de la técnica y, ii) la reproducibilidad del método cromatográfico.

Todos los pesticidas estudiados eluyeron en tiempos de retención comprendidos entre 8 y 16 minutos, estableciéndose un tiempo total de 30 minutos para el análisis completo, lo que significó un tiempo de cromatografía óptimo para su aplicación continuada. Por otra parte, la confirmación de pesticidas organoclorados se realizó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. La obtención de espectros de masas fue de gran utilidad para la identificación posterior de los diferentes picos obtenidos en los cromatogramas correspondientes al análisis de las muestras (Cerrillo, 2003; Olmos, 2005).

Los pesticidas organoclorados identificados en las distintas muestras analizadas presentan una concentración variable desde niveles no detectables hasta valores del orden de ng/g placenta o $\mu\text{g/g}$ lípido, tal y como se observa en el capítulo correspondiente a resultados de esta memoria. El resultado más sorprendente y de mayor repercusión, en términos de salud, derivado de esta investigación, es el que hace referencia a la elevada impregnación por pesticidas organoclorados de las muestras de placenta analizadas, ya que el 100% de los individuos tenían al menos un pesticida en cantidad cuantificable y una media de frecuencia de 7.61 pesticidas por muestra. Por otra parte, cualquier valor detectado distinto de cero debería ser considerado preocupante, habida cuenta que una exposición tan elevada por parte de la población tendría, si se comprueban los efectos en la salud derivados de la acción combinada de estas sustancias, un impacto importante en el ámbito de la salud pública. Todo lo anterior debería conducirnos a la reflexión y al replanteamiento de posteriores investigaciones. El orden de frecuencia de aparición identificados en más de la

mitad de las muestras fue p,p'DDE>lindano>endosulfán-diol>endosulfán-l>o,p'DDT>endosulfán-sulfato>endosulfán-éter.

Un mayor número de residuos de pesticidas por muestra de tejido placentario fue asociado estadísticamente con la percepción de las madres de estar expuestas a contaminantes químicos y con el nivel de estudios del padre, de tal manera que, era mayor el número medio de pesticidas en mujeres que afirmaron estar expuestas y en padres que no tenían estudios o tenían estudios primarios. Hay que destacar que, a pesar de no existir asociación entre el tipo de trabajo de la madre y los niveles medios de pesticidas cuando se realizó el análisis bivariado, las mujeres con actividad agrícola tenían de media un pesticida más en su tejido placentario que las no dedicadas a este tipo de actividad. Además, cuando se estudiaron la influencia de un conjunto de dos variables sobre el número de pesticidas por muestra, se puso de manifiesto que el número medio de residuos de pesticidas era mayor entre el grupo de mujeres agricultoras y que afirmaron exposición a contaminantes y entre el grupo de mujeres primíparas que vivían en un área rural. Estos resultados parecen confirmar lo descrito en estudios previos que han puesto de manifiesto la mayor exposición a pesticidas por parte de aquellas personas dedicadas a la agricultura (Schwartz et al., 1986; Fenske et al., 2000; Cooper et al., 2001). En un estudio realizado por nuestro grupo con anterioridad con un tamaño muestral de 150 placentas de mujeres residentes en el sureste español, un mayor número de pesticidas por muestra fue asociado con un más alto IMC y con madres primíparas (López-Espinosa et al., 2006a).

Con respecto a las variables antropométricas del niño, un mayor número de residuos de pesticidas en tejido placentario fue asociado con un menor peso del niño, alcanzándose la significación estadística para un subgrupo de 150 muestras (López-Espinosa et al., 2006a), lo que confirma observaciones previas de una asociación entre sustancias químicas persistentes y reducido peso y longitud en el niño (Karmaus & Wolf, 1995; Schade & Heinzow, 1998; Ribas-Fito et al., 2002; Siddiqui et al., 2003; Weisskopf et al., 2005). En el presente trabajo, la asociación significativa no se alcanzó, pero se vio que cuanto menor era el peso del niño, mayor era el número de pesticidas por muestra. Con respecto a

las características del parto, en el presente estudio apareció una asociación con la estación del año, encontrando niveles medios del número de residuos mayores en tejidos placentarios de madres que tuvieron niños en primavera seguido de los que nacieron en verano.

Por último destacar que, el número medio de pesticidas por muestra se asoció con la frecuencia de consumo de vegetales verdes frescos y pescado azul. En ambos casos, las madres que consumieron con poca asiduidad este tipo de alimentos (1-3 veces al mes), eran las que presentaban mayor número medio de pesticidas.

El DDT y metabolitos fueron prohibidos en España en 1977, sin embargo, la vida media del o,p'DDT y del p,p'DDT se ha estimado en torno a los siete años en seres vivos y se han sugerido tiempos aún mayores para el metabolito p,p'-DDE, por lo que no sólo los productos comerciales sino también los metabolitos deben ser considerados en todo tipo de estudios en los que se evalúe la exposición a compuestos organoclorados. En este trabajo, p,p'DDE fue el compuesto más frecuentemente cuantificado en las muestras de tejido placentario (92.7%) y el segundo más abundante (concentración media de 2.79 ng/g placenta, que correspondía a 92.29 ng/g lípido, nivel muy superior al de los otros pesticidas englobados en este grupo), hallazgo que coincide con observaciones hechas por otros autores, que encontraron una alta proporción de individuos con este residuo en el tejido placentario (Saxena et al., 1980b; Reichrtova et al., 1999; Falcon et al., 2004; Shen et al., 2005). En este trabajo, el DDE tuvo mayor frecuencia de aparición (\geq LC) y mayores niveles medios que el DDT, ya que este último fue encontrado en un 46% de las muestras analizadas con una concentración de 0.77 ng/g placenta que correspondía a 27.16 ng/g lípido. Los niveles medios de p,p'DDE y p,p'DDT, junto con el valor medio de suma de DDTs (5.54 ng/g placenta ó 189.04 ng/g lípido) son bastante más bajos que los recogidos por Falcon et al., (2004) en Murcia. En la serie murciana, reclutada desde 1998 a 2000, encontraron un valor de DDT total de 49.4 ± 73.6 ng/g de tejido, similar valor al encontrado por Hura et al., (1999) en la población rumana entre 1996 y 1997 (35.0 μ g/Kg). Los resultados de nuestro trabajo son similares a los que han sido recientemente publicados en un estudio realizado en

Finlandia en placentas colectadas entre 1997 y 2001, las cuales contenían de media un valor de p,p'DDE de 21.94 ± 5.25 ng/g de lípido (Shen et al., 2005) o Eslovaquia (Reichrtova et al., 1999), con niveles medios que variaban entre 2.2 $\mu\text{g/Kg}$ (zona industrial) y 0.1 $\mu\text{g/Kg}$ (zona rural) y menores que los recogidos por estudios de países como la India (Siddiqui et al., 2003) con niveles medios de p,p'DDE del orden de 8.89 ppb. Por último, nuestro grupo de estudio ha investigado recientemente la frecuencia de aparición y los niveles de 17 pesticidas OCs en 150 placentas de mujeres residentes en la misma área (López-Espinosa et al., 2006a) con niveles medios y frecuencia de aparición de la familia de DDTs prácticamente idénticos a los de este trabajo. Sirva como ejemplo que la media de p,p'DDE era de 2.37 ng/g placenta, que correspondía a 76.62 ng/g lípido y la frecuencia de aparición de un 96%.

La presencia de p,p'DDT en la placenta de mujeres jóvenes, sólo se puede explicar a través de una exposición reciente al producto comercial. Se ha discutido frecuentemente que aún hoy día puede ocurrir exposición a DDT de forma directa, bien porque alcanza nuestro medio a través de aire y alimentos que lo traen de zonas geográficas donde aún se usa o bien porque puede estar ocurriendo un uso fraudulento del pesticida (Porta et al., 2002). Además, el DDT aparece como contaminante en las formulaciones de dicofol (Van de Plassche et al., 2003), producto fabricado actualmente por cinco países: España, Brasil, China, India e Israel.

A este respecto, algunas informaciones pueden ser de interés. En primer lugar, el trabajo de Espigares y colaboradores (1997) que sugirió el uso actual de DDT en zonas agrícolas que vierten aguas sobre el tramo inicial del río Guadalquivir. En segundo lugar, el informe del CSIC sobre la ría de Huelva que denunciaba la presencia de DDT en aire, suelo y alimentos tales como frutas, verduras, carnes y pescado en concentraciones significativas (CSIC, 2001). El estudio de Fernández et al., (2000) que también sugería el uso actual de DDT en el parque regional Sudeste de Madrid cuyo residuo se encontraba en aguas superficiales y suelos. El estudio de la UE sobre residuos de plaguicidas comercializados en el mercado (Commission of the European Communities. Commission Staff Working Document, 2005), que reveló en su último informe

que el tercer pesticida más frecuentemente encontrado en frutas y verduras de origen español era el dicofol. Y por último, el estudio realizado por INTERLAB para la Confederación Hidrográfica del Ebro, en el que se denunció la alta contaminación de este río por DDT y metabolitos y se recomendó el no consumo de peces (INTERLAB para la Confederación Hidrográfica del Ebro, 1999), procedente dicha contaminación, posiblemente, de la fábrica localizada a orillas de este río en la que se sigue produciendo dicofol. En los tres primeros casos referidos, la sospecha de empleo actual del organoclorado venía dada por el estudio del cociente DDE/DDT que favorecía al compuesto comercial sobre el metabolito. Y en los dos últimos casos, por el empleo de dicofol, pesticida para cuya fabricación se usa DDT y que puede legalmente contener algo del residuo de compuesto intermediario (<1%). Por todo ello, estas causas deben ser consideradas a la hora de interpretar nuestros hallazgos.

Con respecto a la exposición alimentaria a esta familia de compuestos, son frecuentes los estudios hechos en España, que muestran como los alimentos ricos en grasa son una vía importante de exposición al DDE (Bentabol & Jodral, 1995; Álvarez-Pineiro et al., 1995; Lázaro et al., 1996; Urieta et al., 1996; Campoy et al., 2001b). En principio, esto debería justificar por sí solo los niveles de este pesticida encontrados en la población de estudio. En este trabajo, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la familia de DDTs y la frecuencia de consumo de alimentos grasos. Solamente se encontró dicha asociación entre niveles de p,p'DDE y consumo de queso fresco y pescado blanco y entre niveles de la sumatoria de DDTs y frecuencia de consumo de queso fresco, encontrando en todos los casos mayores niveles en mujeres que durante el embarazo consumieron pocas cantidades de estos productos. Esto podría demostrar que no es descartable la exposición directa al compuesto comercial a través de la exposición ocupacional o medioambiental.

Según diversos investigadores (Ahlborg et al., 1995; Doong et al., 1999), es interesante la relación que se puede establecer entre las concentraciones de DDT y su metabolito DDE, de tal modo que valores altos en el cociente DDE/DDT indican una exposición antigua al pesticida. Un aumento de este cociente es una indicación clara de la metabolización del DDT, tanto en el medio

ambiente como en el interior del organismo. Así, por ejemplo, en series de individuos investigadas entre 1995-2000, el cociente DDE/DDT variaba entre 48 en Finlandia, 19 en Corea, 7.2 en México y 3.6 en Jordania en función de lo reciente que fue empleado el DDT (Alawi et al., 1999).

En lo que respecta a variación en el tiempo, sirva de ejemplo el estudio de Ankara (Turquia) que ofrecía una evolución del cociente DDE/DDT de 3.19-9.40 a 13.77-20.82 (Cok et al., 1997) y que se atribuía a un predominio cada vez más importante de la concentración del metabolito sobre el producto comercial, una vez que éste fue prohibido.

En nuestro estudio, fueron 139 muestras placentarias las que presentaron ambos pesticidas y el cociente $p,p'DDE/p,p'DDT$ dio un valor medio de 3.32. Los altos valores medios del componente mayoritario del producto comercial de este grupo de individuos parece ser la causa del bajo ratio $p,p'DDE/p,p'DDT$ encontrado, que la concentración media del DDE estaba dentro de los niveles esperados para esta población. En otro estudio realizado recientemente por nuestro grupo de trabajo, en el que se observó la exposición medioambiental a un total de 18 pesticidas OCs, mediante el estudio de muestras de sangre de varones jóvenes de edad media 21 años, se observó que la ratio de $p,p'DDE/p,p'DDT$ en sangre era de 1.51 (Carreño, 2005). Los resultados de ambos estudios parecen indicar que al menos para un grupo importante de la población residente en el sudeste español, la exposición actual al producto comercial es un hecho real. No obstante, cuando se considera la totalidad de individuos que presentaron residuos placentarios de DDE y se asigna un valor al residuo de DDT para cada uno de ellos, la nueva estimación del cociente $p,p'DDE/p,p'DDT$ resulta en 8.85, cifra más acorde con la esperada para una región europea. En el estudio de Carreño, al realizar ésta ratio, el valor obtenido fue de 10.5 (Carreño, 2005).

La mezcla comercial de DDT empleada habitualmente presenta cantidades variables de sus derivados, de tal forma que el $p,p'DDT$ supone hasta un 77% del total y que incluso se puede encontrar hasta un 4% del metabolito $p,p'DDE$. En definitiva, ya sea por el metabolismo del DDT, que se transforma en DDE, y sigue siendo una molécula lipofílica difícilmente biodegradable y queda

por tanto almacenada en el tejido adiposo, ya sea por la participación de sus isómeros y metabolitos en la mezcla comercial, lo cierto es que la frecuencia de DDE en tejido placentario es significativamente más alta que en el resto de compuestos organoclorados estudiados. Las correlaciones positivas y significativas entre los niveles de p,p'DDT y o,p'DDT, p,p'DDE, o,p'DDD y sumatoria de DDTs, y entre los niveles de o,p'DDT, p,p'DDE, o,p'DDD y sumatoria de DDTs en las muestras de tejido placentario, dan una idea de la relación entre la exposición al producto comercial y su metabolización.

En 1970, el Comité de Toxicología, Consejo de Salud Ocupacional, de la Sociedad Médica Americana, emitía un informe sobre la influencia del DDT en la salud humana (JAMA, 1970) en el que se cuestionaba, quizás por primera vez, la influencia del DDT sobre la reproducción humana y, si bien ponía en entredicho tal asociación, desaconsejaba el uso del pesticida en las áreas geográficas en las que el DDT había creado un verdadero problema de supervivencia animal o dañado al medio ambiente. Pasados 36 años desde la publicación de esta nota en el Journal of the American Medical Association, estudios como el actual o los realizados en otras partes de España (Falcon et al., 2004), Finlandia (Shen et al., 2005), Rumanía (Hura et al., 1999) o Eslovaquia (Reichrtova et al., 1999), siguen denunciando la aparición de los compuestos de esta familia en la placenta, demostrando una vez más la exposición real y actual a estas sustancias. La dejadez de la administración y la pasividad de los expertos, a pesar del conocimiento de un hecho cierto, la sensación de que a pesar de la exposición "no va a ocurrir nada", y la confianza ciega en que la naturaleza lo arreglará todo, conduce a la situación actual, los embriones/fetos están expuestos a una multitud de compuestos químicos producidos por el hombre, sobre los que recae la sospecha de un detrimento importante sobre la salud individual y poblacional.

Entrando en las asociaciones entre las variables de la encuesta y los niveles y frecuencia de aparición de los pesticidas, la edad parece ser un buen determinante del acúmulo de p,p'DDT, de tal manera que, como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, a mayor edad corresponden mayores niveles y frecuencia de aparición de p,p'DDT, encontrándose valores medios más

elevados y mayor frecuencia de aparición en tejido placentario de este compuesto cuanto mayor era la edad de las madres. Ciertamente es que el rango de edad de las participantes incluidas en este trabajo era muy limitado, que abarcaba un grupo de edad muy reducido (16-46 años) y con una posible exposición histórica distinta. Esta asociación estadística positiva entre edad de la madre y niveles de DDT también se encontró en las muestras de sangre de la cohorte de varones jóvenes del estudio de Carreño (2005), en las muestras de leche materna de mujeres onubenses (Martínez et al., 1993) y en las muestras de sangre materna en la India (Saxena et al., 1981a), que mostraban mayores niveles de p,p'-DDT con la edad de los individuos. Resultados además corroborados por otros estudios en los que se encontraron mayores niveles de DDE en muestras de cordón umbilical en madres de mayor edad (Rhoads et al., 1999; Covaci et al., 2002). Sin embargo, no todos los estudios han podido establecer una relación positiva entre un mayor contenido de DDE en muestras humanas y mayor edad de la madre, como por ejemplo el estudio llevado a cabo en Croacia con muestras de sangre de cordón umbilical y leche (Krauthacker et al., 1980) y otro realizado en Brasil, en muestras de sangre de cordón umbilical (Sarcinelli et al., 2003). Por último señalar, que al realizar el análisis estadístico entre las propias variables de la encuesta estudiadas, se encontró que la edad de la madre estaba asociado con el IMC antes del embarazo (a mayor edad, mayor IMC), ganancia de peso (a mayor edad, menor ganancia de peso), número de hijos (a mayor edad, mayor número de hijos), hábito tabáquico (a mayor edad, menor número de mujeres fumadoras durante el embarazo) y nivel de estudios (a mayor edad, mayor número de mujeres con estudios superiores y a menor edad, mayor número de mujeres sin estudios o con estudios primarios).

Los pesticidas organoclorados, lipofílicos y persistentes, tienden a acumularse en los tejidos ricos en grasa de los organismos (Travis et al., 1988). Tras el depósito, entran en un estado de equilibrio, biocentrándose en la parte lipídica de acuerdo a su partición (Rogan et al., 1986b). Durante el embarazo, las tasas de lipólisis y lipogénesis alcanzan un momento crítico (McNamara, 1994), motivo suficiente para que los pesticidas almacenados en tejido adiposo sean liberados a la sangre, siendo transportados posteriormente a través de la

placenta y finalmente alcancen el feto (Waliszewski et al., 2000c). Por esta razón, el índice de masa corporal (IMC) antes del embarazo puede condicionar los niveles circulantes de organoclorados, por lo que debería considerarse *a priori* como un factor modificador de exposición a sustancias lipofílicas. Por este motivo se sugirió en la fase de diseño del trabajo la necesidad de recoger entre las variables de la encuesta epidemiológica tanto el peso como la altura de los participantes y poder considerar así el IMC en el estudio. Nuestros resultados han confirmado esta asociación al mostrar una relación estadísticamente significativa entre el IMC y los niveles de p,p'DDE y p,p'DDT. A este respecto la observación de Wolff y Anderson (1999) sobre el efecto dilución que puede atribuirse al exceso de grasa en el individuo obeso, se cumple para el p,p'DDT, que muestra niveles inferiores en aquellas mujeres con valores superiores de IMC. No ocurre lo mismo con el p,p'DDE que muestra sus niveles más altos en las madres con valores de IMC superiores. Cuando se estudió la influencia de dos variables conjuntamente sobre los niveles de p,p'DDE, apareció una tendencia a una asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones de este compuesto, la edad y el IMC, encontrando niveles medios de este último mayores entre las mujeres con menor edad y mayor IMC. Cerrillo et al. (2005b) investigaron la presencia de 16 pesticidas OCs en tejido adiposo de 458 mujeres de la misma región que las del presente estudio. En este trabajo se demostró que todas las mujeres (edad media de 56 ± 0.46 años) tenían al menos uno de los pesticidas estudiados, sugiriendo una amplia y frecuente exposición a pesticidas Ocs en el sureste español y se señaló que la abundancia de p,p'DDE era dependiente del IMC. Finalmente, al realizar el análisis estadístico entre las propias variables de la encuesta, el IMC estaba asociado con la ganancia de peso (a mayor IMC, menor ganancia de peso), paridad (mayor IMC entra las multíparas), perímetro cefálico, peso del niño, IP (a mayor IMC mayor perímetro cefálico, peso e IP) y número de hijos (a mayor IMC mayor número de hijos).

Otra de las variables consideradas en este estudio fue la ganancia de peso durante el embarazo, como factor a tener en cuenta indicativo de la posible movilización de compuestos químicos y su paso a través de la placenta. Los

niveles medios de p,p'DDE placentario eran mayores entre las madres con una menor ganancia de peso, que a su vez eran las que tenían mayores IMC antes del embarazo, como se vio con anteriormente. También la frecuencia de aparición de p,p'DDE y sumatoria de DDTs en el tejido placentario eran algo mayor entre las madres que ganaron menos de 12 Kg durante la gestación. Finalmente, con respecto al análisis estadístico de las variables entre sí, la ganancia de peso se asoció estadísticamente de forma significativa con el peso del niño (a mayor ganancia de peso durante el embarazo mayor peso del niño al nacer), número de hijos (a mayor ganancia de peso, menor número de hijos) y paridad (mayor ganancia de peso entre primíparas).

En este estudio se consideró también la variable paridad y el número de hijos, encontrando una tendencia a la asociación estadística entre menores niveles de la sumatoria de DDTs en mujeres multíparas, y con mayor número de hijos. Comportamiento que se repite en la serie de mujeres estudiadas por Araque (2005), con edad media 61 años y residentes en la misma zona de estudio, en la que se encontraron mayores niveles de sumatoria de DDTs en el tejido mamario y en sangre de aquellas mujeres que no había estado embarazadas. A pesar de no encontrar demasiadas asociaciones estadísticas entre la paridad y los niveles de pesticidas en el análisis bivariado, en el análisis multivariado, la paridad resultó uno de los factores más determinantes de los niveles de pesticidas pertenecientes a la familia de los DDTs ya que el grupo de madres que eran primíparas y de mayor edad, así como el grupo de primíparas que ganaron más de 12 Kg durante el embarazo, presentaron los niveles medios de p,p'DDE más elevados. Los niveles medios menores de p,p'DDE se encontraron en madres primíparas con menor edad y multíparas con mayor ganancia de peso. Para el caso del o,p'DDD, las primíparas con edad ≤ 32 años eran las que presentaron unos niveles medios mayores y los niveles medios menores las de ≤ 32 años y multíparas. Por último, las primíparas con residencia urbana presentaban las concentraciones más altas de o,p'DDT, y las multíparas con residencia rural las menores. Existen estudios que han demostrado una mayor exposición a contaminantes en niños lactantes (Longnecker & Rogan, 2001) y disminución de las concentraciones en madres que dan de lactar (López-

Carrillo et al., 2001), encontrando por tanto mayores niveles medios de pesticidas organoclorados en madres primíparas con respecto a las multíparas (Skaare & Polder, 1990b; Nair et al., 1996). Además, también ha sido sugerido que el número de hijos previos de una madre, disminuye la exposición del nuevo hijo, debido a la limpieza de compuestos persistentes en cada lactancia previa (Karmaus et al., 2001a). No obstante, no siempre se ha establecido la relación entre el número de embarazos y una menor carga de OCs, como es el caso del estudio realizado en muestras de leche materna de madres onubenses (Martínez et al., 1993), si bien es cierto que, esta cohorte presentaba una escasa paridad previa; o entre los niveles de pesticidas en sangre de madre holandesas, no encontrando diferencias, atendiendo a si éstas habían dado el pecho o no (Eckenhansen et al., 1981).

El hábito tabáquico durante el embarazo también podría condicionar los niveles de pesticidas encontrados en las muestras de placenta, así se encontró que el 96.42 y 100% de las madres que fumaron tenían p,p'DDE y sumatoria de DDTs en su tejido placentario, respectivamente. Resaltar también que, el hábito tabáquico durante el embarazo se asoció estadísticamente con menores pesos de los niños al nacer.

El carácter rural o urbano de la zona de residencia de la madre fue una de las variables que se analizó con mayor interés en el estudio: en principio, cabría esperar que el ambiente rural podría condicionar la mayor exposición a pesticidas organoclorados. De hecho, la frecuencia de aparición de o,p'DDD era mayor en el grupo de mujeres que vivían en un área rural, pero paradójicamente, los niveles medios de éste y de la sumatoria de DDTs eran mayores entre las madres con residencia urbana. Cabría esperar que al estudiar de forma conjunta las variables se obtuviera alguna explicación de algún factor más que influyera sobre los niveles de estos compuestos a parte de la ruralidad, pero en todos los casos los niveles medios de pesticidas eran mayores entre mujeres con residencia urbana y no fumadoras (sumatoria de DDTs, o,p'DDD), residencia urbana y ganancia de peso ≤ 12 Kg (sumatoria de DDTs) y residencia urbana y ser primípara (o,p'DDT). Por otra parte, los niveles medios menores se encontraron en madres con residencia rural y fumadoras, para el caso de

o,p´DDD, residencia rural y no fumadoras, para el caso de sumatoria de DDTs y residencia urbana y ganancia de peso $\leq 12\text{Kg}$ para la sumatoria de DDTs y multíparas y residencia urbana para el caso del o,p´DDT. Comportamiento que se repite en la serie de mujeres eslovacas (Reichrtova et al., 1999), ya que la frecuencia y los niveles medios de p,p´DDT y p,p´DDE eran también mayores entre mujeres que vivían en una zona urbana con respecto a las que vivían en una zona rural. De todas maneras, la asignación del carácter de rural o urbano a un municipio tan solo considerando el número de sus habitantes puede ser tan ingenua como imprecisa. Por esta razón, se ha prestado mayor atención a la profesión de los padres, a la exposición laboral y a la exposición percibida a la hora de clarificar la exposición de carácter profesional y laboral.

En cuanto al trabajo de la madre y/o padre no se hallaron asociaciones estadísticamente positivas con esta familia de compuestos a excepción de los niveles de p,p´DDE y el trabajo del padre, siendo mayores estos niveles en los tejidos placentarios de madres cuyas parejas se dedicaban a trabajos manuales, seguido de los que trabajaban en otro tipo de trabajos (no relacionados con actividades agrícolas o trabajos manuales) y, por último, agricultores.

Finalmente, se observó también que cuanto menor era el nivel educativo de las mujeres participantes en el estudio, mayor nivel de p,p´DDE en tejido placentario. Además, el o,p´DDD tendía a estar significativamente asociado con el nivel de estudios, encontrando mayores niveles entre las mujeres con estudios medios. La asociación entre un menor niveles educacional y los niveles de compuestos de la familia de los DDT, también ha sido señalada con anterioridad por nuestro grupo (Cerrillo, 2003; Araque, 2005).

En cuanto al análisis estadístico de las propias variables de la encuesta entre sí, se encontró que dos terceras partes de las mujeres que vivían en una área rural no tenían estudios o tenían estudios primarios y el 69.4% de las que trabajaban en el hogar y el 87% de las que llevaban a cabo tareas en el campo también vivían en un área rural. En cuanto al nivel de estudios, la mayor parte de las que trabajaban en el campo o en el hogar no tenían estudios o solamente tenían estudios primarios (87 y 72%, respectivamente). Del total de mujeres multíparas, un 69.47% y un 73.33% eran agricultoras o trabajaban en el hogar. Y

el número de hijos era mayor entre el grupo de las madres que trabajaban en el campo. Además, la percepción de la exposición a sustancias químicas se asoció estadísticamente con las semanas de gestación, siendo mayor el número de semanas entre el grupo de madres que no percibieron estar expuestas. De todas las madres que tuvieron un parto espontáneo, el 60.6% eran multíparas, cuanto mayor número de hijos habían tenido las madres con anterioridad, mayor era el peso del niño, el IP y mayor probabilidad de tener un parto espontáneo. Con respecto a las características de los padres, apareció una asociación estadística entre el nivel de estudios y la edad del padre, con edades mayores en el momento del parto entre los padres que tenían estudios superiores. Además, la totalidad de los padres agricultores o no tenían estudios o tenían estudios primarios. En cambio, dos terceras partes de los que trabajaban en actividades no relacionadas con el campo o trabajos manuales, tenían estudios superiores. Por último, también apareció una asociación estadística entre la edad del padre y el tipo de actividad desarrollada, siendo los agricultores los de mayor edad.

También se observaron asociaciones entre la presencia (\geq LC) o ausencia ($<$ LC) y niveles de la familia de DDTs y las características del niño. Los tejidos placentario de los niños cuyo peso estaba por encima del percentil 5% de acuerdo con las semanas de gestación con la que nacieron (niños normales para la edad gestacional) según la tabla de De Doubilet et al., (1997a), presentaban unos niveles medios y una frecuencia de aparición de p,p'DDT del orden de dos veces los niveles medios de niños pequeños para la edad gestacional.

También, el o,p'DDT presentaba una asociación estadística positiva entre mayores niveles de este compuesto y mayor perímetro cefálico así como entre la presencia o ausencia de o,p'DDT y el peso del niño, encontrando una mayor frecuencia de aparición de este compuesto entre niños con peso \geq 2500g. Hallazgo ya demostrado por nuestro grupo de trabajo con anterioridad (López-Espinosa et al., 2006a), encontrándose niveles mayores de este compuesto cuanto mayores eran los pesos al nacer en un subgrupo de 150 placentas. Cuando se consideró conjuntamente la variable edad gestacional y peso del niño se vio que los niños normales para la edad gestacional presentaban unos niveles medios y una frecuencia de aparición de o,p'DDT del orden de dos veces los

niveles medios de niños pequeños para la edad gestacional. No obstante, también hay que señalar que, cuando se consideró el criterio de niño pequeño para la edad gestacional cuando su peso era al menos dos desviaciones estándar bajo la media ($\leq -2DE$) para su edad gestacional, basado en datos derivados de la población de referencia (Lee et al., 2003), la frecuencia de aparición de o,p´DDT era mayor en los casos (N=6; frecuencia=100%) que en la cohorte total (N=308; frecuencia=52.3%), aunque el número muestral resultó ser muy reducido.

Como ya hemos visto con anterioridad, los niveles medios de p,p´DDT y o,p´DDT, eran dos veces más elevados entre los niños normales para la edad gestacional en comparación con los pequeños para la edad gestacional. Longnecker et al., (2001), tampoco consiguieron establecer una asociación entre los niveles de DDE en sangre materna y la probabilidad de tener un niño pequeño para la edad gestacional, por lo que una hipótesis a este respecto está pendiente de resolverse.

Para el caso del principal metabolito de p,p´DDT, se observó una asociación rozando la significación estadística entre los niveles de p,p´DDE y el peso del niño, con mayores niveles de p,p´DDE en niños con un menor peso. También se observó una frecuencia de aparición algo mayor en la placenta correspondiente a niños pequeños para la edad gestacional, cuyo peso se situaba al menos dos desviaciones estándar por debajo de la media ($\leq -2DE$) con respecto a la población de referencia, aunque, como ya se ha comentado, el número de individuos era pequeño (N=6). Cuando se estudiaron de forma conjunta la influencia de las variables peso del niño y semanas de gestación sobre los niveles de p,p´DDE mediante el test ANOVA de dos vías, eran los niños nacidos tras más de 37 semanas de gestación con un peso $< 2500g$ los que tenían placentas con mayores niveles medios de p,p´DDE. Por último, cuando se consideró el criterio de niño pequeño para la edad gestacional cuando su peso era al menos dos desviaciones estándar por debajo de la media ($\leq -2DE$) para la edad gestacional, la frecuencia de aparición de DDTs, fue mayor en este grupo (N=6; frecuencia=100%) que en el resto de la población.

Varios son los estudios existentes en la literatura que sugieren una relación inversa entre la exposición intrauterina a DDT (O'Leary et al., 1970a) o DDE (Longnecker et al., 2001; Weisskopf et al., 2005) y bajo peso al nacer, aunque no en todos los casos se pudo establecer tal asociación (Rogan et al., 1986b; Rhainds et al., 1999).

En cuanto al análisis estadístico de las variables de la encuesta del recién nacido entre sí, se encontró que a mayor peso mayor perímetro cefálico, índice ponderal y número de semanas de gestación. También, a mayor perímetro cefálico, mayor IP y número de semanas de gestación. Al considerar la variable pequeño para la edad gestacional como el percentil 5% de la tabla de pesos dada por De Doubilet et al., (1997a), y recogida en el apartado de resultados de este trabajo, en la que por debajo de dicho percentil 5%, el peso del niño se consideraba pequeño para la edad gestacional, las únicas variables con las que se asoció ésta fue con el nivel de estudios de la madre y la percepción de la exposición paterna a contaminantes químicos. Más de la mitad de las madres con niños pequeños para la edad gestacional, tenían estudios medios y alrededor de un 40% de estas mujeres percibieron exposición paterna a contaminantes químicos. Si en vez de considerar el percentil 5% de la tabla de pesos, se consideraba niño pequeño para la edad gestacional aquel cuyo peso era al menos 2 DE por debajo de la media ($\leq -2DE$) para la edad gestacional con la que nació, basado en datos derivados de la población de estudio, que era casi como considerar los pesos de los niños por debajo del percentil 3 (Lee et al., 2003), la cantidad de niños de la serie con esta característica disminuyó de 18 a 6. El número era tan pequeño que era imposible un análisis estadístico de los resultados, aun así, se vio que con respecto al total de la población (N=308), había una mayor proporción de mujeres que vivieron en un área rural (41.56%), fumadoras (50%) y con percepción de exposición paterna a contaminantes químicos (50%). De todas formas, estos resultados deben ser considerados con precaución puesto que el número de casos era muy pequeño.

El caso del comportamiento del residuo de endosulfán es especialmente interesante cuando se compara con los demás pesticidas organoclorados estudiados, pues a diferencia de otros organoclorados de uso histórico su

empleo es frecuente y su utilización en áreas de agricultura intensiva en la península Ibérica es una práctica habitual, por lo que no cabe duda de que se trata de una de las exposiciones a pesticidas de mayor interés en nuestro ámbito de estudio (Olea N et al., 1996; Olea et al., 1999). De hecho, la decisión de incluir endosulfán y sus metabolitos en este estudio y en los que ha realizado nuestro grupo con anterioridad se tomó tras conocer su uso extensivo en España (Olea N et al., 1996) y su presencia en población adulta en España (Rivas et al., 2001; Botella et al., 2004; Cerrillo et al., 2005a; Cerrillo et al., 2005b) y Europa (Cruz et al., 2003). La principal fuente de exposición a este pesticida para la población general es la dieta, principalmente fruta y verdura (Arrebola et al., 2001) o bien la ingestión de agua contaminada (Frenich et al., 2001). Es de resaltar que el endosulfán es el octavo pesticida detectado más frecuentemente en frutas y verduras en España (Commission of the European Communities. Commission Staff Working Document, 2005) y el segundo en el grupo de los organoclorados tras el dicofol.

El endosulfán es el pesticida organoclorado que ocupa, hoy día, el primer lugar en consumo en los países del sur de Europa, siendo nuestro país el principal consumidor europeo de este pesticida (Endosulfan Preliminary Dossier, 2003). Se trata de un pesticida de amplio espectro que se utiliza para combatir plagas en cultivos de cítricos y hortalizas, algodón, arroz y café. Está formado por una mezcla de isómeros y metabolitos cuya proporción varía dependiendo del medio biológico que se analice; la mezcla comercial está formada por los isómeros α (I) y β (II) con un 70% del primero- frente a un 30% del segundo.

El consumo de cantidades importantes de endosulfán en el medio agrícola ha provocado que su presencia medio ambiental sea cada vez más frecuente. En aquellos trabajos en los que se ha buscado expresamente la persistencia de endosulfán como contaminantes de alimentos, aguas, aire o suelos se ha puesto de manifiesto que, hoy día, ocupa uno de los primeros lugares en cuanto a concentración y porcentaje de muestras positivas, en muchos casos comparable a la presencia del DDT y sus metabolitos. De hecho, los informes científicos sobre la presencia de este pesticida en medio ambiente son un tanto preocupantes. Por ejemplo, en los trabajos publicados correspondientes a la

Península Ibérica, endosulfán era el pesticida más frecuentemente encontrado en el análisis de aguas superficiales realizado en Almería (Fernández Alba et al., 1998) y en la Comunidad Valenciana (Hernández et al., 1996). Algunos trabajos publicados han establecido las curvas de disipación del endosulfán-I, -II y -sulfato en el aire de los invernaderos (Vidal et al., 1997) y la absorción del pesticida en los films de plástico utilizados para cubrir los suelos agrícolas (Nerin et al., 1997). Es interesante hacer notar que este último trabajo demuestra que una vez absorbido, el endosulfán permanece en el plástico sin que sufra ningún proceso de degradación, hecho que debe atraer la atención sobre el proceso de reciclamiento de plásticos y la manipulación laboral de este material contaminado.

Desde el punto de vista de la exposición humana, es cada vez más frecuente encontrar al pesticida endosulfán en las listas de organoclorados estudiados en las muestras biológicas (Hernández et al., 2002; Ramesh & Ravi, 2003; Botella et al., 2004), incluida la exposición transplacentaria a endosulfán (Cerrillo et al., 2005a; Shen et al., 2005; López-Espinosa., 2006).

En este trabajo, endosulfán y sus metabolitos, se encontraron en el 95.7% de las muestras analizadas, con una frecuencia para los isómeros I y II, de 54.2% y 30.8%, respectivamente. Los metabolitos investigados se hallaron, no obstante, en una proporción mayor de las muestras, ocupando el primer lugar en frecuencia el endosulfán-diol, que se encontró en un 62.1% de las placentas, en concentraciones medias superiores al resto de los metabolitos y pesticidas estudiados (4.15 ng/g placenta ó 156.73 ng/g lípido). Es interesante esta observación, ya que, de acuerdo con el proceso metabólico del endosulfán, estos metabolitos se distribuyen según su lipofilidad, existiendo un equilibrio para el endosulfán-éter y endosulfán-diol en suero y orina, debido a su mayor hidrosolubilidad (Botella et al., 2004). El endosulfán-I es más persistente que el endosulfán-II de modo que se estima una persistencia media del primero de hasta 800 días frente a 60 días del isómero II, posiblemente por una degradación aeróbica del endosulfán-II hasta su isómero I (Doong et al., 1999). El metabolismo en seres superiores supone su transformación hacia las formas más hidrosolubles; el metabolito principal sería el endosulfán-sulfato, pero una

segunda vía de interés es su transformación en endosulfán-éter, que está en equilibrio con endosulfán-diol. La bibliografía consultada ha puesto de manifiesto la excreción de algunos de estos metabolitos en la fracción grasa de la leche humana (Campoy et al., 2001a; Waliszewski et al., 2002; Pardo et al., 2003) y su presencia se ha constatado en el suero y la orina de individuos expuestos. En el presente trabajo, endosulfán-I se correlacionó positiva y significativamente con los niveles de endosulfán-II, endosulfán-éter, endosulfán-diol y la sumatoria de endosulfanes en la placenta. Correlación que resulta de gran utilidad para establecer la relación entre la exposición al producto comercial y su metabolización.

Al comparar nuestros resultados con los de otras publicaciones anteriores se vio que en placentas finlandesas, Shen et al., (2005) detectaron endosulfán-I y -II en el 100 y 50% de las muestras, respectivamente. Frecuencias de aparición que son superiores a las detectadas en las muestras de este estudio. Por el contrario, tanto Cerrillo et al., (2005a) como López-Espinosa et al., (2006) recogieron datos similares de frecuencia de endosulfán en los estudios en la misma región de España.

Al tratar de encontrar una relación entre los niveles de endosulfán y las características de los padres, se encontró una tendencia a la asociación estadísticamente significativa entre los niveles de endosulfán-I y el tipo de trabajo, con mayores concentraciones de este compuesto entre madres dedicadas a trabajos de índole intelectual, seguido de las agriculturas y por último las dedicadas a tareas del hogar. No obstante, el análisis de dos variables de forma conjunta puso de manifiesto que no sólo era importante el tipo de trabajo desarrollado por la mujer en los niveles de este pesticida, sino que también eran importantes la paridad, ganancia de peso y residencia. Las mujeres primíparas, que ganaron más de 12Kg, las que eran primíparas y vivían en un área urbana y las que vivían en un área urbana y fumaban eran las que presentaban mayores niveles medios de este pesticida en su tejido placentario. Los niveles medios menores se encontraron entre las multíparas que ganaron más de 12Kg, las primíparas con residencia rural y las que fumaban y vivían en un área rural.

En el caso del endosulfán-II, se encontró una asociación negativa entre la edad de la madre, ganancia de peso y los niveles de este pesticida en tejido placentario (mayores niveles en madres de menor edad y con menor ganancia de peso). Además, llama la atención, que las participantes con menor grado de escolaridad presentan frecuencias de aparición mayores de este compuesto en su placenta (del 100% de mujeres con este compuesto en su tejido placentario, 44.09% tenían estudios primarios) y también tenían mayores niveles las madres con parejas que desarrollaban trabajos no relacionados con actividades en el campo o de índole manual. Al estudiar las variables en grupos de dos se observó que la paridad junto con la ganancia de peso eran factores determinantes en los niveles de este pesticida, encontrando mayores niveles medios en mujeres primíparas que ganaron más de 12Kg, al igual que ocurría para el endosulfán-I y menores niveles en madres multíparas con ganancia de peso de más de 12Kg.

En el caso del endosulfán-éter, las madres fumadoras y las que percibieron estar expuestas a productos químicos durante el embarazo, presentaban los niveles medios y las frecuencias de aparición en tejido placentario mayores. Además, el análisis de dos variables de forma conjunta puso de manifiesto la influencia en los niveles de este compuesto de variables tales como la edad, ganancia de peso, paridad y lugar de residencia. Las mujeres del grupo de edad ≤ 32 años y con ganancia de peso de más de 12Kg, así como las que tenían su residencia en un área rural y eran primíparas, presentaban mayores niveles medios de estos contaminantes. Los niveles medios menores se encontraron en madres de >32 años y que ganaron >12 Kg, así como en las primíparas con residencia urbana. La asociación entre los niveles más elevados de endosulfán-éter entre jóvenes fumadores ya fue puesto de manifiesto en la cohorte de jóvenes residentes en la misma zona que las participantes en un estudio desarrollado por nuestro grupo, con anterioridad (Carreño, 2005).

El endosulfán-lactona tendía a estar asociado estadísticamente con el lugar de residencia, encontrando mayores valores medios entre madres que vivían en un área rural y con el tipo de trabajo del padre (los agricultores eran los que tenían parejas con niveles medios mayores de este compuesto en tejido

placentario). Al estudiar la influencia de dos variables conjuntamente sobre los niveles de endosulfán-lactona, apareció una asociación estadísticamente significativa entre mayores niveles de endosulfán-lactona entre mujeres que no trabajaban en agricultura pero que sí afirmaron exposición a sustancias químicas durante el embarazo.

Para el endosulfán-diol, pese a ser el compuesto con mayor frecuencia de aparición y concentración placentaria dentro de esta familia, sólo tendía a estar asociado de forma positiva con el IMC y la edad de las madres, mostrando mayores niveles en madres con mayores IMC y mayor edad. La asociación entre mayor niveles de este compuesto en mujeres con mayor IMC ya fue puesta de manifiesto con anterioridad en el estudio realizado en la misma zona geográfica (López-Espinosa et al., 2006a). Además, estaba asociado con el tipo de trabajo del padre, siendo las parejas de los agricultores las que presentaban mayores niveles. El estudio de las posibles asociaciones entre conjuntos de dos variables en los niveles de este compuesto, orientó sobre la importancia del IMC, residencia y el hábito tabáquico en los niveles de este pesticida, encontrando mayores niveles medios en el grupo de mujeres con mayor IMC y fumadoras así como en el grupo de madres con mayor IMC y residencia urbana. Los niveles medios menores se hallaron en mujeres con menor IMC y fumadoras y en madres con menor IMC y residencia urbana.

Las participantes con menor edad, mayor IMC y menor ganancia de peso, mostraron niveles y frecuencias de aparición mayores de endosulfán-sulfato. Además, más del 50% de las fumadoras durante el embarazo poseían este pesticida en el tejido placentario (\geq LC). Sin embargo, al estudiar las posibles asociaciones entre grupos de dos variables y las concentraciones de este pesticida, los niveles medios mayores de este pesticida se encontraron entre el grupo de mujeres de mayor edad y mayor ganancia de peso, frente a los valores inferiores encontrados en madres con mayor edad y ganancia de peso. De nuevo, la asociación entre mayor IMC cuanto mayor eran los niveles de endosulfán-sulfato ya fue descrito por Carreño (2005).

Por último, la sumatoria de los endosulfanes y sus metabolitos, presentes en casi la totalidad de las muestras (95.7%), se asociaron con el IMC (mayores

niveles de sumatoria de endosulfanes las mujeres con mayores IMC), el nivel de estudios (mujeres con estudios medios presentaban mayores niveles de este compuesto), exposición a productos químicos durante el embarazo (100% de las mujeres expuestas poseían alguno de los endosulfanes), hábito tabáquico (casi el 100% de las mujeres que fumaban tenían estos compuestos) y tipo de trabajo paterno (mayores niveles medios entre las parejas que se dedicaban a la agricultura). La asociación entre mayor niveles de este compuesto en mujeres con mayor IMC ya fue puesta de manifiesto con anterioridad en el estudio realizado en 150 placentas de mujeres de la misma zona geográfica (López-Espinosa et al., 2006a).

En cuanto a la exposición alimentaria a estos compuestos, en todas las asociaciones encontradas entre la frecuencia de consumo de diferentes tipos de frutas y verduras (ensalada, vegetales verdes frescos, vegetales congelados y fruta fresca) y los niveles de los distintos pesticidas de esta familia, excepto para el caso de endosulfán-sulfato (con niveles medios mayores entre las que consumían ensalada más de tres veces por semana), los niveles medios mayores se presentaron en el grupo de mujeres que consumían este tipo de alimentos con poca frecuencia.

En cuanto a las variables antropométricas del niño, los niveles de endosulfán-I en placenta tendían a estar asociados con el IP.

Los niveles de endosulfán-diol estaban estadísticamente asociados de forma positiva con el peso del niño y tendían a dicha asociación con el perímetro cefálico y semanas de gestación (mayores niveles en niños con mayor peso, mayor perímetro cefálico y semanas de gestación). Hallazgos que corroboran los encontrados en el estudio con placentas realizado por nuestro grupo de trabajo (López-Espinosa et al., 2006a). Por último, es interesante subrayar que la mayor frecuencia de aparición y niveles medios de este compuesto se encontraron en niños nacidos en verano.

Para el caso del endosulfán-éter, las concentraciones tendían a estar asociados de forma positiva con el peso y con el IP (mayores niveles en niños de mayor peso e IP) y negativamente con el perímetro cefálico (mayores niveles en niños con menor perímetro).

También, la frecuencia de aparición y los niveles del pesticida endosulfán-lactona estaban asociados con el IP, encontrando mayor frecuencia de aparición y niveles medios entre los niños con menor IP. Este pesticida también estaba asociado con el perímetro cefálico, con mayores niveles medios entre niños con menor perímetro. Además, tendían a estar asociados con la variable construida, pequeño o normal para la edad gestacional (mayores niveles medios en niños normales para la edad gestacional).

Para el caso del endosulfán-sulfato, se encontró una asociación estadísticamente significativa negativa con el perímetro cefálico (menor perímetro cefálico en placentas de madres con mayores niveles de este compuesto) y una mayor frecuencia de aparición de este compuesto (83.33%) entre el grupo de niños pequeños para la edad gestacional (N=6).

Por último, la sumatoria de endosulfanes tendía a la significación estadística negativa con el peso del niño (mayores niveles en niños con menor peso).

La conversión de los pesticidas en sus metabolitos puede explicar, en determinadas ocasiones, la presencia de uno u otro derivado como es el caso de aldrín, dieldrín y endrín. Con respecto a este grupo, el orden de frecuencia de aparición fue endrín>aldrín>dieldrín. Endrín fue el más frecuentemente detectado (34.1% de las muestras) y mostró también la concentración más alta (1.01 ng/g placenta ó 22.93 ng/g lípido), seguido del aldrín (27.8%) con concentraciones del orden de 0.83 ng/g placenta o 7.56 ng/g lípido. Esta distribución puede reflejar que la serie de estudio es una serie de mujeres jóvenes (\approx 32 años), ya que Cerrillo et al. también señaló que endrín era el más frecuente entre las mujeres de menor edad (Cerrillo et al., 2005b), en un grupo de población femenina de mayor rango de edades.

No existen demasiados estudios dedicados a medir niveles de este grupo de pesticidas en placenta y algunos son bastante antiguos, como los realizados en la India (Saxena et al., 1980a) e Israel (Polishuk et al., 1977). En el primero de los trabajos, la frecuencia de aparición de aldrín (92%) fue superior a nuestra serie, con valores medios mucho mayores (medias geométricas= 158.7 ppb) a las encontradas en este trabajo (medianas=0.31 ng/g placenta). También en

Israel, el nivel medio de dieldrín (media=0.81ppm) fue muy superior al encontrado en el presente estudio (media=9.67 ng/g lípido). Sin embargo, en el estudio recientemente publicado por Shen et al., (2005), se mostraba una mayor frecuencia de exposición a dieldrin (100%) y una menor exposición a aldrín (4.5%) que en las muestras del presente trabajo, pero, los valores medios y las frecuencias de aparición de estos compuestos se movían en el mismo rango que se presentan en este trabajo y en estudios previos de nuestro grupo (López-Espinosa et al., 2006a).

En marzo de 2001, Lisa Jorgenson publicaba en la revista *Environmental Health Perspectives* una revisión extensa sobre aldrín y dieldrín en la que trataba de actualizar el conocimiento sobre estos dos pesticidas incluidos en la lista de la “docena sucia” (Jorgenson, 2001), compuestos organoclorados persistentes que entran bajo la regulación estricta del Convenio de Estocolmo (Porta et al., 2002). Entre los datos mas sobresalientes del informe destaca el hecho de que la exposición a estos pesticidas es de carácter no ocupacional, pero que afecta de forma significativa a la población que habita en áreas de uso agrícola y en zonas tratadas sistemáticamente con anti-termitas. Tan solo estas aplicaciones justifican para Jorgensen que dieldrín se encuentre en cerca del 90% de las leches maternas con una concentración media de 160 ppb. En nuestra serie, la presencia de endrín en muestras de tejido placentario por encima del límite de detección se asoció con el tipo de trabajo desarrollado por las mujeres. Solamente un 20% de las mujeres que trabajaban en agricultura tenían este compuesto en su tejido placentario, en un 44.57% de las que trabajaban en el hogar se cuantificó dicho compuesto, y en alrededor de un 38.7% de las que trabajaban en otro tipo de actividad no relacionada con actividades en el campo o en el hogar. Esta observación es de gran interés ya que confirma lo publicado con anterioridad según lo cual la mayor frecuencia y concentración de pesticidas de este grupo se da entre mujeres trabajadoras en la limpieza y en ámbito sanitario (Martínez et al., 1993). También existía una tendencia a la asociación estadística entre los niveles de endrín en tejido placentario y el tipo de trabajo desarrollado, encontrando de nuevo, que las mujeres que trabajaban en el campo presentaban los niveles medios menores de este compuesto (hogar>otro

tipo de trabajo>agricultura). En cuanto a la percepción de la exposición ocupacional a compuestos químicos, entre otros a pesticidas, se encontraron niveles medios mayores y superiores frecuencias de aparición de endrín entre las madres que negaron estar expuestas ocupacionalmente a compuestos sintéticos. Nuestros resultados sustentan pues, la hipótesis de Jorgensen de una exposición no ocupacional a este tipo de compuestos.

El problema en torno al aldrín es preocupante ya que a pesar de los informes que obvian su monitorización debido a que el compuesto fue prohibido hace años y se transforma en su metabolito dieldrín, lo cierto es que con frecuencia se denuncia la presencia de este compuesto en diferentes medios. La asociación estadística positiva y significativa entre el aldrín y su compuesto de metabolización, así como entre dieldrín y endrín en las muestras de tejido placentario, viene a reforzar la fuerte asociación entre los compuestos de uso comercial y su producto de transformación y/o degradación.

A pesar de su prohibición, aldrín/dieldrín representan bien al grupo de los pesticidas más persistentes y su acusada liposolubilidad lo hace comparable a DDT. La característica fundamental del secuestro de los compuestos bioacumulables en algunos tejidos es el bajo recambio que se establece entre compartimentos pobres en agua y el líquido intersticial. Por esta razón, tejidos con poco aporte vascular son proclives al acúmulo de pesticidas organoclorados. Dieldrín, por ejemplo, viaja en sangre formando parte del plasma (Jorgenson, 2001). Después se acumula en tejido adiposo hasta alcanzar un cociente grasa/suero cercano a 150. A pesar de que este gradiente es importante, aún es mayor para médula ósea, siendo en este caso el acúmulo superior en 20 veces al que ocurre en tejido adiposo. Esto quiere decir que el secuestro en los diferentes tejidos de los compuestos organoclorados enlentece su metabolismo y eliminación y favorece su acción tóxica en el órgano de secuestro. Además, también se ha demostrado que el dieldrín pasa a través de la placenta y se acumula en el feto, particularmente en el hígado, grasa e intestino (Salama et al., 1993).

La persistencia de un compuesto químico, tipo pesticida, se define en términos agroquímicos como la vida media del compuesto en los suelos.

Para el caso del aldrín y el dieldrín se ha estimado entre 2-15 años. No obstante cuando en la estimación de persistencia se incluye el transporte aéreo y la incorporación a las cadenas tróficas se hace una nueva lectura de la persistencia de estos compuestos y se estima que si fueron introducidos en el medio ambiente en 1950, su residuo estará presente hasta bien entrado el año 2030. La demostración de la estabilidad del grupo de los aldrín/dieldrín/endrín en agua, una vez que han alcanzado los cursos fluviales y océanos es un hecho frecuentemente recogido en la literatura científica. De hecho, en los últimos diez años se han publicado numerosos trabajos que vienen a demostrar el predominio del residuo de aldrín en las aguas superficiales de los países mediterráneos, como es el caso de Grecia (Golfinopoulos et al., 2003), en donde se superan los máximos aconsejados por la UE. Por esta razón, la inclusión de aldrín, dieldrín y endrín en cualquier seguimiento de una población expuesta a organoclorados es un ejercicio que permite derivar información útil sobre la exposición histórica.

En este estudio, la presencia de dieldrín tenía una tendencia a la asociación estadística significativa con el IMC. Encontrando que la mayor frecuencia de aparición placentaria de dieldrín se encontraba en mujeres con un IMC menor, confirmándose la observación de Wolff y Anderson (1999) sobre el efecto dilución que puede atribuirse al exceso de grasa en el individuo obeso en compuestos para los que ha cesado la exposición. Además, al tener en cuenta la variable ganancia de peso durante el embarazo, se halló una asociación estadística entre mayores niveles y frecuencia de aparición de endrín entre mujeres que ganaron más peso durante el embarazo. Es oportuno recordar aquí, que las mujeres que ganaron menor peso durante el embarazo eran las que tenían un IMC mayor antes del embarazo, y que posiblemente fueran sometidas a un control más estricto de la ganancia de peso. Al estudiar de forma conjunta la influencia de grupos de dos variables sobre los niveles medios de este compuesto, aparecieron nuevas variables asociadas con las concentraciones. Los niveles medios mayores de aldrín se encontraron entre mujeres con menor edad y mayor IMC, así como entre las de mayor edad y multíparas y entre las de mayor IMC y multíparas, frente a mujeres con mayor edad e inferior IMC y primíparas con edad menor, que presentaron niveles medios inferiores. Los

niveles medios de dieldrín mayores se cuantificaron entre las de mayor edad y primíparas y los niveles medios menores entre las de mayor edad y múltiparas. Y por último, los niveles medios mayores de endrín se encontraron entre las de residencia urbana y ganancia de peso menor frente a los de residencia urbana que ganaron mayor número de Kilos que presentaban los niveles medios menores.

En cuanto a la posible vía de exposición a estos contaminantes a través de los alimentos grasos, los niveles medios de aldrín tendían a estar asociados con la frecuencia de consumo de queso añejo y carnes de cerdo o ternera. De tal manera que, los niveles medios mayores se encontraron entre mujeres que consumían más de 3 veces por semana queso y no eran consumidoras habituales de carne.

Cuando se intentaron establecer asociaciones estadísticas entre las características del niño y los niveles y frecuencia de aparición en placenta de los pesticidas de esta familia, se hallaron asociaciones con la edad gestacional y una tendencia a la asociación estadística con la variable pequeño/normal para la edad gestacional. Los niños con mayor número de semanas de gestación presentaron mayor frecuencia de aparición de aldrín (del total de placentas con este compuesto, 61.11% de los niños nacieron con más de 39 semanas y un 38.89% con una edad gestacional entre 37-39 semanas). Por otra parte, los niños con un peso normal para la edad gestacional, tenían niveles medios más elevados de endrín que los pequeños para la edad gestacional.

El HCB fue introducido en el mercado de pesticidas en 1945 como fungicida. El HCB puede persistir en el medioambiente durante años, con una vida media estimada en el suelo de 23 años. Ha sido usado como fungicida para proteger las cebollas, las semillas de trigo y otros granos. Su producción, con este fin, fue prohibida en 1971 en EE.UU, pero todavía se sigue utilizando en la fabricación de solventes, compuestos que contienen cloro en su molécula y pesticidas (ATSDR, 1996b). En España, el HCB está presente en alimentos, como por ejemplo carne (Lázaro et al., 1996; Herrera et al., 1996) margarinas (Pozo Lora et al., 1983), leche humana (Conde et al., 1993), leche esterilizada (Garrido et al., 1994), queso (Bentabol & Jodral, 1995) y productos lácteos (Falco

et al., 2004). En nuestro estudio, los niveles medios mayores de HCB se encontraron entre madres que consumieron queso con una frecuencia superior a 3 veces por semana.

La Agencia Estadounidense de Protección Medioambiental (EPA) describió niveles detectables de HCB en los tejidos del 95% de la población norteamericana (Robinson et al., 1990), mientras que otros estudios realizados en España también describen niveles cuantificables de HCB en la población española (To-Figueras et al., 1986; To-Figueras et al., 1995). Este compuesto se pudo cuantificar en el 41.7% de los participantes de nuestra serie, ocupando el décimo lugar en frecuencia dentro de los compuestos en estudio, alcanzándose valores medios de 0.53 ng/placenta que correspondían a 15.41 ng/g lípido. A pesar de que se ha descrito su presencia en tejidos humanos, lo cierto es que no existen demasiados estudios con los que poder comparar estos resultados ya que los publicados sobre tejido placentario son antiguos y llevados a cabo en países lejanos como Israel (Polishuk et al., 1977), India (Saxena et al., 1980a) y Eslovaquia (Reichrtova et al., 1999). En todos ellos, la frecuencia de aparición era mayor que en nuestra serie (100% de las muestras poseían este compuesto en Israel y entre el 75-98% de las muestras eslovacas eran positivas), con rangos parecidos a los de este estudio en el caso de las muestras de Eslovaquia (media entre 0.6 y 0.4 ng/g placenta, dependiendo de si la muestra de placenta procedía de un área urbana o rural, respectivamente) e inferiores a los encontrados en Jerusalén y la India (1.05 ppm y 1360.48 ppb, respectivamente). Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha investigado la exposición transplacentaria a HCB, encontrando niveles y frecuencias de aparición muy parecidas (media=0.50 ng/g placenta; frecuencia=43%) a las del presente trabajo (López-Espinosa et al., 2006).

En este estudio se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre mayores niveles de HCB en mujeres de menor edad y entre los niveles y frecuencia de aparición de HCB y el nivel de estudios del padre, encontrándose que un nivel educacional más bajo del padre determinaba una mayor frecuencia de aparición y niveles de este compuesto en el tejido placentario de sus parejas.

El lindano es un organoclorado que se utilizó como insecticida en los cultivos de caña de azúcar y tabaco, entre otros. Hoy día está prohibida su venta y uso en cualquier cultivo, sin embargo se sigue utilizando en preparados farmacológicos para el tratamiento de la sarna. Este uso farmacológico debería abandonarse y habría que tratar esta enfermedad mediante métodos menos agresivos.

La Organización Mundial de la Salud lo clasifica como altamente peligroso. La dosis letal en adultos ha sido de tan sólo 10 gramos y hay informes médicos de pacientes en los que se han producido crisis convulsivas después de ingerir 1.6 gramos. Entra en el organismo humano por vía respiratoria, por piel y por vía gastrointestinal. Como todos los organoclorados el lindano es una molécula muy estable y persistente en el medio ambiente. Por ser muy liposoluble tiende a bioacumularse en los tejidos con mucha grasa como el hígado y el sistema nervioso. Esta persistencia en el ambiente y en los mamíferos es la razón fundamental por la que se ha retirado del mercado en la mayoría de los países, ya que puede tener efectos adversos a largo plazo.

En este trabajo, lindano fue el segundo de los pesticidas en cuanto a porcentaje de frecuencia de aparición en placenta, después del p,p'DDE y ocupaba el lugar doce en cuanto a niveles medios detectados en este medio. El lindano fue detectado en un 74.8% de las muestras, por debajo del 100% descrito por Shen et al., (Shen et al., 2005) en placentas de madres finlandesas pero mucho más alto que el 24.5% descrito por Falcon et al., (2004) y prácticamente igual al estudio realizado por nuestro grupo de trabajo (74.17%) con anterioridad (López-Espinosa et al., 2006a). Como en el caso de p,p'DDE, la concentración media de lindano ($\text{media} \pm \text{DE} = 0.39 \pm 0.51 \text{ ng/g de placenta}$ ó $12.28 \pm 31.87 \text{ ng/g lípido}$ y mediana 0.25 ng/g lípido) fue menor que el observado por Shen et al., en Finlandia (media geométrica = 3.51 ng/g lípido) y considerablemente más bajo que el valor medio de $8.33 \text{ ng/g placenta}$ descrito por Falcon et al., (2004) y prácticamente igual al cuantificado con anterioridad por nuestro grupo (valor medio de $0.38 \text{ ng/g placenta}$) (López-Espinosa et al., 2006a).

En el presente estudio se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de lindano en placenta y la ganancia de peso, exposición materna a productos químicos, número de hijos, hábito tabáquico, nivel educacional de la madre, trabajo y exposición a productos químicos del padre y una tendencia a la significación estadística con el IMC de la madre antes del embarazo y con el nivel educacional del padre. Los niveles placentarios más elevados de este compuesto se presentaron en madres con un mayor IMC, menor ganancia de peso durante el embarazo, antecedentes de exposición, mayor número de hijos, hábito tabáquico, menor nivel educacional del padre y estudios medios de la madre, padres dedicados a trabajos de índole manual y expuestos a sustancias químicas. Al realizar el análisis multivariado se advirtió que el grupo de las mujeres que ganaron menor peso durante el embarazo y multíparas, y las agriculturas y expuestas a productos químicos, eran las que tenían unos mayores niveles de este contaminante en su tejido placentario.

También se encontró asociación estadística entre la frecuencia de aparición de lindano y el peso del niño (50% de los niños con peso <2500 g tenían este pesticida y 76% de los de peso \geq 2500 g. También se encontró una asociación entre el tipo de parto y los niveles medios de lindano (niveles medios mayores entre niños nacidos de forma espontánea>cesárea>ayuda de un instrumento). Algunas de estas asociaciones han sido encontradas en estudios realizados en series de la misma zona, como la asociación entre mayores niveles de lindano en madres con un mayor número de hijos (Cerrillo et al., 2005b) o mayores concentraciones de este organoclorado entre mujeres fumadoras (Carreño, 2005). No tenemos una explicación clara para este fenómeno ya que podría contradecir el mecanismo de destoxificación que supone el embarazo y paridad. Otras variables de carácter particular como la exposición laboral y el hábito tabáquico, pueden estar enmascarando el efecto destoxificador del embarazo.

El mirex es un insecticida organoclorado extremadamente estable y persistente con una vida media superior a 10 años. Se usó principalmente para el control de plagas de insectos. Actualmente se ha puesto de manifiesto su acción como retardador de la llama en plásticos y material eléctrico, aunque su

uso está restringido o prohibido en la mayoría de los países. La exposición de los seres humanos a este compuesto químico se produce por vía respiratoria, dérmica o por ingestión de polvo o partículas cercanas a lugares de desechos industriales y de pescado u otros productos animales contaminados. Se detectó en un 24.8% de las muestras de placenta analizadas en una concentración media de 0.31 ng/g de placenta ó 13.59 ng/g de lípido. La frecuencia de aparición de mirex en el trabajo de Shen et al., (Shen et al., 2005) era mucho más elevada (94%) que la del presente estudio, aunque la frecuencia en la presente serie es prácticamente igual a la publicada recientemente por nuestro grupo (López-Espinosa et al., 2006a).

Al realizar el análisis bivariado, apareció una tendencia a la significación entre la edad de la madre y los niveles placentarios de este pesticida, encontrando niveles más altos cuanto más edad tenía la madre. Al estudiar la influencia conjunta de dos variables sobre los niveles en tejido placentario de este compuesto, el grupo de madres con menor edad y fumadoras, así como las primíparas con residencia rural, eran las que presentaban mayores niveles medios, frente a las no fumadoras con menor edad y multíparas con residencia rural, que presentaban los niveles medios inferiores.

Los niveles de este compuesto en placenta, se asociaron con algunas de las variables de estudio de los niños. Así por ejemplo, se halló una tendencia a la significación estadística entre la frecuencia de aparición de mirex y el perímetro cefálico (un 14.29% de los niños con perímetro <35 cm y un 34.69% de los niños con perímetro \geq 35cm, presentaban mirex en el tejido placentario). Sin embargo, al considerar la variable tamaño para la edad gestacional y como límite de corte el percentil 5%, el mirex presentaba una tendencia a la significación estadística entre una mayor frecuencia de aparición y mayores niveles medios entre niños pequeños para la edad gestacional. Además, al considerar el criterio de pequeño para la edad gestacional, la frecuencia de aparición y los niveles medios de mirex (N=6; frecuencia=50%; media=4.14 ng/g placenta), eran mayores en esta población que en la cohorte de estudio (N=308).

El último organoclorado de la lista de estudio es el metoxicloro, usado como insecticida contra moscas, mosquitos, cucarachas, larvas de ácaros y una

gran variedad de otros insectos. Se usa en cosechas agrícolas y ganado, en graneros, depósitos de cereales y en jardines y para el tratamiento de los animales domésticos. Actualmente es el más empleado de los análogos del DDT. Su espectro de acción es parecido al de este pesticida pero la toxicidad que presenta para los mamíferos es considerablemente inferior. Es junto con endosulfán uno de los pesticidas organoclorados autorizados en España para aplicaciones agrícolas. De entre todos los pesticidas estudiados ocupaba el lugar número trece en relación a su frecuencia de aparición, mostrándose en el 30.5% de las muestras analizadas y con valores medios de 0.42 ng/g de placenta, que correspondía a 16.31 ng/g de lípido. En Europa, hasta la fecha solamente existe el estudio realizado en muestras finlandesas en las que se haya medido metoxicloro. La frecuencia de aparición de este compuesto era del 42% con una media geométrica de 0.1 ng/g lípido. En España, no existen hasta la fecha, estudios que midan el grado de exposición materno-infantil a este pesticida mediante el análisis de la placenta, excepto el estudio realizado recientemente por nuestro grupo de investigación. En éste caso, la frecuencia de aparición del metoxicloro en placenta fue del 32.45% con una media de 0.42 ± 1.15 ng/g placenta (López-Espinosa et al., 2006a), muy parecidos a la frecuencia y concentraciones medias encontradas en este estudio.

Su presencia y niveles se asociaron al lugar de residencia (mayor frecuencia y niveles medios en mujeres con residencia urbana), nivel de estudios de la madre (mayor frecuencia y niveles medios en mujeres con menor nivel educacional), hábito tabáquico (mayores niveles medios entre fumadoras) y su valor medio entre los niños pequeños para la edad gestacional (N=6) era mayor (media=1.04 ng/g placenta) que para la población total (media=0.42ng/g placenta). Cuando se estudiaron de forma conjunta la influencia de dos variables en la exposición a este pesticida, se encontró además, que las madres multíparas que vivían en un área urbana eran las que presentaban niveles medios de metoxicloro mayores frente a las multíparas con residencia rural que presentaban los niveles inferiores.

Por último, en este trabajo se ha utilizado la estimación de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) como medida indirecta de la exposición a

pesticidas organoclorados con actividad estrogénica, y de forma general, a aquellos compuestos químicos con actividad hormonal estrogénica, ya sea agonista o antagonista. Se trata, como se ha comentado en la sección de introducción, de la estimación cuantitativa del efecto combinado del extracto tisular (las llamadas fracciones cromatográficas alfa y beta) que considera la capacidad de inducir proliferación en células estrógeno-dependientes de cáncer de mama, mediante el ensayo E-Screen.

Aproximadamente tres de cada cuatro extractos de las 308 placentas fueron positivas en el bioensayo de estrogenicidad para la fracción alfa, con un valor medio de TEXB de 3.84 Eeq pM/g placenta que correspondía a 177.07 Eeq pM/g lípido. Al expresar los valores en términos de contenido lipídico para poder compararlos con otros estudios que investigan la TEXB en función del contenido graso del tejido, los valores medios encontrados eran similares a los recogidos en estudios de mujeres residentes en la misma área (Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004).

La estrogenicidad del extracto alfa, el cual contiene xenoestrógenos halogenados y hormonas sexuales no endógenas (primeros 11 minutos del eluido de HPLC) (Pazos et al., 1998; Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004), es considerado un marcador de la TEXB debido al efecto combinado de los estrógenos medioambientales (Sonnenschein et al., 1995; Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2004). De hecho, residuos de pesticidas organoclorados fueron encontrados en extractos de la presente serie de placentas, tal y como se ha comentado hasta ahora, confirmando los resultados recogidos en series de placentas de la misma población (Cerrillo et al., 2005; López-Espinosa et al., 2006), otras regiones españolas (Falcon et al., 2004) y otras partes del planeta (Eckenhansen et al., 1981; Siddiqui & Saxena, 1985; Hura et al., 1999; Reichrtova et al., 1999).

Esta aproximación metodológica responde a la necesidad de considerar la exposición simultánea a diferentes compuestos organoclorados a los que están sometidas las madres, debido a la bioacumulación y persistencia, de estos compuestos lipofílicos (Karmaus, 2004). Diferentes metodologías han sido propuestas para establecer las interacciones de los xenoestrógenos que derivan

de posibles efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos (Soto et al., 1997; Shekhar et al., 1997; Payne et al., 2000; Rajapakse et al., 2002; Silva et al., 2002). La TEXB de alfa estimada de acuerdo al presente protocolo representa el efecto combinado de compuestos químicos presentes en diferentes concentraciones, algunas veces bajo los niveles límite de efecto proliferativo (Fernández et al., 2004). Mecanismos aditivos, sinérgicos o antagónicos podrían ocurrir y hay que tenerlos en cuenta para el efecto final observado en el bioensayo. Esta aproximación ofrece una oportunidad de investigar la exposición a xenoestrógenos y puede ser más apropiada que la determinación de sustancias químicas individuales en muestras de placenta.

En el presente trabajo, se encontró una asociación significativa entre mayores niveles de alfa en el extracto placentario y la mayor edad de las madres, la multiparidad y un número mayor de hijos, así como una tendencia a la asociación entre la frecuencia de aparición de TEXB alfa (\geq LC) y el IMC, encontrándose que el 67.74% de las madres con TEXB tenían un $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$. En un estudio realizado con anterioridad en 150 muestras de placenta en el que se determinó la TEXB de alfa, también se encontró una asociación entre la multiparidad y mayores niveles de estrogenicidad de la fracción alfa (López-Espinosa et al., 2006b). Por último señalar que, a pesar de no haber encontrado una asociación estadísticamente significativa entre hábito tabáquico y niveles de TEXB de alfa en este estudio, asociación sí encontrada en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo (Ibarluzea et al., 2004; López-Espinosa et al., 2006b), los niveles medios mayores de TEXB de alfa se encontraron entre las mujeres que fumaron.

En cuanto al hábito alimentario, solamente se halló una tendencia a la asociación estadística entre la frecuencia de consumo de queso fresco y los niveles de TEXB de alfa, con mayores niveles entre las madres que consumieron este tipo de alimento con poca frecuencia (1-3 veces al mes).

Con respecto a las variables del niño estudiadas, una asociación significativa fue observada entre mayores niveles de TEXB de la fracción alfa del extracto placentario y mayor peso del niño, sugiriendo una relación entre exposición a xenoestrógenos y crecimiento fetal. Dicha asociación ya fue

encontrada con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (López-Espinosa et al., 2006b). Además, al considerar la variable tamaño para la edad gestacional, se encontró de nuevo una asociación estadística entre la presencia de TEXB en la fracción alfa del extracto placentario y esta variable, de tal manera que uno de cada dos niños pequeños para la edad gestacional y alrededor de tres de cada cuatro de los que tenían un peso normal para la edad gestacional, tenían niveles cuantificables de TEXB; resultados corroborados por una tendencia a la asociación entre niveles medios mayores de TEXB de alfa en niños con peso normal para la edad gestacional. A este respecto, el peso del niño ha sido propuesto como una medida de la exposición a xenoestrógenos y Kaijser et al. (2000) sugirieron una asociación positiva entre niveles más altos de estradiol durante el embarazo y mayor peso del niño al nacer, lo cual confiere un importante papel para TEXB en el crecimiento fetal. También se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de aparición y los niveles medios mayores de TEXB y el tipo de parto, encontrándose una frecuencia y niveles medios mayores en tejidos placentarios de niños nacidos de forma espontánea. Al realizar el análisis estadístico multivariado, se encontró que los tejidos placentarios con mayores niveles de TEXB de alfa correspondían a niños con mayor IP y mayor número de semanas de gestación, hallazgo que soporta de nuevo un papel de TEXB sobre el crecimiento fetal.

Los estrógenos endógenos naturales junto con los fitoestrógenos y xenoestrógenos no halogenados eluyen en las fracciones cromatográficas colectadas desde el minuto 13 hasta el minuto 32. La estrogenicidad de un "pool" de fracciones es referida en este trabajo como TEXB de la fracción beta. Las medias aritméticas de TEXB estimadas en tejido placentario, fueron para esta fracción beta de 22.82 Eeq pM/g placenta que correspondía a 1190.97 Eeq pM/g lípido. La frecuencia de muestras con un valor igual o superior al límite de cuantificación fue de un 84.7%, de tal manera que tan sólo en 48 placentas no pudo cuantificarse la estrogenicidad.

En el presente trabajo, los niveles medios de TEXB de beta así como su presencia en tejido placentario se asociaron estadísticamente con la edad de las madres con mayores niveles y frecuencia de aparición en madres con edad >32

años; igualmente se asoció con la paridad, con multíparas presentando mayores niveles y frecuencia de aparición, y con el tipo de actividad laboral, distribuyéndose en 100% de las agriculturas, 89.37% de las trabajadoras en el hogar y 81.25% de las que desarrollaban otro tipo de trabajo. Además, existía una tendencia a la asociación estadística entre la frecuencia de aparición de TEXB beta y el lugar de residencia presentando mayor frecuencia de aparición de TEXB la población rural, mayores niveles medios en mujeres con estudios medios y mayores niveles medios en placentas cuyas parejas tenían estudios superiores. De nuevo, la actividad laboral del padre condiciona la frecuencia de aparición, de manera que, el 100% de los agricultores, 79.5% de los que desarrollaban trabajos de índole manual y 86.5% de los que realizaban otro tipo de trabajo, tenían parejas con TEXB beta en el tejido placentario. Además, el análisis multivariado puso de manifiesto la asociación estadística entre los niveles de TEXB, tipo de trabajo, percepción de la exposición, edad e IMC, encontrándose que el grupo de mujeres con mayores niveles de TEXB beta eran aquellas que eran agriculturas y que percibieron estar expuestas a contaminantes químicos, así como el grupo de las que tenían edad <32 años e IMC ≥ 25 Kg/m². Ibarluzea et al., (2004) que estudió TEXB en tejido adiposo de mujeres de la misma región geográfica, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre menores niveles de TEXB beta en mujeres solteras en comparación con casadas, viudas o separadas, corroborando la asociación estadística encontrada en el presente trabajo entre mayores niveles de estrogenicidad de beta y multiparidad y los niveles medios menores entre mujeres expuestas que no trabajaban en agricultura y mujeres con menor edad y menor IMC.

En cuanto a la frecuencia de consumo de alimentos y los niveles de TEXB beta, solamente se encontró asociación estadística entre la frecuencia de consumo de queso fresco y queso añejo, encontrando mayores niveles de estrogenicidad beta entre las mujeres que consumieron este tipo de alimentos con bastante frecuencia (de 1-3 veces por semana, para el caso del queso fresco y más de 3 veces a la semana, para el caso del queso añejo).

La placenta, juega un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo del feto ya que desarrolla multitud de funciones. Es un órgano nutritivo, responsable del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono, juega un papel fundamental en la eliminación de ciertos compuestos de desecho del feto y actúa como órgano endocrino, al producir varias hormonas esteroides (estrógenos, progesterona etc.) y hormonas polipéptidas (gonadotropina coronaria etc.), importantes durante el embarazo (Ganapathy & Prasad, 2005). Por esta razón, no es de extrañar que aparezcan asociaciones entre los niveles de TEXB beta, fracción que contiene los estrógenos naturales junto con los fitoestrógenos y otras sustancias químicas sintéticas no halogenadas y las características antropométricas del niño. De este modo se hallaron asociaciones estadísticas positivas entre los niveles de TEXB de la fracción beta y el índice ponderal con mayores niveles de TEXB, en niños con mayor IP y tendencias a dicha asociación positiva entre los niveles de TEXB de la fracción beta y el perímetro cefálico y la edad gestacional, encontrando en ambos casos unos niveles mayores entre niños con mayor perímetro y más edad gestacional.

Finalmente es necesario recordar que los valores de la TEXB de fracción alfa, expresados en Eeq (pM)/mL, Eeq (pM)/g placenta, y Eeq (pM)/g lípido, se asociaron significativamente con los valores de TEXB en la fracción beta expresados en las mismas unidades, indicando una dependencia entre ambas fracciones que merece un estudio más profundo. De hecho, ambas fracciones son dependientes de la exposición a contaminantes químicos ambientales. Pero, mientras que la fracción cromatográfica alfa está exenta de estrógenos endógenos, la beta contiene las hormonas endógenas esteroideas habituales en el tejido de procedencia. El hecho de que haya una correlación estrecha entre ambas fracciones no se interpreta como el resultado de la contaminación por estrógenos endógenos sino por una idéntica probabilidad de exposición ambiental para xenoestrógenos no lipofílicos y polares en el mismo individuo.

En un intento de dilucidar el carácter de los xenoestrógenos que eluyen en cada una de las fracciones cromatográficas (alfa y beta) se procedió a investigar la estrogenicidad de los extractos placentarios en un bioensayo de actividad hormonal distinto, en el que las propiedades de biodisponibilidad y solubilidad

condicionan la respuesta estrógenica. Se eligió en bioensayo Yeast Estrogen Screen (YES) para la medida de la carga estrogénica total efectiva (TEXB). El YES, es un ensayo in vitro para compuestos químicos capaces de interactuar con receptor estrogénico α de origen humano (hER α), ya que la secuencia íntegra del DNA del hER α fue transfectada dentro del principal cromosoma de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Routledge & Sumpter, 1996b). De la cohorte de muestras recogidas (n=308), se seleccionaron aleatoriamente un total de 40. El objeto era analizar los extractos mediante el ensayo biológico Yeast Estrogen Screen (YES) y comparar estos resultados con los obtenidos en el ensayo biológico E-Screen, para poder determinar la carga hormonal correspondiente a cada una de las muestras y comparar los resultados obtenidos en los dos ensayos.

En la fracción alfa, un 62.5% de las muestras presentaban estrogénicidad medible mediante el ensayo E-Screen, que aparentemente no es muy diferente del 50% obtenido al utilizar el YES, con un valor medio de 7.18 ± 11.37 Eeq pM/g placenta (equivalente a 310.67 ± 559.72 Eeq pM/g lípido) y 6.63 ± 11.04 Eeq pM/g placenta (equivalente a 292.29 ± 546.01 Eeq pM/g lípido), respectivamente.

Para el caso de la fracción beta, el número de muestras positivas en el E-Screen fue de 35 (87.5%) que es similar al número de muestras positivas en el ensayo YES (72.55%). La media fue de 30.55 ± 51.27 Eeq pM/g placenta (equivalente a 1258.78 ± 2222.93 Eeq pM/g lípido) y 54.86 ± 55.06 Eeq pM/g placenta (equivalente a 2365.02 ± 3117.88 Eeq pM/g lípido), respectivamente.

Para el caso de la fracción alfa, no existían diferencias estadísticamente significativas entre la utilización de un método u otro, pero al centrarse en la positividad, se observó que ésta era mayor en el caso del ensayo E-Screen.

Para el caso de la fracción beta, se encontraron diferencias significativas, entre la utilización de un ensayo u otro al expresar los valores de estrogénicidad en Eeq pM/g placenta y Eeq pM/mL, siendo mayores los valores medios de TEXB beta en el ensayo YES. En cuanto a la positividad, el ensayo E-Screen era más sensible, ya que la frecuencia de muestras positivas era mayor, sin olvidar que existía un número de muestras que fueron positivas en el YES y no en el E-Screen (3/40).

Diferencias en la sensibilidad de ambos métodos, E-Screen y YES, podrían justificar las discrepancias encontradas en cuanto a la frecuencia de positividad, pero es importante resaltar que se ha indicado que el comportamiento de los xenoestrógenos no es el mismo en ambos modelos. Así por ejemplo, en el modelo proporcionado por las lavaduras, algunos compuestos químicos pueden encontrar dificultades para atravesar la membrana e interrelacionarse, impidiendo la unión efectiva al receptor estrogénico. Igualmente, es sabido que la línea celular MCF-7 metaboliza alguno de los xenobióticos, dando lugar a metabolitos activos hormonalmente, situación que no ocurre en el caso de las levaduras. En resumen, la disponibilidad encontrada entre ambos métodos de evaluación de la estrogenicidad anima a investigar los factores que la condicionan pero, a la vez, añaden una complejidad al análisis de los resultados.

Las investigaciones llevadas a cabo sobre la exposición medioambiental durante el desarrollo fetal e infancia sugieren que los biomarcadores biológicos pueden proporcionar instrumentos de la mayor utilidad para cuantificar la exposición medioambiental y ayudar a la evaluación de la variabilidad inter-individual (Whyatt & Perera, 1995). La necesidad específica de biomarcadores de la función de la placenta ha sido recientemente señalado (Myllynen et al., 2005). Nuestra propuesta de usar el E-Screen y YES para medir la estrogenicidad de la placenta como un biomarcador de exposición parece ser una estrategia razonable para valorar la exposición materna a xenoestrógenos y estimar la exposición del feto, tan razonable, al menos, como la determinación individualizada de unos pocos compuestos químicos.

6. SUMMARY

6. SUMMARY

“Popular books and magazines which are read by pregnant women do not talk much about environmental issues. They do not mention exposure to solvents, pesticides or toxic residues. There is some kind of disconnect between what we know scientifically and what is presented to pregnant women seeking knowledge about prenatal life.....” “Education campaigns urge young women to take folic acid supplements to lower the likelihood of having a child with spina bifida, a serious birth defect. Pregnant women are routinely instructed to avoid alcohol, cigarettes and drugs.....” “Advising future mothers to take vitamins and avoid alcohol, cigarettes and drugs is crucial. Unfortunately, foetuses are threatened by many hazards that even the most careful future mother cannot avoid through lifestyle choices during pregnancy.....” (Steingraber, 2001; Massey, 2002).

6.1. INTRODUCTION

Organochlorine pesticides are among the most frequent contaminants found in food, soil, or water (WHO, 1992). The intensive use of these substances, both in agriculture and industry, have led to widespread contamination of the environment, and residues are found at every level of the food chain (Skaare et al., 1988). The main source of exposure to organochlorine compounds in humans is through their diet and, in specific circumstances, by inhalation (Sala et al., 2001), although occupational exposure cannot be ruled out (Garcia et al., 1999). Foods such as fruits, vegetables and cereals may be contaminated because they are directly treated with pesticides or are grown in contaminated fields. Moreover, animal-derived products may be contaminated because of trace residues in soil, water, and animal feed (Hura et al., 1999). Human beings are positioned at the top of the chain, and it is common to find human tissues containing variable amounts of xenobiotics (Sasaki et al., 1991; Reichrtova et al., 1999; Lackmann et al., 1999; Waliszewski et al., 2001; Covaci et al., 2002; Carreño, 2005; Araque, 2005; Lopez-Espinosa et al., 2006a). Studies in Southern Spain have detected organochlorine pesticides in maternal fatty tissue and blood, placental tissue, umbilical blood cord, and milk (Rivas et al., 2001; Campoy et al., 2001; Botella et al., 2004; Fernández et al., 2004; Cerrillo et al., 2005a; Lopez-Espinosa et al., 2006), but a systematic study of newborn exposure has yet to be published.

Many chlorinated pesticides are persistent lipophilic substances, favoring their widespread dispersal and accumulation in fat tissue for years because of their long half-life. During pregnancy and lactation, body fat is mobilised and persistent chemicals stored in the fat are released, including those with hormone-disruptive activity (Olea et al., 1999; Waliszewski et al., 2000; Dorea et al., 2001). This means that a proportion of the “body burden” of toxins that have been accumulated in women’s body during her entire life may pass through the placenta to the developing foetus in the womb and via breast milk to the nursing young (Olea & Olea-Serrano, 1996).

Many opinions exist concerning the passage of these substances across the placenta barrier and their possible accumulation in this tissue. The placenta

provides a link between the circulations of two distinct individuals but it also constitutes a barrier to prevent maternal-foetal transfer of some compounds. However, the impression that the placenta forms an impenetrable obstacle against most chemicals is now contested (Massey, 2002; Syme et al., 2004). The major function of the placenta is to mediate the exchange of nutrients, oxygen and waste products between maternal and foetal circulation (Syme et al., 2004; Ganapathy & Prasad, 2005). This function is made possible because of the expression of a multitude of transport proteins in the placenta, but these transporters are also able to interact with xenobiotics and pharmacological agents, facilitating their entry to foetal circulation or preventing such entry by actively eliminating them from the placenta back into maternal circulation (Ganapathy & Prasad, 2005).

In contrast to the wealth of data available on adult exposure to environmental chemicals, the effects of prenatal exposure have yet to be clarified (Reichrtova et al., 1999). Immature physiological functions of the foetus and young child theoretically make these age groups more vulnerable to harmful effects of toxicants, at least up to 1 year of age (Peters, 1993; Ostergaard & Knudsen, 1998).

Although there may be a lower exposure to persistent lipophilic OC pesticides during foetal development than from breast feeding, exposure during embryogenesis may have a greater impact (Dorea et al., 2001). Children born deformed or with increased cancer risk as a result of maternal receipt of thalidomide (McBride, 1961) or diethylstilbestrol (Newbold & McLachlan, 1996) in the 1960s provided a dramatic example of the vulnerability of the unborn. However, whereas effects of pharmaceuticals can usually be readily observed because of the relatively high doses administered and the precise knowledge of the exposure, assessment of the consequences of low-level exposures to occupational and environmental chemicals poses a much more challenging research task (Myllynen et al., 2005).

Hormones may be affected by endocrine disrupters that can cause perturbations during foetal development by mimicking or blocking natural hormones (Vandenbergh, 2004). The foetus and the developing newborn are

very sensitive to changes in hormone levels since these hormones play a major role in regulating the development of organs and tissues. Even a single disturbance at a critical time during the development of a body system can cause irreversible changes (Bigsby et al., 1999).

The oestrogenicity of many xenoestrogens compared to oestradiol is weak, but bioaccumulation means that current levels of exposure may be sufficient to induce some effects in human (Olea et al., 1998). Animal studies and descriptive epidemiologic data have suggested that hormone-related cancers may originate *in utero*, and that pre- and peri-natal periods may constitute a 'time window' of major importance for future cancer risk (Ekbom, 1998). There have also been reports that an increased frequency of male sexual development disorders, e.g., testicular cancer (Adami et al., 1994; Forman & Moller, 1994), cryptorchidism/hypospadias (Olea et al., 1999; Hosie et al., 2000) and testicular function impairment (Auger et al., 1995; Swan et al., 1997), as well as sperm count decline in normal men (Carlsen et al., 1992), may be related to a greater exposure to xenoestrogens *in utero* (Sharpe & Skakkebaek, 1993).

The placenta is an easily accessible and non-invasive human tissue that can be used as a biomarker of both foetal (Baglanet al., 1974; Slikker and Miller, 1994) and maternal (Iyengar & Rapp, 2001) exposure. In this context, the placenta has not received as much attention as it deserves, despite the possibilities of its use for evaluating the exogenous hormonal burden and for investigating aspects of developmental toxicity (Iyengar & Rapp, 2001).

There were three main aims in the present study:

First, to assess the exposure to 17 OC pesticides of mother-infant pairs in Southern Spain based on the direct measurement of exposure to these compounds by analyzing the placenta and to investigate the association between maternal and pregnancy variables and the exposure.

Second, to adapt the methodology developed in adipose tissue to assess TEXB in placenta samples collected at delivery from mothers in Southern Spain, and to investigate factors associated with the exposure observed. Testing systems are required to screen for estrogenicity and to identify appropriate biomarkers of human exposure. It is necessary to develop minimally invasive

biomarkers that are predictable and consistent for endocrine disruption functions (Olea et al., 1998). To address this issue, our group previously developed a method to assess the combined estrogenic effect of bioaccumulated xenoestrogens (Fernández et al., 2004). High performance liquid chromatography (HPLC) is used to separate environmental xenoestrogens from sex-steroids, and the combined estrogenic effect of each fraction is analyzed from its proliferative effect on MCF-7 human breast cancer cells and expressed as estradiol equivalent units (Rivas et al., 2001; Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2004).

Finally, the third aim of this study was to apply this methodology to assess the total effective xenoestrogenic xenobiotic burden (TEXB) in the placental tissue of mothers from Southern Spain using the recombinant yeast estrogen screen (YES) bioassay and to compare results with the findings previously described by the E-Screen assay. The YES includes yeast-based assays expressing human oestrogen receptors (Routledge & Sumpter, 1996; Gaido et al., 1997). Separation of xenoestrogens from endogenous hormones extracted from placental tissue of women was followed by testing of these sub-fractions in the YES bioassay.

6.2. MATERIAL AND METHODS

6.2.1. PARTICIPANTS AND DATA COLLECTION

In 2000, a study of chronic exposure to endocrine disrupting chemicals was initiated at the Clínico Univeristy Hospital of Granada. During a two-year period, from October 2000 to June 2002, a cohort of mother-son pairs was established, excluding: mothers with serious chronic diseases (e.g., diabetes, hypertension or thyroid disease), those who developed any pregnancy complication that could affect foetal growth or development, and non-residents in the hospital referral area. For the present study, 308 women giving birth to single healthy babies were randomly selected and their written informed consent to participation was obtained. Placental samples were collected immediately after delivery and then stored and frozen at -86°C until their analysis.

Information on potential confounding variables related to parents, pregnancy, and delivery was gathered from medical records and from structured face-to-face interviews conducted shortly after the delivery. Data included physical characteristics, reproductive history, educational levels, lifestyle habits (diet, cosmetics, smoking and alcohol consumption), residence, working conditions and information on activities with potential for exposure to endocrine disruptors. The study was approved by the Institutional Ethical Committee of the centre.

6.2.2. SAMPLING AND SAMPLE PREPARATION OF PLACENTAS

All placentas were examined, weighed and placed in aluminium paper together with the umbilical cord. Samples were immediately coded, frozen and confidentially and anonymously stored at -86°C until their processing. In the laboratory, a triangular portion of the frozen sample was cut so as to include

maternal and foetal sides as well as central and peripheral parts. The section was cut into small pieces, minced and mechanically homogenized.

6.2.3. REAGENTS

All solvents used were of high purity grade: Methanol, 2-isopropanol, hexane, ethanol, chloroform and hydrochloric acid (Panreac, Barcelona, Spain). The chemicals (and suppliers) used were: aldrin, dieldrin, endrin, lindane, methoxychlor, mirex, endosulphan-I and -II, p-p'-DDT, o-p'-DDT (Sulpeco, Bellefonte, PA), o,p'-DDD, p-p'-dichlorobenzophenone, hexachlorobenzene (Dr Ehrenstorfer Lab., Ausburg, Germany), p,p'-DDE (Chem Service, West Chester, PA) and endosulphan-diol, -sulphate, -lactone and -ether (Hoechst Schering AgrEvo, Frankfurt, Germany); p-p'-dichlorobenzophenone was used as internal pattern.

6.2.4. APPARATUS

6.2.4.1. High-performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC procedure was performed with a Waters Model 501 Millipore apparatus (Marlborough, MA) equipped with two pumps and a U6K injector of 200 μ L load capacity. Ultraviolet/visible detector was a Waters Model 490 Millipore (λ :280nm) device using Millennium Chromatography Manager software. A Lichrocart column (20x0.4cm) was used (Merck, Darmstadt, Germany) packed with Lichrospher Si-60 of 5 μ m particle size; flow rate: 1mL/min.

6.2.4.2. Gas chromatography and electron-capture detection (GC/ECD)

A Varian-3350 machine with ECD (63Ni) was used, applying Millennium Chromatography Manager software, with CP SIL8 CB column (30 m x 0.25 mm). Working conditions were: ECD at 300°C; injector at 250°C; Program: initial T 130°C (1 min); 20°C/min to 150°C; 10° C/min to 200°C; 20°C/min to 260°C (20 min); carrier gas was nitrogen at a flow of 30 mL/min and auxiliary gas was nitrogen at a flow of 40 mL/min. Injection volume was 1 μ L. The reproducibility of

the process was established by running 10 fat samples 10 times. The limit of quantifications of pesticides were: 0.1 ng/mL (Endosulphan-lactone and Endosulphan-eter), 0.5 ng/mL (lindane, hexachlorobenzene, endosulphan-I, endosulphan-diol), 1 ng/mL (o,p´DDT, p,p´DDT, o,p´DDD, p,p´DDE, methoxychlor, mirex, endosulphan-sulphate, aldrin, dieldrin), 2 ng/mL (endosulphan-II) and 3 ng/mL (endrin). The operational quality control was previously reported (Rivas et al., 2001).

6.2.4.3. Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS)

A Saturn 2000 ion-trap mass spectrometer from Varian Instruments (Walnut Creek, CA) with Varian injector 1177 and CP5860 WCOT Fused silica column (30 m x 0.25 mm) was used. The ion-trap mass spectrometer was operated in SIS impact mode. Working conditions were: oven T: 50°C (2 min), 30°C/min to 185°C (1 min), 2°C/min to 250°C, 30°C/min to 300°C (5 min); injector T: 250°C; injector flow: 1 ml/min; Ion-trap T: 200°C; carrier gas was He (purity 99.999%). Injection volume was 2 µL.

6.2.5. SAMPLE EXTRACTION

Organochlorine pesticides were extracted by using a previously reported method with slight modifications (Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004): An aliquot of 400 mg of placenta homogenate was dissolved in hexane (20mL) and eluted in a glass column filled with Alumine Merck 90 that had been dried at 600° C for 4 h and rehydrated by addition of 5% water. The process was repeated four times (Total weight used: 1.6g of placenta). The eluate obtained was concentrated at reduced pressure, dried under a stream of nitrogen, dissolved in 800 µL of hexane and then injected four times into the HPLC. A previously described preparative liquid chromatography method (Rivas et al., 2001) was developed to allow the separation of xenoestrogens from natural oestrogens without destroying them. Briefly, extracts were eluted by a gradient with two mobile phases: n-hexane (phase A) and n-hexane:methanol:2-isopropanol (40:45:15 v/v/v) (phase B). Three pooled fractions, designated alpha (pooled

fraction that contains organohalogenated xenoestrogens), α and β (pooled fraction where natural estrogens elute) were separated by HPLC. The fraction in which pesticides were eluted (α) were analysed by GC/ECD and also tested in the bioassay of estrogenicity. The fraction β was tested in the E-Screen bioassay.

6.2.6. LIPID DETERMINATION

Total lipid content was quantified gravimetrically using a previously reported method (Rivas et al., 2001; Cerrillo et al., 2005a; Lopez-Espinosa et al., 2006), homogenizing 200 mg of placenta with 5 mL of chloroform/ methanol/ hydrochloric acid (20:10:0.1v/v/v). After repeating the process, 10 mL of 0.1 N HCl were added and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The organic phase was collected in beakers and dried under a nitrogen stream. Beakers were then weighed and the total lipid was expressed in g of lipid per g of placenta.

6.2.7. CHEMICAL ANALYSIS BY CHROMATOGRAPHY

Presence of OC pesticides in placental tissue was analysed by GC/ECD as previously described (Rivas et al., 2001). Briefly, the fraction in which the pesticides were eluted was dried, dissolved in n-hexane (1mL), spiked with an internal standard (p,p'-dichlorobenzophenone) and then injected into a gas chromatographer with ECD (1 μ L). In the gas chromatography, the α and β fractions were silent. Presence of organochlorines was confirmed by GC/MS.

6.2.8. QUANTITATIVE EVALUATION OF ESTROGENICITY OF PLACENTA EXTRACTS

6.2.8.1. E-Screen

MCF7 cells were used in the test of estrogenicity according to a slight modification (Villalobos et al., 1995) of the original description (Soto et al., 1992). Briefly, cells were trypsinized and plated in 24-well plates (Limbro, McLean, VA)

at initial concentrations of 20,000 cells per well in 5% foetal bovine serum in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DME). Cells were allowed to attach for 24 h, and the seeding medium was then replaced with 10% CDHuS-supplemented phenol red-free DME.

Duplicated dry fractions obtained by preparative HPLC chromatography were resuspended in 5 mL of CDHuS-supplemented phenol red-free DME, vigorously shaken and left at rest for 30 min, then filtered through a 0.22 μm filter and tested in the estrogenicity assay at dilutions of 1:1 to 1:10. Each sample was done in triplicate with a negative (vehicle) and positive (estradiol 10 pM) control in each plate. The assay was stopped after 144 h by removing medium from wells, fixing the cells, and staining them with sulforhodamine-B (SRB). Cells were treated with cold 10% trichloroacetic acid and incubated at 4° C for 30 min, washed five times with tap water, and left to dry. Trichloroacetic-fixed cells were stained for 10 min with 0.4% (wt/vol) SRB dissolved in 1% acetic acid. Wells were rinsed with 1% acetic acid and air dried. Bound dye was dissolved with 10 mM Tris base (pH 10.7) in a shaker for 20 min. Finally, aliquots were transferred to a 96-well plate and read in a Titertek Multiscan apparatus (Flow, Irvine, CA) at 492 nm. The linearity of the SRB assay with cell number was verified prior to the cell growth experiments. The proliferative effect (PE) was calculated as the ratio between the highest cell yield obtained with 100 pM of estradiol and the proliferation of hormone-free control cells. The PE was referred to the maximal PE obtained with estradiol and transformed into estradiol equivalent units (Eeq) by reading from a dose-response curve prepared using estradiol (concentration range, 0.1 pM to 10 nM) (Rivas et al., 2001; Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2004).

6.2.8.2. Yeast Estrogen Screen (YES)

The yeast oestrogen screen (YES) was carried out following the protocol developed by Routledge and Sumpter (1996). Briefly, 50 ml of growth media were inoculated with 125 μl of 10 \times concentrated yeast stock and grown overnight in an orbital shaker at 28°C until turbid (absorbance at 640 nm of 1.0). The assay medium consisted of 50 ml of growth medium, chlorophenol red- β -D-

galactopyranoside (10 mg/l, CPRG, Boehringer Mannheim, East Sussex, UK) and 2 ml of the overnight yeast culture. Aliquots of 10 μ L of 17 β -Estradiol and 200-400 μ L of samples were transferred to 96-well optically flat-bottom microtitre plates and allowed to evaporate to dryness. A volume of 200 μ L of the assay medium containing yeast was then added to the wells. Each individual plate also incorporated ethanol controls (i.e., no test agents), positive controls with 17 β -estradiol (0.1 and 10 nM) and blanks without yeast cells. To each well, except the blanks, a volume of 200 μ l of yeast-seeded assay medium was added. To minimise evaporation during the subsequent incubation time, the outer wells were not used, being filled with sterile water instead. Plates were sealed and shaken vigorously for 2 min on a microtitre plate shaker before incubating at 32°C in a humidified box for 72 h. During this period they were again shaken at 24 h and 71 h. Plates were then analysed spectrophotometrically at 540 nm (colour) and 620 nm (turbidity) using a Labsystem Multiskan Multisoft plate reader. Data shown in graphs are corrected for turbidity and constitutive Lac-Z expression seen in the ethanol controls as follows:

$$\text{Corrected absorbance} = \text{test}_{540\text{nm}} - \text{test}_{620\text{nm}} + \text{control}_{620\text{nm}} - \text{control}_{540\text{nm}}$$

Samples were run in duplicate and experiments repeated three times. Nominal concentrations were used.

The PE of alpha and beta fractions was referred to the maximal proliferative effect obtained with estradiol and transformed into estradiol equivalent units (Eeq) by reading from a dose-response curve prepared using estradiol (Concentration range 2 pM to 2 nM).

6.2.9. STATISTICAL ANALYSIS

6.2.9.1. Chemical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS Version 12 statistical software. Standard descriptive statistics (means, medians, standard deviations [SDs], maximums and frequencies) were calculated for concentrations of

organochlorine pesticides in placenta samples. Spearman correlation coefficients were used to calculate correlations between p,p'-DDT and metabolites/isomers, endosulphan-I and metabolites/isomers and aldrin and isomers, and to study associations among variables shown in Table 1. Spearman correlation coefficient, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test were used to calculate associations between placenta pesticide concentrations and variables in Tables 1 and 2. Pesticide exposure was then assessed in two further ways: as a dichotomous variable for each pesticide (above and below of limit of quantification [LQ]) and as a categorical variable (number of pesticides in each sample). The relationship between the number of pesticides per sample (normal distribution) and mother- and newborn-related variables were analyzed by means of the Pearson or Spearman test (depending on the maternal and newborn variables, since some of them had a normal distribution and others did not) and Student's t test and ANOVA. The Chi-square test was used to study the possible association between presence/absence of pesticides and variables. Finally, analysis of the association between levels of pesticides and pairs of variables was performed using two-way ANOVA. Values below the Limit of Quantification (LOQ) were replaced by half of the LOQ in all analyses. A *p* value of ≤ 0.05 was regarded as significant and a *p* value of ≤ 0.1 was regarded as close to significant. All statistical analyses were performed using SPSS Version 12 statistical software.

6.2.9.2. Biological analysis

I.- E-Screen

Results are expressed as mean \pm SD, median, range and frequency. Proliferation yield experiments conducted in quadruplicate or triplicate wells were repeated at least three times. Mean cell numbers from each experiment were normalized to steroid-free control cultures to correct for differences in initial seeding density. The Spearman correlation coefficient, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test were used to calculate correlations between the TEXB values (expressed as estradiol equivalents per ml [Eeq pM/mL], estradiol equivalents per gram of placenta [Eeq pM/g placenta] or estradiol equivalents per gram of lipid [Eeq pM/g lipid]) and the variables in Tables 1 and 2. Finally, TEXB levels were

stratified above and below the LOQ using the Chi-square test to study the possible association between presence/absence of estrogenicity and variables. Finally, analysis of the association between levels of pesticides and pairs of two variables was performed using two-way ANOVA. Values below the LOQ were replaced by the estradiol concentration needed to produce a significantly different proliferative effect from that observed in control cells. A p value of ≤ 0.05 was regarded as significant and a p value of ≤ 0.1 was regarded as close to significant. All statistical analyses were performed using SPSS Version 12 statistical software.

II.- Comparison of E-Screen and YES assay for the assessment of the TEXB

Standard descriptive statistics (means, medians, standard deviations [SDs], minimum, maximum and frequencies) were calculated for the total xenobiotic estrogenic burden (TEXB) obtained in both assays. Proliferation yield experiments were repeated two to three times in both bioassays. TEXB values are expressed as estradiol equivalents per ml (Eeq pM/mL), estradiol equivalents per gram of placenta (Eeq pM/g placenta), and estradiol equivalents per gram of lipid (Eeq pM/g lipid). Spearman correlation coefficients were used to calculate the correlation between the TEXB of the alpha and beta fractions in both assays. Spearman correlation coefficient and Mann Whitney test were used to calculate the associations between the TEXB of the alpha fraction in the YES and E-Screen and between TEXB of beta fractions in these assays. Finally, the TEXB values of alpha and beta were stratified above and below the limit of detection [LOD]. We used the chi-square test to study the possible association between presence/absence of estrogenicity in the alpha fraction as well as in the beta fraction of the E-Screen and YES assays. Values below the detection limit were replaced by the estradiol concentration needed to produce a significantly different proliferative effect from that observed in controls. A p value of ≤ 0.05 and ≤ 0.1 was regarded as significant and close to significant, respectively. Statistical analysis was performed using SPSS Version 12 statistical software.

6.3. RESULTS

In this summary, we report only the main characteristics of the mothers, fathers and newborns. Due to the very large amount of data from the questionnaires and medical records, only a part of the information is printed in this summary, in sections 6.3.1-6.3.3. More information is shown in sections 4.1 and 4.2 of the Thesis.

Assessments of the exposure to 17 organochlorine pesticides and the TEXB of the alpha and beta fractions are shown in sections 6.3.4 and 6.3.6. Further information is printed in sections 4.3 and 4.4 of the thesis.

Associations between maternal/pregnancy variables and organochlorine exposure and TEXB in placental tissue are reported in sections 6.3.5 and 6.3.7. Additional information is printed in sections 4.5 and 4.6 of the chapter of results.

Finally, results of the comparison between TEXB of placental tissue using the YES and E-Screen assays are printed in section 6.3.8. For further information see section 4.7 of the Results chapter of the thesis.

6.3.1. CHARACTERISTICS OF MOTHERS

The mean age was 32 yrs (range 16-46 yrs). Although 41.56% of the mothers lived in rural areas (<10.000 inhabitants), only 4.9% of them reported working in agriculture. Half of the mothers (49.6%) had only completed primary schooling. Forty-six percent of mothers were primiparous, and the number of pregnancies varied from 1 to 9. Most of the women had a normal body mass index before pregnancy (23.49Kg/m^2), according to the WHO. 27.6% smoked during pregnancy but none reported abusing drugs during pregnancy.

Table 1. Characteristics of pregnant women

Variables	Frequency N (%)	Mean (\pm SD*)	Median	Range
Age (years)		31.91 (\pm 5.35)	32.00	16-46
BMI[#] (kg/m²)		23.49 (\pm 4.13)	22.59	16.90-39.86
Maternal weight gain (Kg)		12.78 (\pm 5.70)	12.00	-10-34
Pregnancy				
Number of pregnancies⁺		1.76(\pm 0.94)	2.00	1-9
Primiparous	142(46.1)			
Multiparous	166(53.9)			
Prenatal smoking				
Non-smoker	223(72.4)			
Smoker	85(27.6)			
Residence				
Rural	128(41.56)			
Urban	180(58.44)			
Educational level				
Illiterate	12(3.90)			
Primary education	153(49.67)			
Secondary education	89(28.89)			
Higher education	54(17.54)			
Employment				
Housework	95(30.8)			
Agriculture	15(4.9)			
Other	198(64.3)			

*SD = Standard Deviation. ⁺Number of pregnancies= including the newborn of the present study. [#]BMI= Body Mass Index before pregnancy.

6.3.2. CHARACTERISTICS OF NEWBORNS

The mean weight was 3306.46 g, mean ponderal index (PI) was 25.71 g/cm³, and mean gestational age was 39 weeks and 3 days. Most (72.5%) were born by spontaneous delivery. Around 30.2% and 35.7% of the recruited newborns were born during the spring and summer season, respectively.

Table 2. Characteristics of newborns

Variables	Frequency N (%)	Mean (\pm SD*)	Median	Range
Birth weight (g)		3306.46 (\pm 452.06)	3300.00	2000-3300
Head circumference(cm)		34.80 (\pm 1.29)	35.00	32.00-38.00
Ponderal Index (g/cm³)		25.71 (\pm 4.28)	25.48	11.92-54.84
Gestational age (weeks)		39.38 (\pm 1.49)	40	31-42
SGA[§]				
Yes	18(6.7)			
No	251(93.3)			
Type of birth				
Spontaneous	208(72.5)			
Caesarean	34(11.8)			
Instrumental	45(15.7)			
Season of birth				
Spring	93(30.2)			
Summer	11(35.7)			
Autumn	56(18.2)			
Winter	49(15.9)			

*SD= Standard Deviation. [§]SGA=Small for gestational age (newborn with a birth weight for their gestational age on percentile 5 according to De Doubilet et al., (1997) (See section 4.2.3.2 in the thesis).

6.3.3. CHARACTERISTICS OF FATHERS

The following Table lists characteristics of fathers in the study group. Their mean age was 34 yrs (range, 19-62 yrs). Fifty-two percent of fathers had completed primary schooling and only 7.1% worked in agriculture.

Table 3. *Characteristics of fathers*

Variables	Frequency N (%)	Mean (\pm SD*)	Median	Range
Age (years)		34.60 (\pm 5.86)	35.00	19-62
Educational level				
Illiterate	22(7.17)			
Primary education	161(52.44)			
Secondary education	69(22.48)			
Higher education	55(17.92)			
Employment				
Skilled manual [#]	127(41.2)			
Agriculture	22(7.1)			
Other	158(51.7)			

*SD=Standard Deviation. [#]Skilled manual=carpenter, mechanic, plumber, painter or building worker.

6.3.4. ASSESSMENT OF EXPOSURE TO ORGANOCHLORINE PESTICIDES OF MOTHER-INFANT PAIRS

6.3.4.1. Number of pesticides per placenta

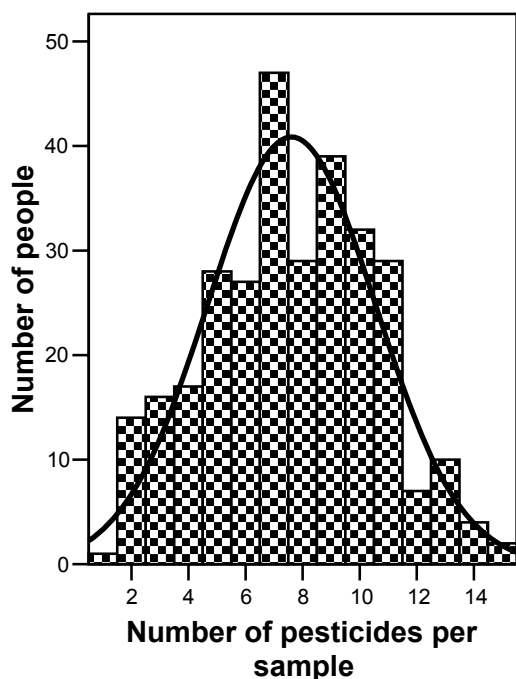
All samples studied were positive for one or more residues. A mean of eight pesticides per placenta were detected (range 1-15 pesticides). Seven OC pesticides were detected in at least half of the placenta samples (p,p'DDE,

lindane, endosulphan-diol, endosulphan-I, o,p'DDT, endosulphan-sulphate and endosulphan-ether).

The following Table and Figure show the distribution of the number of pesticides per placenta sample.

Table 4. Number of pesticides per sample

Number of pesticides	Mean \pm SD	N	%
	7.61 \pm 2.95		
1		1	0.3
2		14	4.6
3		16	5.3
4		17	5.6
5		29	9.3
6		27	8.9
7		48	15.6
8		30	9.6
9		40	12.9
10		33	10.6
11		30	9.6
12		7	2.3
13		10	3.3
14		4	1.3
15		2	0.7
16		0	0.0
17		0	0.0
Total		308	100



Mean=7.61±2.95 pesticides/sample
N=308

6.3.4.2. Residues of DDTs in placenta extracts

p,p'DDE was the most frequent pesticide (92.7%) found, followed by o,p'DDT (52.3%), with a mean value of 2.79±3.77 ng/g placenta and 0.54±0.84 ng/g placenta, respectively. Mean concentration of p,p'DDT was 0.77±1.46 ng/g placenta (frequency=46%).

Mean lipid content of placentas was determined (2.70±1.70%, g of lipid per g of placenta) and used to calculate concentrations of the more lipophilic OCs on a lipid content basis. Mean lipid concentrations of p,p'DDT and its main metabolite (p,p'DDE) were 27.16±92.93 ng/g of lipid and 92.29±155.76 ng/g lipid, respectively.

Table 5. Residues of DDTs in placenta extracts (ng/g placenta)

Pesticides	Frequency(\geq LQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
o,p' DDT	161	52.3	0.54	0.84	0.5	6.98
p,p' DDT	139	46.0	0.77	1.46	0	8.78
o,p' DDD	150	48.7	1.59	3.10	0	25.34
p,p' DDE	286	92.7	2.79	3.77	1.62	28.29
Σ DDTs	301	97.7	5.54	5.68	3.85	37.87

SD= Standard deviation.

Table 6. Residues of DDTs in placenta extracts (ng/g lipid)

Pesticides	Frequency(\geq LOQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
o,p' DDT	161	52.3	13.28	34.08	0.5	292.20
p,p' DDT	139	46.0	27.16	92.93	0	1066.99
o,p' DDD	150	48.7	50.11	132.13	0	1588.28
p,p' DDE	286	92.7	92.29	155.76	8.38	1250.45
Σ DDTs	301	97.7	189.04	277.83	101.69	2337.41

SD= Standard deviation.

Spearman's correlation coefficients showed a significant association between concentrations of p,p' DDT and its metabolites/isomers (ng/g placenta). Total DDT was significantly associated with p,p' DDT ($\rho=0.413$, $p<0.001$), o,p' DDT ($\rho=0.403$, $p<0.001$), o,p' DDD ($\rho=0.557$, $p<0.001$) and p,p' DDE ($\rho=0.707$, $p<0.001$); p,p' DDT was significantly associated with o,p' DDT ($\rho=0.276$, $p<0.001$), p,p' DDE ($\rho=0.264$, $p<0.001$) and o,p' DDD ($\rho=0.207$, $p<0.001$); o,p' DDT was also significantly associated with p,p' DDE ($\rho=0.222$, $p<0.001$) and o,p' DDD ($\rho=0.307$, $p<0.001$); and finally, there was an association close to

significance between p,p'DDD and p,p'DDE ($\rho=0.95$, $p=0.099$). Similar associations were found when correlations were calculated in ng/g of lipid and significant association between p,p'DDD and p,p'DDE was found ($\rho=0.117$, $p=0.041$) (See section 4.3.1.6 of the thesis).

6.3.4.3. Residues of endosulphans in placenta extracts

Almost 96% of participants were exposed to endosulphan and/or endosulphan metabolites, with a mean value of 7.02 ± 8.33 ng/g placenta (corresponding to 260.38 ± 471.48 ng/g lipid). The most abundant endosulphan metabolite was endosulphan-diol (62.1%), with a mean concentration of 4.15 ± 5.02 ng/g placenta (156.73 ± 298.77 ng/g lipid), followed by endosulphan-I (54.2%) with a mean concentration of 0.59 ± 1.28 ng/g placenta (19.87 ± 50.07 ng/g lipid).

Table 7. Residues of endosulphans in placenta extracts (ng/g placenta)

Pesticides	Frequency(\geq LOQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
E-I	167	54.2	0.59	1.28	0.25	11.16
E-II	95	30.8	0.48	1.20	0	12.90
E-eter	155	50.3	0.17	0.41	0.1	4.67
E-lactone	108	35.1	0.97	3.43	0	27.31
E-diol	191	62.1	4.15	5.02	3.36	26.23
E-sulphate	157	51.0	0.83	2.25	0.25	31.66
ΣEndos	295	95.7	7.02	8.33	4.76	59.03

E=Endosulphan. SD= Standard deviation.

Table 8. Residues of endosulphans in placenta extracts (ng/g lipid)

Pesticides	Frequency(\geq LQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
E-I	167	54.2	19.87	50.07	0.25	355.72
E-II	95	30.8	8.64	35.55	0	370.72
E-ether	155	50.3	6.83	23.34	0.1	256.78
E-lactone	108	35.1	36.17	183.19	0	2733.82
E-diol	191	62.1	156.73	298.77	66.22	3014.63
E-sulphate	157	51.0	28.39	70.01	0.25	623.42
Σ Endos	295	95.7	260.38	471.48	113.77	4410.00

E=Endosulphan. SD= Standard deviation.

Among endosulphans (ng/g placenta), total endosulphan was significantly associated with endosulphan-I ($\rho=0.384$, $p<0.001$), endosulphan-II ($\rho=0.218$, $p<0.001$), endosulphan-ether ($\rho=0.144$, $p=0.012$), endosulphan-lactone ($\rho=0.436$, $p<0.001$), endosulphan-diol ($\rho=0.818$, $p<0.001$), and endosulphan-sulphate ($\rho=0.263$, $p<0.001$); endosulphan-I was associated with endosulphan-I ($\rho=0.384$, $p<0.001$), and endosulphan-ether ($\rho=0.151$, $p=0.009$); endosulphan-lactone was associated with endosulphan-diol ($\rho=0.251$, $p<0.001$); and finally, there was an association close to significance between endosulphan-II and endosulphan-lactone ($\rho=0.101$, $p=0.080$). Similar associations were found when correlations were calculated in ng/g of lipid (See section 4.3.1.6 section of the Thesis).

6.3.4.4. Residues of aldrin, endrin and dieldrin in placenta extracts

In relation to aldrin–dieldrin–endrin, 34.1% of the study population presented endrin, 27.8% aldrin and 20.2% dieldrin. The highest concentration detected was that of endrin (1.01 ± 1.98 ng/g placenta or 22.93 ± 66.70 ng/ lipid).

Table 9. Residues of aldrin-endrin-dieldrin in placenta extracts (ng/g placenta)

Pesticides	Frequency(\geq LOQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
Aldrin	87	27.8	0.31	0.83	0	7.86
Endrin	105	34.1	1.01	1.98	0	12.29
Dieldrin	62	20.2	0.28	0.93	0	9.58

SD= Standard deviation.

Table 10. Residues of aldrin-endrin-dieldrin in placenta extracts (ng/g lipid)

Pesticides	Frequency(\geq LOQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
Aldrin	87	27.8	7.56	32.24	0	323.91
Endrin	105	34.1	22.93	66.70	0	574.83
Dieldrin	62	20.2	9.67	37.16	0	300.47

SD= Standard deviation.

Associations among the aldrin group (ng/g placenta) were also observed. There was a significant correlation between aldrin and dieldrin ($\rho=0.148$, $p=0.01$), and endrin and dieldrin ($\rho=0.159$, $p=0.006$). All associations were maintained when correlations were calculated in ng/g of lipid (see section 4.3.1.6 of the Thesis).

6.3.4.5. Residues of lindane, methoxychlor, mirex and HCB in placenta extracts

Lindane was the most frequent pesticide (74.8%), followed by HCB (41.7%) with mean values of 0.39 ± 0.51 ng/g placenta (12.28 ± 31.87 ng/g lipid) and 0.53 ± 1.16 ng/g placenta (15.41 ± 46.46 ng/g lipid), respectively.

Table 11. Residues of HCB, lindane, mirex and methoxychlor in placenta extracts (ng/g placenta)

Pesticide	Frequency(\geq LOQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
HCB	128	41.7	0.53	1.16	0	9.54
Lindane	230	74.8	0.39	0.51	0.25	3.62
Mirex	76	24.8	0.31	0.76	0	6.14
Methoxychlor	94	30.5	0.42	1.31	0	10.41

HCB= Hexachlorobenzene. SD= Standard deviation.

Table 12. Residues of HCB, lindane, mirex and methoxychlor in placenta extracts (ng/g lipid)

Pesticide	Frequency(\geq LOQ)		Mean	SD	Median	Maximum
	N	%				
HCB	128	41.7	15.41	46.46	0	373.71
Lindane	230	74.8	12.28	31.87	0.25	245.67
Mirex	76	24.8	13.59	64.15	0	844.21
Methoxychlor	94	30.5	16.31	71.85	0	985.23

HCB= Hexachlorobenzene. SD= Standard deviation.

6.3.5. ASSOCIATION BETWEEN MATERNAL/PREGNANCY VARIABLES AND ORGANOCHLORINE PESTICIDES

6.3.5.1. Association between characteristics of the study population and the number of pesticides per sample

A higher number of pesticides in placenta was associated with lower maternal weight gain (Table 13) and mothers who reported exposure to chemicals during pregnancy (See section 4.5.1.6 of the thesis). In the multivariate

analysis, the group of women who worked in agriculture and were exposed to chemicals and the group of primiparous mothers who lived in a rural area had a higher mean number of pesticides per sample (See sections 4.6.1.13 and 4.6.1.14 of the thesis).

Table 13. Association between characteristics of the study population and the number of pesticides (Pearson test)

Variables	Number of pesticides	
	r	P
Mothers		
Age(years)	0.019	0.773
Maternal weight gain(Kg)	-0.127	0.028*
Newborns		
Birth weight(g)	-0.047	0.428
Ponderal Index(g/cm ³)	-0.072	0.431
Head circumference (cm)	0.011	0.908

#BMI=Body mass index. & Number of pregnancies including the newborn in the present study.

Table 14. Association between characteristics of the study population and the number of pesticides (Spearman test)

Variables	Number of pesticides	
	ρ	P
Mothers		
Body mass index(kg/m ²)	0.043	0.456
Number of pregnancies ^{&}	-0.039	0.498
Newborns		
Gestational age(weeks)	0.050	0.406

#BMI=Body mass index. & Number of pregnancies including the newborn in the present study.

Table 15. Association between characteristics of the study population and the number of pesticides (the *t*-Student and ANOVA test)

Variables	Number of pesticides	
	Mean	P
Mothers		
Residence		
-Rural	7.49	0.399
-Urban	7.77	
Educational level		
-Illiterate/Primary education	7.68	0.713
-Secondary education	7.64	
-Higher education	7.31	
Employment		
-Housework	7.72	0.613
-Agriculture	8.33	
-Other	7.58	
Prenatal smoking		
-Non-smoker	39.37	0.262
-Smoker	39.43	
Parity		
-Primiparous	7.85	0.195
-Multiparous	7.40	
Newborns		
Type of birth		
-Spontaneous	7.57	0.921
-Caesarean	7.45	
-Instrumental	7.73	
SGA^{&}		
-Yes	6.68	0.223
-No	7.71	

Significant differences ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

6.3.5.2. Association between characteristics of the study population and exposure to DDTs

A significant relationship was found between a larger amount of p,p'-DDT in placenta and older age of the mother (Tables 16-17) and an association close to significance was observed between higher levels of p,p'-DDT in newborns and a normal weight for their gestational age (Tables 18 and 19). There was also an association close to significance between higher p,p'-DDT levels and lower BMI (Table 16) and a significant association between presence/absence of p,p'-DDT and BMI, with higher frequency in mothers with higher BMI ($\geq 25 \text{Kg/m}^2$) (See section 4.5.1.2 section of the thesis).

There was a significant association between higher concentrations of o,p'-DDT and larger head circumferences (Tables 16 and 17). Moreover, a higher frequency of o,p'-DDT was found in babies with birth weight $\geq 2500 \text{g}$ (presence of o,p'-DDT in babies with $< 2500 \text{g}$ and $\geq 2500 \text{g}$ birth weight = 9.09% and 53.45%, respectively) (See section 4.5.3.1 of the thesis) and in babies with a normal weight for their gestational age (Tables 18 and 19). When the influence between pair of variables on o,p'-DDT exposure was studied, the group of women who were primiparous and lived in an urban area had the highest concentrations (See the 4.6.1.14 section in the thesis).

Higher p,p'-DDE concentrations were significantly associated with higher BMI (Tables 16 and 17), and an association close to significance was observed with lower maternal weight gain during pregnancy (Table 17) and lower birth weight (Table 16). When the influence of pairs of variables on p,p'-DDE exposure was studied, higher concentrations were found in younger women (≤ 32 years) with higher BMI ($\geq 25 \text{Kg/m}^2$), primiparous mothers with more than 12Kg gained, older primiparous women and babies with higher birth weight ($\geq 2500 \text{g}$) and lower gestational age (< 37 weeks) (See sections 4.6.1.1, 4.6.1.10 and 4.6.2.1 of the thesis). Moreover, mothers with lower educational level (illiterate or primary education) had higher levels of p,p'-DDE (Table 18).

Here was a close to significant association between residence in rural areas and higher frequency of o,p'-DDD in placental tissue (See section 4.5.1.4 of the thesis), although mean levels were higher in mothers who lived in urban

areas (Table 18 and 19). There was also an association close to significance between concentration of o,p'DDD and educational level (Table 19) (higher levels of o,p'DDD in mothers with secondary education), and between frequency of o,p'DDD and ponderal index (frequency of o,p'DDD in babes with $PI < 25 \text{g/cm}^3 = 55.56\%$ and with $PI \geq 25 \text{g/cm}^3 = 40\%$) (See section 4.5.3.2 of the thesis). The group of younger and primiparous women and the group of non-smokers living in an urban area had the highest levels of o,p'DDD (See section 4.6.1.1 of the thesis).

Finally, a significant association was found between Σ DDTs and place of residence, with higher levels in mothers living in an urban area (Tables 18 and 19). There was a higher frequency of Σ DDTs in placental tissue in mothers who gained less weight during pregnancy ($\leq 12 \text{Kg}$) (See section 4.5.1.3 of the thesis), and an association was found between levels of Σ DDTs and parity, with higher levels in primiparous mothers. There was a close-to-significant relationship between lower levels and mothers with more pregnancies (Tables 17 and 19). When the influence of pairs of variables on p Σ DDTs exposure was studied, women who lived in an urban area and gained $\leq 12 \text{Kg}$ and lived in an urban area and were non-smokers had the highest levels of Σ DDTs (See sections 4.6.1.9 and 4.6.1.15 of the thesis).

Table 16. Association between characteristics of the study population and DDTs (ng/g placenta)(Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)									
	o,p' DDT		p,p' DDT		o,p' DDD		p,p' DDE		ΣDDTs	
	ρ	P	ρ	P	P	p	ρ	P	ρ	P
Mothers										
Age(years)	0.044	0.443	0.159	0.006**	-0.015	0.794	-0.024	0.672	-0.078	0.175
BMI[#](kg/m²)	0.056	0.336	-0.101	0.079⁺	-0.056	0.336	0.101	0.082⁺	-0.035	0.550
MWG[~](Kg)	-0.012	0.838	-0.028	0.621	0.002	0.976	-0.047	0.418	-0.004	0.948
N.pregan.^{&}	-0.001	0.988	0.011	0.842	-0.017	0.768	-0.030	0.599	-0.080	0.160
Newborns										
BW[%](g)	0.087	0.140	-0.086	0.148	-0.067	0.260	-0.014	0.054⁺	-0.075	0.205
PI[§] (g/cm³)	-0.001	0.987	0.028	0.756	-0.096	0.291	-0.043	0.635	-0.059	0.514
HC[©](cm)	0.243	0.011*	-0.064	0.510	-0.144	0.137	-0.098	0.314	-0.114	0.240
GA[†](weeks)	-0.027	0.655	0.011	0.850	0.029	0.637	-0.040	0.507	0.002	0.979

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [#]BMI= Body mass index before pregnancy. [~]MWG=Maternal weight gain. [%]BW=Birth weight. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study. [§]PI=Ponderal index. [©]HC=Head circumference. [†]GA=Gestational age.

Table 17. Association between characteristics of the study population and DDTs (ng/g lipid) (Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)									
	o,p' DDT		p,p' DDT		o,p' DDD		p,p' DDE		ΣDDTs	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	P	P
Mothers										
Age(years)	0.022	0.706	0.152	0.008**	-0.017	0.766	-0.022	0.704	-0.054	0.349
BMI [#] (kg/m ²)	0.042	0.468	-0.087	0.132	-0.050	0.389	0.134	0.020*	0.030	0.601
MWG [~] (Kg)	-0.014	0.806	-0.028	0.624	-0.029	0.615	-0.101	0.082⁺	-0.044	0.451
N.pregan. ^{&}	-0.008	0.892	0.043	0.460	0.005	0.937	-0.057	0.319	-0.101	0.079⁺
Newborns										
BW [%] (g)	0.109	0.064	-0.065	0.273	-0.059	0.320	-0.077	0.195	-0.012	0.834
PI [§] (g/cm ³)	-0.003	0.973	0.061	0.505	-0.111	0.222	0.019	0.833	-0.009	0.926
HC ^ç (cm)	0.227	0.018*	0.003	0.974	-0.128	0.186	-0.059	0.541	-0.055	0.572
GA ⁺ (weeks)	-0.016	0.792	0.016	0.787	0.051	0.400	-0.032	0.594	0.048	0.430

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [#]BMI= Body mass index before pregnancy. [~]MWG=Maternal weight gain. [%]BW=Birth weight. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study. [§]PI=Ponderal index. ^çHC=Head circumference. ⁺GA=Gestational age.

Table 18. Association between characteristics of the study population and DDTs (ng/g placenta) (the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)									
	o,p'DDT		p,p'DDT		o,p'DDD		p,p'DDE		ΣDDTs	
Mothers	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Residence										
-Rural	0.66		1.10		1.79		3.08		6.06	
-Urban	1.06	0.506	1.94	0.979	2.65	0.030*	3.80	0.511	8.79	0.035*
Educational level										
Illiterate/Primary	0.88		0.90		1.74		3.92		6.87	
-Secondary	0.63	0.519	2.10	0.677	2.93	0.116	3.30	0.031*	8.31	0.123
-Higher	1.00		1.94		1.89		1.57		5.71	
Employment										
-Housework	0.72		1.26		1.71		2.96		6.10	
-Agriculture	0.69	0.890	0.49	0.353	1.16	0.978	2.10	0.850	3.95	0.542
-Other	0.87		1.58		2.37		3.67		7.82	
Prenatal smoking										
-Non-smoker	0.90		1.49		2.11		3.34		7.21	
-Smoker	0.60	0.134	1.30	0.462	2.18	0.499	3.37	0.114	6.87	0.403
Parity										
-Primiparous	0.98		1.82		2.30		4.02		8.46	
-Multiparous	0.68	0.894	1.10	0.948	1.98	0.929	2.77	0.583	5.96	0.114
Newborns										
Type of birth										
-Spontaneous	1.00		1.82		3.50		3.07		5.80	
-Caesarean	1.58	0.749	1.34	0.628	1.99	0.959	2.47	0.609	4.65	0.435
-Instrumental	1.02		1.75		3.33		3.25		6.09	
SGA^{&}										
-Yes	0.39		0.66		1.08		2.91		4.46	
-No	0.67	0.006*	1.59	0.072+	2.25	0.404	3.46	0.768	7.37	0.238

Significant differences ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

Table 19. Association between characteristics of the study population and DDTs (ng/g lipid) (the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)									
	o,p´DDT		p,p´DDT		o,p´DDD		p,p´DDE		ΣDDTs	
Mothers	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Residence										
-Rural	12.50	0.365	30.10	0.975	50.51	0.021*	102.46	0.102	200.96	0.004**
-Urban	44.54		74.32		85.77		106.23		310.35	
Educational level										
-Illiterate/Primary	30.39	0.729	23.64	0.724	49.01	0.087*	103.35	0.199	208.92	0.102
-Secondary	17.46		48.94		91.96		119.12		282.44	
-Higher	23.47		124.24		62.50		72.21		283.51	
Employment										
-Housework	13.50	0.973	28.53	0.290	40.26	0.978	84.67	0.874	171.04	0.423
-Agriculture	9.91		8.76		35.74		97.29		172.30	
-Other	32.93		61.25		78.95		114.97		289.08	
Prenatal smoking										
-Non-smoker	31.01	0.184	54.99	0.605	62.43	0.586	103.76	0.151	254.01	0.320
-Smoker	10.60		28.64		69.09		105.41		215.74	
Parity										
-Primiparous	38.63	0.576	72.48	0.826	77.58	0.947	113.83	0.277	303.77	0.040*
-Multiparous	13.83		26.23		52.79		93.84		191.26	
Newborns										
Type of birth										
-Spontaneous	26.43	0.659	63.99	0.606	110.16	0.895	106.49	0.437	203.60	0.324
-Caesarean	29.96		23.77		32.71		76.82		122.01	
-Instrumental	20.16		81.63		71.45		89.49		180.75	
SGA^{&}										
-Yes	6.44	0.012*	12.51	0.094+	37.39	0.646	137.08	0.914	194.63	0.437
-No	13.97		56.01		65.23		104.09		243.23	

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

6.3.5.3. Association between characteristics of the study population and endosulphan exposure

An association close to significance was found between higher concentrations of endosulphan-I in women who worked in activities not related to agriculture or housework (Table 23). Parity, maternal weight gain and residence were predictive factors of concentrations of endosulphan-I in placenta when the effect of pairs of variables was simultaneously studied, since the group of women who were primiparous and gained more than 12Kg (See section 4.6.1.10 of the thesis) and the group who were primiparous and lived in an urban area (See section 4.6.1.14 of the thesis) had the highest levels of endosulphan-I in the placental tissue. With regard to variables of newborns, an association close to significance was found between PI and levels of this pesticide, with higher levels in babies with $PI < 25\text{g/cm}^3$ (See section 4.5.3.3 of the thesis) and a significant association was found between season of birth and levels of endosulphan-I, since higher levels were found in babies who were born in spring (See section 4.5.3.6. of the thesis).

There was also a negative association between endosulphan-II concentrations in placental tissue and maternal age (Table 19 and 20) and weight gain (See section 4.5.1.3 section of the thesis) with higher levels of this pesticide in younger mothers and those with lower weight gain ($\leq 12\text{Kg}$). The frequency of this chemical was higher in mothers with lower educational level, since 44.09% of women who were illiterate or had primary education showed endosulphan-II (See the 4.5.1.6 section in the thesis). Moreover, the group of women who were primiparous and gained $>12\text{Kg}$ had higher levels of this compound. Finally, placentas of mothers who gave birth in autumn also had higher levels (See section 4.5.3.6. of the thesis).

With regard to endosulphan-ether, smokers and women who were exposed to chemicals during pregnancy had higher concentrations and presence (See the 4.5.1.6 and 4.5.1.8 sections in the thesis) of this compound in placenta. Moreover, maternal age, gain weight, parity and residence were significantly associated with endosulphan-ether concentrations when the influence of variables on endosulphan-ether levels were studied in pairs of variables (See

section 4.6 of the thesis), since the group of women with age ≤ 32 years and weight gain of $>12\text{Kg}$ and mothers who lived in a rural area and were primiparous had higher levels of this compound in placental tissue. Regarding newborn variables, concentrations of endosulphan-ether were associated with birth weight, PI and showed a close-to-significant relationship with head circumference. The placenta of mothers who gave birth to babies with a birth weight $\geq 2500\text{g}$, PI $\geq 25\text{g}/\text{cm}^3$ and head circumference $<35\text{cm}$ had higher levels of this compound (See sections 4.5.3.1-4.5.3.3 of the thesis). A higher frequency of this compound in placenta was also found for summer deliveries, but the mean levels were higher for winter deliveries (See section 4.5.3.6. of the thesis).

There was an association that was close to significance between endosulphan-lactone and residence, with higher levels in women who lived in an urban area (Tables 22 and 23). When the influence of pairs of variables on endosulphan-lactone exposure was studied, an association between employment, exposure and levels of this pesticide was found. Women who did not work in agriculture and were exposed to chemicals, had higher levels of this pesticide in the placenta. Regarding newborn variables, a significant relationship was found between a larger amount of endosulphan-lactone and lower PI (Table 20), head circumference $<35\text{ cm}$ (See section 4.5.3.3 of the thesis) and babies that were not small for their gestational age (Table 23). Higher mean levels were found in placenta of mothers who gave birth in summer (See section 4.5.3.6. of the thesis)

Endosulphan-diol had an association that was close to significance with maternal BMI and age, with higher levels in older women with higher BMI (Tables 19 and 20). In the study of variables in groups, a significant association was found between BMI, prenatal smoking and this compound, with higher concentrations in women with BMI $\geq 25\text{ Kg}/\text{m}^2$ and smokers (See section 4.6.1.8 of the thesis). Regarding newborn variables, there was a positive significant association with birth weight (Tables 19 and 20) and an association that was close to significance with head circumference (See section 4.5.3.3 of the thesis) and gestational age (Table 20), with higher levels in babies with greater birth weight, head circumference (babies with a head circumference $\geq 35\text{ cm}$ had

higher levels of this compound) and gestational age. Finally, higher levels of endosulphan-diol in placenta were found for summer deliveries (See section 4.5.3.6. of the thesis).

There was a significant association between younger women (≤ 32 yrs) and higher levels of endosulphan-sulphate (See section 4.5.1.1 of the thesis), and a close-to-significant association between higher levels of this compound and higher BMI (Table 21) and between a higher frequency of this compound and lower weight gain (See section 4.5.1.3 of the thesis). Furthermore, more than 50% of smokers had this compound in the placenta (See the 4.5.1.8 and 4.5.1.8 sections in thesis). When variables were studied in groups of two, younger women with greater weight gain showed higher levels of this compound (See section 4.6.1.2 of the thesis). A larger amount of endosulphan-sulphate was found in babies with smaller head circumference (Table 19) and babies born in summer (See section 4.5.3.6. of the thesis).

Finally, higher levels of Σ endosulphans were associated with higher BMI (Tables 20 and 21), secondary schooling (Tables 20 and 21), exposure to chemicals (see section 4.5.1.6 of the thesis) and smoking, with almost 100% of women who smoked during pregnancy having this compound (See section 4.5.1.8 of the thesis). There was a close-to-significant association between endosulphan or some of its metabolites and birth weight and a significant association with season of birth, with higher mean levels in babies with a birth weight < 2500 g and babies born in the spring (see sections 4.5.3.1. and 4.5.3.6. of the thesis).

Table 20. Association between characteristics of the study population and endosulphans (ng/g placenta)(Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)													
	E-I		E-II		E-ether		E-diol		E-lactone		E-sulphate		ΣEndos	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P
Maternal variables														
Age(years)	0.036	0.537	-0.113	0.049*	-0.043	0.453	0.018	0.064*	0.009	0.879	-0.076	0.191	0.078	0.174
BMI [#] (kg/m ²)	0.040	0.487	0.055	0.343	0.050	0.385	0.113	0.077*	-0.014	0.804	0.085	0.141	0.173	0.003**
Maternal weight gain(Kg)	-0.057	0.319	-0.072	0.209	-0.043	0.456	-0.013	0.827	0.039	0.501	-0.032	0.575	-0.033	0.565
Number of pregnancies ^{&}	0.030	0.597	-0.039	0.498	-0.016	0.784	0.044	0.442	-0.038	0.507	-0.072	0.211	-0.030	0.602
Newborn variables														
Birth weight(g)	0.008	0.889	-0.012	0.834	0.017	0.769	0.126	0.052*	-0.034	0.562	-0.057	0.339	-0.008	0.891
Ponderal Index(g/cm ³)	0.027	0.769	-0.071	0.435	0.142	0.115	0.095	0.295	-0.043	0.638	-0.053	0.558	-0.038	0.675
Head circumference (cm)	0.139	0.152	-0.066	0.497	-0.123	0.204	0.083	0.393	-0.148	0.126	-0.203	0.036*	-0.050	0.606
Gestational age(weeks)	0.028	0.640	0.014	0.821	0.039	0.522	0.109	0.099*	0.020	0.737	-0.094	0.119	0.069	0.252

E=Endosulphan. Significant differences (p≤0.01**; p≤0.05*). Close to significance (p≤0.1⁺). [#]BMI= Body mass index before pregnancy. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study.

Table 21. Association between characteristics of the study population and endosulphans (ng/g lipid) (Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)													
	E-I		E-II		E-ether		E-diol		E-lactone		E-sulphate		ΣEndos	
	ρ	P	ρ	P	P	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P
Maternal variables														
Age(years)	0.015	0.792	-0.114	0.048*	-0.032	0.576	0.104	0.100⁺	0.004	0.951	-0.091	0.113	0.064	0.266
BMI [#] (kg/m ²)	0.034	0.560	0.057	0.321	0.012	0.835	0.114	0.073⁺	-0.016	0.778	0.103	0.075⁺	0.194	0.001**
Maternal weight gain(Kg)	-0.082	0.156	-0.091	0.117	-0.045	0.434	-0.003	0.959	0.023	0.691	-0.044	0.452	-0.046	0.425
Number of pregnancies ^{&}	0.031	0.590	-0.027	0.643	-0.007	0.906	-0.008	0.904	-0.025	0.667	-0.080	0.166	-0.024	0.677
Newborn variables														
Birth weight(g)	0.026	0.664	-0.008	0.891	0.066	0.264	0.150	0.022*	-0.002	0.977	-0.047	0.429	0.035	0.550
Ponderal index(g/cm ³)	0.127	0.196	-0.131	0.148	0.151	0.096⁺	0.127	0.196	0.127	0.030*	-0.048	0.596	-0.036	0.695
Head circumference (cm)	0.120	0.218	-0.044	0.652	-0.064	0.509	0.061	0.570	-0.104	0.283	-0.069	0.480	-0.032	0.739
Gestational age(weeks)	0.039	0.514	0.012	0.848	0.086	0.154	0.100	0.131	0.019	0.748	-0.079	0.191	0.086	0.156

E=Endosulphan. Significant differences (p≤0.01**; p≤0.05*). Close to significance (p≤0.1⁺). [&]Number of pregnancies= including the newborn in the present study.

Table 22. Association between characteristics of the study population and endosulphans (ng/g placenta) (the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)													
	E-I		E-II		E-ether		E-diol		E-lactone		E-sulphate		ΣEndos	
Mothers	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Residence														
-Rural	0.55	0.179	0.84	0.518	0.20	0.387	4.27	0.625	1.44	0.096⁺	0.80	0.997	7.48	0.795
-Urban	1.18		1.33		0.18		4.60		0.99		1.17		8.48	
Educational level														
Illiterate/Primary	0.79		0.70		0.19		4.29		1.25		1.16		7.75	
-Secondary	0.87	0.414	1.69	0.107	0.24	0.042	5.02	0.339	1.14	0.532	0.65	0.109	8.78	0.030*
-Higher	0.71		0.91		0.11		3.68		1.43		0.81		6.59	
Employment														
-Housework	0.47		0.75		0.21		4.23		1.03		0.69		7.61	
-Agriculture	0.55	0.114	0.57	0.377	0.16	0.499	3.07	0.562	1.64	0.834	1.06	0.269	7.05	0.636
-Other	0.98		1.19		0.18		3.33		1.32		1.06		8.05	
Prenatal smoking														
-Non-smoker	0.84	0.683	1.10	0.497	0.21	0.050*	4.46	0.245	1.36	0.246	0.97	0.155	8.13	0.808
-Smoker	0.71		0.88		0.15		4.32		0.94		0.88		7.22	
Parity														
-Primiparous	0.98	0.766	1.27	0.282	0.20	0.363	4.03	0.750	1.28	0.681	1.13	0.263	8.10	0.504
-Multiparous	0.65		0.83		0.19		4.75		1.21		0.80		7.68	
Newborns														
Type of birth														
-Spontaneous	1.05		1.51		0.33		6.70		2.38		1.83		7.11	
-Caesarean	1.17	0.777	1.00	0.272	0.23	0.673	5.42	0.378	2.17	0.979	0.72	0.675	6.04	0.363
-Instrumental	1.17		1.85		0.36		8.07		3.82		1.39		8.85	
SGA^{&}														
-Yes	0.35	0.111	0.73	0.891	0.14	0.724	3.29	0.716	0.17	0.127	0.80	0.984	5.34	0.515
-No	0.83		1.07		0.17		3.70		1.23		0.96		8.00	

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

Table 23. Association between characteristics of the study population and endosulphans (ng/g lipid) (the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)													
	E-I		E-II		E-ether		E-diol		E-lactone		E-sulphate		ΣEndos	
	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Mothers														
Residence														
-Rural	16.61	0.149	8.53	0.583	7.54	0.452	158.11	0.862	46.62	0.090⁺	30.47	0.952	271.25	0.957
-Urban	33.20		21.63		6.08		164.34		43.57		36.32		303.88	
Educational level														
-Illiterate/Primary	18.28		6.19		6.13		136.94		49.05		33.56		258.36	
-Secondary	26.99	0.377	28.23	0.103	9.35	0.554	169.97	0.259	33.48	0.644	24.02	0.421	296.27	0.114
-Higher	32.22		11.37		4.74		229.04		40.30		45.45		338.88	
Employment														
-Housework	11.34		8.89		6.44		153.67		27.55		17.11		225.65	
-Agriculture	22.62	0.092[*]	1.81	0.353	6.70	0.370	190.77	0.323	70.34	0.731	46.06	0.190	328.35	0.816
-Other	29.59		17.39		7.28		161.16		49.27		40.02		314.09	
Prenatal smoking														
-Non-smoker	23.42	0.818	15.16	0.456	7.94	0.057⁺	174.11	0.183	51.15	0.296	34.06	0.239	307.45	0.809
-Smoker	23.39		10.07		4.14		125.87		21.45		28.73		219.44	
Parity														
-Primiparous	25.21	0.888	20.06	0.299	7.70	0.465	146.06	0.904	51.23	0.768	36.81	0.124	284.85	0.529
-Multiparous	21.46		8.29		7.04		172.21		36.67		33.25		281.35	
Newborns														
Type of birth														
-Spontaneous	39.07		29.83		13.52		252.30		77.11		57.73		258.78	
-Caesarean	43.84	0.914	3.80	0.272	7.80	0.501	302.46	0.618	77.43	0.926	47.14	0.736	300.80	0.315
-Instrumental	22.67		29.03		18.00		191.73		84.43		43.16		217.72	
SGA^{&}														
-Yes	12.85	0.158	14.01	0.813	3.38	0.848	104.14	0.901	3.78	0.061⁺	41.90	0.663	183.49	0.869
-No	24.92		14.68		6.23		164.71		36.66		31.35		281.32	

Significant difference (p<0.01**; p<0.05*). Close to significance (p<0.1⁺). [#]BMI= Body mass index before pregnancy. [&]Small for gestational age.

6.3.5.4. Association between characteristics of the study population and exposure to aldrin, endrin, dieldrin

Regarding maternal characteristics, the maternal age, BMI and parity were related to levels of this compound. The group of mothers who were younger (≤ 32 years) and had $\text{BMI} \geq 25 \text{ Kg/m}^2$, and younger multiparous mothers and multiparous mothers with $\text{BMI} \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ had higher levels of aldrin (See the sections 4.6.1.3 and 4.1.7.6 of the thesis). Moreover, a higher level and frequency of aldrin were found in mothers who gave birth in spring (See section 4.5.3.6. of the thesis).

A significant relationship was found between frequency of endrin in placental tissue and employment (20%, 40.57% and 38.7% of agricultural workers, housewives and workers in other activities unrelated to agriculture or housework, respectively, had this compound) (See section 4.5.1.6 of the thesis) and an association close to significance was found between concentrations of endrin and employment (housework >other activity>farming) (Table 27). Moreover, a higher level and frequency of endrin were found in women who reported non-exposure to chemicals during pregnancy (See the 4.5.1.6 section in the thesis). A higher frequency (See section 4.5.1.2 of the thesis) and level (Table 24 and 24) of endrin was found in mothers with higher weight gain. When the influence of pairs of variables on endrin exposure was studied, the group of women who lived in a rural area and gained $\leq 12 \text{ Kg}$ showed higher concentrations of this compound (See section 4.6.1.9 of the thesis). Finally, higher levels of endrin were found in babies with a normal weight for their gestational age (Table 26).

With regard to dieldrin, mothers with lower weight gain had a higher frequency (See section 4.5.1.2 of the thesis) and level of dieldrin in placental tissue (Table 25). The group of older primiparous women also showed higher levels of this compound (See section 4.6.1.3 of the thesis). Finally, dieldrin was more frequently found in placentas of mothers who gave birth to babies with higher gestational age (See section 4.5.3.4 of the thesis).

Table 24. Association between characteristics of the study population and aldrin, endrin and dieldrin (ng/g placenta) (Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)					
	Aldrin		Endrin		Dieldrin	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P
Mothers						
Age(years)	-0.020	0.731	-0.009	0.879	-0.026	0.656
BMI [#] (kg/m ²)	0.036	0.535	0.001	0.987	0.056	0.332
Maternal weight gain(Kg)	0.006	0.920	-0.131	0.022*	-0.081	0.156
Number of pregnancies ^{&}	0.019	0.743	-0.025	0.665	0.027	0.643
Newborns						
Birth weight(g)	0.087	0.141	-0.026	0.657	0.029	0.625
Ponderal Index(g/cm ³)	0.062	0.495	-0.024	0.790	0.023	0.799
Head circumference (cm)	0.114	0.241	-0.013	0.893	-0.076	0.434
Gestational age(weeks)	-0.062	0.304	0.041	0.503	0.084	0.162

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [#]BMI=Body mass index before pregnancy. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study.

Table 25. Association between characteristics of the study population and aldrin, endrin, dieldrin (ng/g lipid)(Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)					
	Aldrin		Endrin		Dieldrin	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P
Maternal variables						
Age(years)	-0.023	0.693	-0.009	0.877	-0.028	0.624
BMI (kg/m ²)	0.034	0.558	0.002	0.976	0.060	0.298
Maternal weight gain(Kg)	-0.008	0.895	-0.149	0.010*	-0.103	0.074⁺
Number of pregnancies ^{&}	0.023	0.685	-0.021	0.713	0.032	0.578
Newborn variables						
Birth weight(g)	0.093	0.115	-0.031	0.600	0.033	0.583
Ponderal Index(g/cm ³)	0.067	0.463	-0.045	0.624	0.033	0.716
Head circumference (cm)	0.156	0.106	-0.023	0.816	-0.023	0.810
Gestational age(weeks)	-0.065	0.283	0.038	0.524	0.089	0.138

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [#]BMI=Body mass index before pregnancy. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study.

Table 26. Association between characteristics of the study population and aldrin, endrin, dieldrin (ng/g placenta) (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)					
	Aldrin		Endrin		Dieldrin	
	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Mothers						
Residence						
-Rural	0.47	0.933	1.49	0.395	0.56	0.897
-Urban	0.53		2.14		0.46	
Educational level						
-Illiterate/Primary	0.49	0.628	1.81	0.722	0.45	0.250
-Secondary	0.46		1.76		0.66	
-Higher	0.57		1.54		0.44	
Employment						
-Housework	0.53	0.925	1.80	0.159	0.53	0.383
-Agriculture	0.47		1.14		0.48	
-Other	0.47		1.74		0.50	
Prenatal smoking						
-Non-smoker	0.47	0.671	1.28	0.677	0.50	0.144
-Smoker	0.50		1.93		0.52	
Parity						
-Primiparous	0.45	0.912	2.00	0.378	0.50	0.678
-Multiparous	0.53		1.53		0.53	
Newborn						
Type of birth						
-Spontaneous	1.27	0.436	2.97	0.880	1.73	0.948
-Caesarean	1.42		3.49		0.62	
-Instrumental	0.65		2.92		0.82	
SGA^{&}						
-Yes	0.62	0.422	0.93	0.098+	0.48	0.373
-No	0.48		1.81		0.48	

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$).

[&]Small for gestational age.

Table 27. Association between characteristics of the study population and (ng/g lipid) (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)					
	Aldrin		Endrin		Dieldrin	
	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Mothers						
Residence						
-Rural	7.45	0.889	20.30	0.460	9.95	0.869
-Urban	8.63		38.82		11.17	
Educational level						
-Illiterate/Primary	7.21		24.24		6.82	
-Secondary	9.61	0.705	31.80	0.664	16.50	0.268
-Higher	6.70		30.69		10.41	
Employment						
-Housework	8.77		31.45		8.86	
-Agriculture	11.22	0.849	9.39	0.094*	12.34	0.427
-Other	7.35		27.46		11.18	
Prenatal smoking						
-Non-smoker	4.83	0.689	14.58	0.790	8.55	0.139
-Smoker	9.02		32.60		11.04	
Parity						
-Primiparous	7.21		30.36		11.26	
-Multiparous	8.41	0.795	25.19	0.366	9.56	0.769
Newborn						
Type of birth						
-Spontaneous	35.92		73.59		54.34	
-Caesarean	31.53	0.496	65.20	0.854	7.42	0.854
-Instrumental	6.25		52.54		49.95	
SGA^{&}						
-Yes	25.87	0.630	14.99	0.204	16.63	0.625
-No	7.22		29.53		9.42	

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$).

^{#&} Small for gestational age.

6.3.5.5. Association between characteristics of the study population and exposure to lindane, methoxychlor, mirex and HCB

An association was found between maternal age and HCB concentrations, with higher levels of this compound in younger women (Tables 24 and 25).

Significant relationships were also observed between lindane concentrations and maternal gain weight, exposure to chemicals, number of pregnancies, smoking, and educational level, and an association close to significance was observed with the BMI. Higher levels of this organochlorine pesticide were found in mothers with BMI ≥ 25 Kg/m² (See section 4.5.1.2 of the thesis), lower weight gain (Tables 24 and 25), exposed mothers (See section 4.5.1.6 of the thesis), more pregnancies (Table 24), smokers (Tables 26 and 27) and women with secondary schooling (Table 26 and 27). There was also an association between the presence/absence of lindane in placental tissue and birth weight (50% and 76% of babies with a birth weight <2500g and ≥ 2500 g, respectively, had this compound in the placenta) and season of birth (mothers who had this compound in their placenta gave birth more frequently in summer) (See sections 4.5.3.1 and 4.5.3.6 of the thesis). Finally, babies who were born spontaneously had higher levels of this compound (Tables 26 and 27).

With regard to mirex, there was a relationship that was close to significance between levels of this compound and maternal age, with higher mirex concentrations in older women (Table 24 and 25). When the influence of groups of two variables on mirex levels was studied, the group of younger women and smokers had higher levels of mirex in placental tissue (See section 4.6.1.4 of the thesis). There was also a close-to-significant association between presence/absence of mirex and both head circumference (14.29% and 34.69% of babies with head circumference <35 cm and ≥ 35 cm, respectively, had this compound in placental tissue) and the small/normal weight for gestational age variable (higher number of small-for-gestational-age babies had this compound) (See sections 4.5.3.2 and 4.5.3.4 of the thesis).

The presence/absence and concentrations of methoxychlor were related to residence (higher presence and levels in mothers who lived in an urban area), educational level (higher frequency and levels in mothers with lower educational

levels) and smoking (higher levels in smokers) (Tables 26 and 27). Finally, levels of this compound were also related to residence and parity (multiparous mothers who lived in an urban area had higher levels of methoxychlor when the influence of pairs of variables on methoxychlor was studied) (See section 4.6.1.14 of the thesis).

Table 24. Association between characteristics of the study population and lindane, methoxychlor, mirex and HCB (ng/g placenta) (Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)							
	Lindane		Methoxychlor		Mirex		HCB	
	ρ	P	P	ρ	ρ	P	ρ	P
Mothers								
Age(years)	0.074	0.202	0.059	0.303	0.106	0.067⁺	-0.106	0.066⁺
BMI [#] (kg/m ²)	0.029	0.622	0.025	0.664	0.031	0.592	-0.062	0.284
MWG [~] (Kg)	-0.111	0.052⁺	-0.046	0.424	-0.013	0.816	-0.033	0.563
N.pregnancies ^{&}	0.115	0.044⁺	-0.036	0.529	-0.059	0.299	-0.043	0.450
Newborns								
BW [%] (g)	0.009	0.877	-0.079	0.185	-0.064	0.278	-0.054	0.360
PI [§] (g/cm ³)	-0.024	0.794	-0.036	0.692	-0.026	0.788	-0.027	0.764
HC [^] (cm)	-0.020	0.833	0.016	0.870	0.027	0.783	0.038	0.700
GA ⁺ (weeks)	-0.001	0.990	-0.002	0.968	0.081	0.178	0.002	0.971

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [#]BMI=Body mass index before pregnancy. [~]MWG=Maternal weight gain. [%]BW=Birth weight. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study. [§]PI=Ponderal index. [^]HC=Head circumference. ⁺GA=Gestational age.

Table 25. Association between characteristics of the study population and lindane, methoxychlor, mirex and HCB (ng/g lipid)(Spearman test)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)							
	Lindane		Methoxychlor		Mirex		HCB	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P
Mothers								
Age(years)	0.047	0.420	0.064	0.266	0.102	0.076⁺	-0.115	0.046[*]
BMI[#](kg/m²)	0.029	0.620	0.026	0.648	0.007	0.900	-0.061	0.293
MWG[°](Kg)	-0.117	0.043[*]	-0.063	0.274	-0.026	0.660	-0.044	0.443
N.pregnancies^{&}	0.081	0.159	-0.030	0.599	-0.040	0.490	-0.035	0.542
Newborns								
BW[°](g)	0.038	0.522	-0.057	0.335	-0.063	0.290	0.070	0.234
PI[§] (g/cm³)	-0.050	0.583	-0.033	0.715	-0.055	0.542	-0.014	0.875
HC[¶](cm)	-0.040	0.678	-0.002	0.983	0.020	0.838	0.020	0.840
GA⁺(weeks)	-0.011	0.857	-0.001	0.991	0.058	0.337	0.004	0.948

Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^{*}$). Close to significance ($p \leq 0.1^{+}$). [#]BMI= Body mass index before pregnancy. [°]MWG=Maternal weight gain. [°]BW=Birth weight. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study. [§]PI=Ponderal index. [¶]HC=Head circumference.

⁺GA=Gestational age.

Table 26. Association between characteristics of the study population and lindane, methoxychlor, mirex and HCB (ng/g placenta) (the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test)

Variables	Pesticides (ng/g placenta)							
	Lindane		Methoxychlor		Mirex		HCB	
	Mean	P	Mean	P	Mean	p	Mean	P
Mothers								
Residence								
-Rural	0.48		0.63	0.018*	0.60		0.79	
-Urban	0.39	0.429	1.02		0.70	0.898	1.08	0.330
Educational level								
-Illiterate/Primary	0.43		0.87		0.49		0.97	
-Secondary	0.57	0.008**	0.70	0.046*	0.94	0.291	0.83	0.701
-Higher	0.28		0.63		0.54		0.81	
Employment								
-Housework	0.42		0.57		0.51		0.64	
-Agriculture	0.39	0.477	1.40	0.319	0.59	0.302	0.73	0.616
-Other	0.46		0.83		0.69		1.04	
Prenatal smoking								
-Non-smoker	0.38		0.63	0.042*	0.77		0.74	
-Smoker	0.47	0.066*	0.83		0.58	0.823	0.97	0.574
Parity								
-Primiparous	0.43		0.73		0.67		1.21	
-Multiparous	0.46	0.372	0.83	0.594	0.61	0.313	0.64	0.169
Newborns								
Type of birth								
-Spontaneous	0.56		1.77		1.26		1.26	
-Caesarean	0.52	0.036*	1.22	0.148	0.92	0.630	1.47	0.958
-Instrumental	0.44		1.37		1.38		1.03	
SGA^{&}								
-Yes	0.28		0.76		1.89		1.23	
-No	0.45	0.257	0.78	0.821	0.56	0.171	0.79	0.909

HCB=Hexachlorobenzene. Significant difference ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

Table 27. Association between characteristics of the study population and lindane, methoxychlor, mirex and HCB (ng/g lipid) (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test)

Variables	Pesticides (ng/g lipid)							
	Lindane		Methoxychlor		Mirex		HCB	
	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P
Mothers								
Residence								
-Rural	14.56	0.505	10.17	0.015*	12.54	0.876	21.63	0.246
-Urban	10.74		30.78		22.15		52.63	
Educational level								
-Illiterate/Primary	9.73		18.74		8.58		41.68	
-Secondary	20.51	0.027*	12.49	0.049*	19.54	0.122	23.07	0.735
-Higher	9.19		28.37		35.59		29.13	
Employment								
-Housework	10.22		12.27		11.38		12.86	
-Agriculture	6.70	0.390	30.89	0.359	12.68	0.210	33.78	0.841
-Other	14.33		20.85		19.31		45.11	
Prenatal smoking								
-Non-smoker	8.89	0.049*	14.76	0.037*	18.05	0.868	18.86	0.570
-Smoker	14.49		19.80		17.55		39.80	
Parity								
-Primiparous	10.72	0.814	13.28	0.552	14.03	0.351	55.64	0.193
-Multiparous	14.83		22.81		18.27		15.26	
Newborns								
Type of birth								
-Spontaneous	16.53		62.06		51.12		41.66	
-Caesarean	20.29	0.024*	23.29	0.141	62.07	0.692	30.20	0.904
-Instrumental	11.88		22.99		49.61		20.67	
SGA^{&}								
-Yes	4.28	0.251	33.62	0.501	13.71	0.092⁺	51.92	0.783
-No	13.77		17.75		15.44		21.58	

HCB=Hexachlorobenzene. Significant differences ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

6.3.6. ASSESSMENT OF THE TOTAL EFFECTIVE XENOESTROGEN BURDEN (TEXB) DUE TO CHEMICAL RESIDUES IN PLACENTA

HPLC eluates containing lipophilic organochlorine xenoestrogens (Alpha fraction) and natural estrogens and another non halogenated compounds (Beta fraction) were tested in the E-Screen bioassay in order to determine the combined estrogenic effect. The first step was to define the dose-proliferative response curve for estradiol in MCF-7 cells as a reference curve. At concentrations below 1 pM estradiol, equivalent to 1 fmol in 1 ml of culture medium, mean cell numbers did not significantly differ from those in the steroid-free control. Therefore, 1 fmol estradiol/well was determined as the lowest detectable amount of estrogen in this assay. The proliferative effect of individual fractions was obtained at dilutions from 1:1 to 1:10 and converted to estradiol equivalents (Eq) units by interpolation from the estradiol dose-response curve. The mean percentage of lipid content in the placenta samples included in this study was $2.7 \pm 1.7\%$.

6.3.6.1. Levels of total effective xenoestrogen burden of alpha in placenta

Table 28 shows the mean Eq values for these HPLC eluates in all studied samples. 71.4% of alpha fractions were positive in the E-screen assay, with a mean value of 3.84 ± 9.73 Eq pM/g placenta (177.7 ± 398.60 Eq pM/g lipid).

Table 28. Estimated values of total effective xenoestrogen burden (TEXB) of alpha fraction in placenta tissues in study group

TEXB-Alpha fraction						
	Frequency(\geq LQ)		Mean	SD [#]	Median	Maximum
	N	%				
	220	71.4				
Eq*pM/mL			6.18	13.41	0.80	91.63
Eq*pM/g plac.			3.84	9.73	0.47	111.50
Eq*pM/g lipid			177.07	398.60	17.73	3041.69

TEXB=Total effective xenoestrogen burden.*Eq= estradiol equivalents. [#]SD = Standard Deviation

6.3.6.2. Levels of total effective xenoestrogen burden of beta in placenta

Table 29 shows the mean Eeq values for beta HPLC eluates in all studied samples. 84.7% of the beta fractions showed measurable estrogenicity activity in the E-screen assay, with a mean value of 22.82 ± 64.48 Eeq pM/g placenta, equivalent to 1190.97 ± 2603.31 Eeq pM/g lipid.

Table 29. Estimated values of total effective xenoestrogen burden (TEXB) of beta fraction in placenta tissues in study group

TEXB-beta fraction						
	Frequency(\geq LQ)		Mean	SD [#]	Median	Maximum
	N	%				
	260	84.7				
Eeq*pM/mL			35.56	70.43	5.08	353.30
Eeq*pM/g plac.			22.82	64.48	3.02	912.41
Eeq*pM/g lipid			1190.97	2603.31	107.38	17588.62

TEXB=Total effective xenoestrogen burden. *Eeq= estradiol equivalents. [#]SD = Standard Deviation.

6.3.7. ASSESSMENT OF THE ASSOCIATION BETWEEN MATERNAL AND PREGNANCY VARIABLES AND THE TOTAL EFFECTIVE XENOESTROGEN BURDEN

6.3.7.1. Association between population characteristics and TEXB-alpha exposure

Major predictors of TEXB-alpha fraction were maternal age, body mass index before pregnancy, parity, birth weight, birth weight related to gestational age, type of delivery and season of birth. Regarding maternal variables, there was a significant association between higher TEXB of alpha and older women, multiparous women, and higher number of pregnancies (Tables 30 and 31) and

an association close to significance between presence of TEXB alpha in placental tissue and women with BMI < 25 Kg/m² (68% of women with BMI<25Kg/m² and 79% of women with BMI≥25Kg/m² had this compound in the placental tissue) (See section 4.5.1.2 of the thesis). Moreover, higher levels of TEXB of alpha were associated with heavier birth weight, since babies with birth weight ≥2500g had higher levels of TEXB-alpha (See section 4.5.3.1 of the thesis), babies who were born in autumn (See section 4.5.3.6 of the thesis) and TEXB-alpha levels were higher in babies who were normal for gestational age (Table 31) and babies who were born spontaneously (See section 4.5.3.4 of the thesis).

Table 30. Association between characteristics of the study population and TEXB-alpha (Eeq pM/g placenta and Eeq pM/g lipid)(Spearman test)

	TEXB-alpha fraction			
	Eeq [#] pM/g placenta		Eeq [#] pM/g lipid	
	ρ	P	ρ	P
Maternal variables				
Age(years)	0.124	0.033*	0.137	0.018*
BMI[#](kg/m²)	0.009	0.878	0.047	0.422
Maternal weight gain(Kg)	-0.006	0.920	-0.002	0.974
Number of pregnancies^{&}	0.138	0.018*	0.118	0.043*
Newborn variables				
Birth weight(g)	0.021	0.722	0.042	0.479
Ponderal Index(g/cm³)	-0.034	0.709	-0.029	0.750
Head circumference (cm)	0.127	0.192	0.149	0.123
Gestational age(weeks)	-0.087	0.153	-0.057	0.352

TEXB=Total effective xenoestrogen burden. Significant differences (p≤0.01**;p≤0.05*). Close to significance (p≤0.1⁺).[#]BMI=Body mass index before pregnancy. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study.

Table 31. Association between characteristics of the study population and TEXB-alpha (Eeq pM/g placenta and Eeq pM/g lipid) (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test)

Variables	TEXB-alpha fraction			
	Eeq [#] pM/g placenta		Eeq [#] pM/g lipid	
Mothers	Mean	P	Mean	P
Residence				
-Rural	4.11	0.940	175.39	0.905
-Urban	4.46		185.51	
Educational level				
-Illiterate/Primary education	3.65	0.825	151.83	0.631
-Secondary education	5.57		205.43	
-Higher education	3.82		205.43	
Employment				
-Housework	4.74	0.654	162.97	0.889
-Agriculture	4.64		178.05	
-Other	3.91		177.36	
Prenatal smoking				
-Non-smoker	4.19	0.480	134.55	0.724
-Smoker	4.31		168.82	
Parity				
-Primiparous	2.54	0.007**	124.14	0.019*
-Multiparous	5.76		226.44	
Newborns				
Type of birth				
-Spontaneous	4.94	0.032*	210.46	0.011*
-Caesarean	2.35		61.26	
-Instrumental	2.62		126.05	
SGA^{&}				
-Yes	1.09	0.212	38.03	0.086⁺
-No	4.42		186.00	

Significant differences ($p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.05^*$). Close to significance ($p \leq 0.1^+$). [&]Small for gestational age.

6.3.7.2. Association between population characteristics and TEXB-beta exposure

Major predictors of TEXB-beta fraction were maternal age, body mass index before pregnancy, residence, educational level, employment, parity, ponderal index, head circumference, season of birth and gestational age. Higher mean levels and presence/absence of TEXB-beta in placenta were significantly associated with age (higher levels and frequency in mothers with >32 years) (See section 4.5.1.1 of the thesis), parity (higher levels and frequency in multiparous mothers) (See section 4.5.1.7 of the thesis and Table 33), employment (100%, 89.37% and 81.25% of agricultural workers, housewives and workers in other activities had this compound in placenta, respectively) (See section 4.5.1.6 of the thesis). There was also a close-to-significant relationship between the residence and presence/absence of TEXB of beta (higher frequency of this compound in mothers who lived in a rural area) (See section 4.5.1.4 of the thesis) and educational level (higher levels in mothers with secondary education (Table 33). When the influence of pairs of variables on the TEXB-beta were studied, the group of agricultural workers and chemical-exposed women and younger mothers with BMI \geq 25 Kg/m² had higher concentrations of this compound in their placental tissue (See 4.6.1.1 and 4.6.1.13 sections in the thesis).

With regard to newborn variables, a positive significant association was found between TEXB-beta and PI, with higher levels in newborns with higher PI, and higher levels showed a relationship that was close to significance with larger head circumference and gestational age. Higher TEXB-beta frequency was found in placenta of mothers who gave birth in the spring, followed by the winter, and mean levels were higher in babies who were born in winter.

Finally, the Spearman's correlation coefficients established a strong association between TEXB-alpha and TEXB-beta levels, either expressed as Eeq pM/g of placenta or Eeq pM/g of lipid ($\rho=0.340$, $p<0.001$; $\rho=0.325$, $p<0.001$, respectively) (See section 4.4.3.1 of the thesis).

Table 32. Association between characteristics of the study population and TEXB-beta (Eeq pM/g placenta and Eeq pM/g lipid) (Spearman test)

	TEXB-beta fraction			
	Eeq [#] pM/g placenta		Eeq [#] pM/g lipid	
	P	P	ρ	P
Maternal variables				
Age(years)	0.048	0.410	0.065	0.264
BMI [#] (kg/m ²)	-0.039	0.503	-0.016	0.778
Maternal weight gain(Kg)	-0.050	0.392	-0.039	0.511
Number of pregnancies ^{&}	0.072	0.222	0.051	0.387
Newborn variables				
Birth weight(g)	-0.007	0.913	0.004	0.948
Ponderal Index(g/cm ³)	-0.022	0.807	0.016	0.861
Head circumference (cm)	0.045	0.643	0.037	0.845
Gestational age(weeks)	0.006	0.925	0.025	0.676

TEXB=Total effective xenoestrogen burden. Significant differences (p<0.01**;p<0.05*). Close to significance (p<0.1⁺).[#]BMI=Body mass index before pregnancy. [&] Number of pregnancies= including the newborn in the present study.

Table 33. Association between characteristics of the study population and TEXB-beta (Eeq pM/g placenta and Eeq pM/g lipid) in placental tissue (the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test)

Variables	TEXB-Beta fraction			
	Eeq [#] pM/g placenta		Eeq [#] pM/g lipid	
Mothers	Mean	P	Mean	P
Residence				
-Rural	12.75	0.583	925.08	0.758
-Urban	26.44		1240.63	
Educational level				
-Illiterate/Primary education	14.66	0.389	828.79	0.068⁺
-Secondary education	34.45		1533.90	
-Higher education	18.33		1183.06	
Employment				
-Housework	30.66	0.472	1285.42	0.487
-Agriculture	13.63		1545.70	
-Other	16.81		993.33	
Prenatal smoking				
-Non-smoker	22.13	0.517	1459.89	0.643
-Smoker	20.01		957.13	
Parity				
-Primiparous	17.19	0.090⁺	1012.73	0.205
-Multiparous	23.63		1085.57	
Newborns				
Type of birth				
-Spontaneous	23.29	0.686	1286.01	0.350
-Caesarean	14.94		472.47	
-Instrumental	13.77		773.48	
SGA^{&}				
-Yes	13.41	0.752	696.41	0.753
-No	23.67		1158.26	

Significant differences (p<0.01**; p<0.05*). Close to significance (p<0.1). [#]BMI= Body mass index before pregnancy. [&]Small for gestational age.

6.3.8. COMPARISON OF TWO METHODS FOR THE ASSESSMENT OF THE TOTAL EFFECTIVE XENOESTROGEN BURDEN IN PLACENTAS

Forty placentas were randomly selected for the present study from the cohort (N=308).

6.3.8.1. Characteristics of the population

I.- Characteristics of newborns in the study group

Characteristics of newborns in the present study are summarised in Table 34. At delivery, mean birth weight was 3420.26 g; around 68% of babies had a gestational age higher than 39 weeks and 77.5% of births were spontaneous.

Table 34. *Characteristics of newborns*

Variables	Frequency N (%)	Mean (\pm SD*)	Median	Range
Birth weight (g)		3420.26 \pm 429.79	3455.00	2390-4310
Ponderal Index (g/cm ³)		28.02 \pm 7.77	26.09	20.62-54.84
Gestational age (weeks)				
32-37 weeks	2(5.0)			
37-39 weeks	11(27.5)			
>39 weeks	27(67.5)			
Type of birth				
Spontaneous	31(77.5)			
Caesarean	2(5.0)			
Instrumental	7(17.5)			

SD*= Standard Deviation.

II.- Characteristics of mothers in the study group

Characteristics of mothers who participated in the present study (n=40) are summarised in Table 35. The age range was between 18 to 39 years and maternal weight gain during pregnancy was 12.86 Kg. Almost half of mothers lived in rural areas (<10 000 inhabitants) but only 7.5% of women declared working in agriculture. Sixty percent were multiparous.

Table 34. *Characteristics of mothers*

Variables	Frequency N (%)	Mean (\pm SD*)	Median	Range
Age (years)		29.66 \pm 4.95	28.00	18-39
BMI [#] (kg/m ²)		22.37 \pm 3.45	21.66	17.72-36.85
Change of weight (Kg)		12.86 \pm 6.20	12.00	3.00-34.00
Pregnancy				
Primiparous	16(40)			
Multiparous	24(60)			
Residence[§]				
Rural	19(47.5)			
Urban	21(52.5)			
Educational level				
Primary education	15(37.5)			
Secondary education	17(42.5)			
Higher education	8 (20.0)			
Employment				
Homework	9(22.5)			
Agriculture	3(7.5)			
Others	28(70)			

SD*= Standard Deviation. BMI[#]=Body mass index at the beginning of pregnancy

[§]Residence=rural<10,000 inhabitants or urban \geq 10,000 inhabitants.

III.- Characteristics of fathers in the study group

With regard to fathers' characteristics (Table 35), the mean age was 32 yrs. Only 7.5% of them reported working in agriculture and around half of the fathers (43.6%) had only completed primary schooling.

Table 35. *Characteristics of fathers*

Variables	Frequency N (%)	Mean (\pmSD*)	Median	Range
Age (years)		32.44 \pm 4.08	33.00	24.00-43.00
Educational level				
Primary education	18(43.6)			
Secondary education	11(28.2)			
Higher education	11(28.2)			
Employment				
Agriculture	3(7.5)			
Others	37(92.5)			

SD*= Standard Deviation.

6.3.8.2. Statistical analysis

After preparative fractionation (See material and methods), alpha and beta fractions were split in two equal parts, one part for the E-Screen assay and the other for the yeast oestrogen screen (YES).

The E-Screen assay was developed at the Medical Research Laboratory School of Medicine, University of Granada, and the YES at the Centre for Toxicology, School of Pharmacy, University of London.

Both alpha and beta HPLC-fractions were tested in the E-Screen and YES bioassay in order to determine the TEXB. The first step towards this end was to define the dose-proliferative response curve for estradiol in MCF-7 cells and yeast, as a reference curve. The proliferative effects obtained with dilutions of alpha and beta fractions in both assays were converted to estradiol equivalents

(Eeq) by interpolation on the estradiol dose-response curve. Table 36 and 37 list the mean, median, standard deviations (SDs), minimum, maximum and frequencies Eeq values for alpha and beta fractions in all the 40 samples tested in the E-Screen and YES assays. Estimated TEXTB values are expressed in estradiol equivalents pM/mL, estradiol equivalents pM/g of placenta and estradiol equivalents pM/g of lipid. The mean percentage of lipid content in the placenta samples included in this study was $3.00 \pm 1.64\%$. Around 28.3% of the tested samples showed a higher PE at 1:5 dilution than at the initial 1:1 dilution, suggesting a partial toxic effect on MCF-7 cells of the HPLC extracts that disappeared after dilution. Toxicity in the extracts was demonstrated when a partial agonist effect was shown in the presence of 100 pM of estradiol (data not shown). In the YES assay, around 22.5% of the tested samples showed toxicity when aliquots of 400 μ L of samples were transferred to the assay medium containing yeast (data not shown).

I.- Results of the statistical analysis for the total effective xenoestrogen burden (TEXTB) of alpha fraction in E-Screen and YES assay

In the E-Screen bioassay, 62.5% of the placenta extracts showed a measurable estrogenicity in the alpha fraction with a mean value of 7.18 ± 11.37 Eeq pM/g placenta corresponding to 310.67 ± 559.72 Eeq pM/g lipid. A smaller number of placentas extracts (20/40) were estrogenic in the YES assay, with a mean value of 6.63 ± 11.04 Eeq pM/g placenta, corresponding to 292.29 ± 446.01 Eeq pM/g lipid (Table 36).

Table 36. Estimated values of total effective xenoestrogen burden (TEXB) of alpha fraction in placenta tissues in E-Screen and YES assays

	TEXB-Alpha fraction							
	Frequency(\geq LOQ)		Eeq pM/mL		Eeq pM/g plac.		Eeq pM/g lip.	
	N(%)		E-Screen	YES	E-Screen	YES	E-Screen	YES
	25(62.5)	20(50)						
Mean			12.52	11.61	7.18	6.63	310.67	292.29
SD			19.89	19.35	11.37	11.04	559.72	546.01
Median			3.25	1.24	1.85	0.77	47.48	31.16
Maximum			83.25	94.25	46.31	54.20	2286.48	2645.89

TEXB=Total effective xenoestrogen burden. LOQ=Limits of quantification. *Eeq= estradiol equivalents. *SD= Standard Deviation

II.- Results of the statistical analysis for the total effective xenoestrogen burden (TEXB) of beta fraction in E-Screen and YES assay

In addition, the frequency of samples with a measurable estrogenicity in the beta-fraction in the E-Screen was also higher (87.2%) than in the YES (72.5%), with a mean value of 30.55 ± 51.27 pM Eeq/g placenta (1258.78 ± 2222.98 pM Eeq/g lipid) and a mean value of 54.86 ± 55.06 Eeq pM/g placenta (2365.02 ± 3117.88 Eeq pM/g lipid), respectively (Table 37).

Table 37. Estimated values of total effective xenoestrogen burden (TEXB) of beta fraction in placenta tissues in E-Screen and YES assays

TEXB-beta								
	Frequency(\geq LOQ)		Eeq pM/mL		Eeq pM/g plac.		Eeq pM/g lip.	
	N(%)		E-Screen	YES	E-Screen	YES	E-Screen	YES
	35(87.5)	29(72.5)						
Mean			53.33	95.76	30.55	54.86	1258.78	2365.02
SD			89.66	96.68	51.27	55.06	2222.93	3117.88
Median			20.63	81.23	11.86	46.69	482.11	148.22
Maximum			350.00	390.37	199.74	222.53	11452.60	13129.42

TEXB=Total effective xenoestrogen burden. LOQ=Limits of quantification.*Eeq=estradiol equivalents .#SD=Standard Deviation.

III.- Correlation between the total effective xenoestrogen burden (TEXB) of alpha and beta fraction in E-Screen and YES.

The Spearman's correlation coefficients (Tables 38 and 39) showed a significant association between TEXB of the alpha and beta fractions in the E-Screen either expressed as Eeq pM per mL ($\rho=0.428$, $p=0.006$), Eeq pM per g of placenta ($\rho=0.424$, $p=0.006$), or Eeq pM/g of lipid ($\rho=0.458$, $p=0.003$). A significant association was also found between TEXB of the alpha and beta fractions in the YES, either expressed as Eeq pM per mL ($\rho=0.324$, $p=0.041$), Eeq pM per g of placenta ($\rho=0.315$, $p=0.048$), or Eeq pM/g of lipid ($\rho=0.448$, $p=0.004$).

Table 38. Correlation between *TEXB* of alpha fraction in *E-Screen* and *YES*

TEXB beta		TEXB alpha	
E-Screen	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL	0.006**	0.005**	0.014*
Eeq(pM)/g plac.	0.007**	0.006**	0.018*
Eeq(pM)/g lipid	0.002**	0.002**	0.003**

TEXB= Total effective xenoestrogen burden.

Table 39. Correlation between *TEXB* of beta fraction in *E-Screen* and *YES*

TEXB beta		TEXB alfa	
YES	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid.
Eeq(pM)/mL	0.041*	0.043*	0.17*
Eeq(pM)/g plac.	0.048*	0.048*	0.022*
Eeq(pM)/g lipid	0.024*	0.025*	0.004**

TEXB= Total effective xenoestrogen burden.

IV.- Association between the presence/absence of estrogenicity in the two assays: Chi Square test

When the *TEXB* of alpha was stratified above and below the limit of quantification [LOQ]), there was no significant difference between the two assays according to the Chi-Square test (Table 40).

Although the frequency of positivity in alpha and beta fractions was higher in *E-Screen* assay than in *YES*, there were 7 alpha and 3 beta fractions that were positive in the *YES* assay and negative in the *E-Screen*. On the other hand, there were 12 alpha and 9 beta fractions that were positive in *E-Screen* and negative in *YES* (Table 41).

Table 40. The relationship between the values of TEXB for the alpha and beta fractions in the E-Screen and in the YES assays by using the Chi-Square test

		TEXB-alpha YES			
		Yes	No	χ^2	p
TEXB-alpha E-Screen	Yes	13	12	0.107	0.744
	No	7	8		
$\rho=0.052$					
		TEXB- beta YES			
		Yes	No	χ^2	p
TEXB-beta E-Screen	Yes	26	9	0.420	0.517
	No	3	2		
$\rho=0.106$					

TEXB= total effective xenoestrogen burden.

V.- Association between the levels of estrogenicity in the two assays: Mann-Whitney and Spearman tests

The relationship between the values of TEXB for the alpha and beta fractions in the E-Screen and in the YES assays was investigated with Spearman correlation coefficient and Mann Witney test. In the case of the alpha fraction, using the Spearman test, there were no significant differences in values of estrogenicity of alpha fraction between E-Screen and YES, either expressed as Eeq pM/mL, Eeq pM/ placenta, or Eeq pM/g of lipid (Table 41). The Mann Whitney test also found no significant differences between the values of estrogenicity obtained in the two assays, expressed as Eeq pM/mL, Eeq pM/g placenta, or Eeq pM/g lipid (Table 42).

In the case of the beta fraction, there were no significant differences in values of estrogenicity of the beta fraction between E-Screen and YES with the Spearman test (Table 41), expressed as Eeq pM/mL, Eeq pM/g of placenta or Eeq pM/g of lipid. There was a very weak association using the Mann Whitney test when the values of estrogenicity were expressed as Eeq pM/mL or Eeq pM/g

placenta but no association when the results were expressed as Eeq pM/g lipid (Table 42).

Table 41. *The relationship between the values of TEXB for the alpha and beta fractions in the E-Screen and in the YES assays by using the Spearman correlation test*

TEXB-alpha E-Screen	TEXB-alpha YES		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid
	p	P	P
Eeq(pM)/mL	0.849	0.809	0.949
Eeq(pM)/g plac.	0.864	0.822	0.966
Eeq(pM)/g lipid	0.861	0.825	0.917
TEXB-beta E-Screen	TEXB-beta YES		
	Eeq(pM)/mL	Eeq(pM)/g plac.	Eeq(pM)/g lipid
	p	P	P
Eeq(pM)/mL	0.774	0.812	0.865
Eeq(pM)/g plac.	0.730	0.771	0.901
Eeq(pM)/g lipid	0.812	0.822	0.445

TEXB=Total effective xenoestrogen burden.

Table 43. The relationship between the values of *TEXB* for the alpha and beta fractions in the *E-Screen* and in the *YES* assays by using the Mann-Whitney test

TEXB	U of Mann-Whitney	Mean±SD		p
		E-Screen	Yes	
Alfa:				
- Eeq(pM)/mL	736.000	12.52±19.89	11.61±19.35	0.520
- Eeq(pM)/gpla	739.000	7.18±11.37	6.63±11.04	0.540
- Eeq(pM)/glip	738.000	310.67±559.72	292.29±546.01	0.533
Beta:				
- Eeq(pM)/mL	596.500	53.33±89.66	95.76±96.68	0.049
- Eeq(pM)/gpla	594.500	30.55±51.27	54.86±55.06	0.047
- Eeq(pM)/glip	635.500	1258.78±2222.93	2365.02±3117.88	0.112

TEXB= total effective xenoestrogen burden.

6.4. DISCUSSION

Although the transfer of DDT to the foetus was first reported in 1949 (Finnegan et al., 1949), there has been limited published research into the presence of OC pesticides in the placenta. In the few studies conducted over the past three decades in India (Saxena et al., 1980; Saxena et al., 1981a; Saxena et al., 1981b; Siddiqui & Saxena, 1985; Siddiqui et al., 2003), Middle East (Polishuk et al., 1977), Europe (Eckenhansen et al., 1981; Hura et al., 1999; Reichrtova et al., 1999; Falcon et al., 2004; Cerrillo et al., 2005a) and the USA (O'Leary et al., 1970b; Cooper et al., 2001), this presence is generally reported by weight or lipid content. Both forms of expression are reported in the present work in order to facilitate comparisons with a wider range of published studies. Falcon reported DDT and HCB concentrations per g of tissue, arguing that the OC retention capacity differs between placenta lipids and the fat of other tissues. Hamel et al. (Hamel et al., 2003) also decided not to report the concentration of OC in terms of

lipid content, citing the effects of the highly disrupted lipid metabolism during pregnancy on the lipid content of the placenta. However, Shen et al. (Shen et al., 2005) supported the expression of concentrations in placenta on a lipid basis in order to allow comparisons with other tissues.

In our view, caution must be taken in comparing concentrations of lipophilic chemicals in adipose tissue with data derived from lipid-adjusted concentrations in blood/serum or placenta. Among other pitfalls, the distribution of p,p'DDE and p,p'DDT, which have distinct fat solubility, differs between fat and serum.

Residues of one or more OC pesticides were detected in all of the placenta samples from this population of 308 mothers living in Southern Spain, with a mean of eight pesticides per placenta (range 1-15 pesticides). The order of frequency of the pesticides identified in more than half of samples was p,p'DDE >lindane >endosulphan-diol >endosulphan-I >o,p'DDT >endosulphan-sulphate >endosulphan-ether. A larger number of OC pesticide residues in placenta was significantly associated with lower maternal gain weight, women who worked in agriculture and women reporting exposure to chemicals during pregnancy. Previous studies confirmed the higher exposure to OC compounds in agricultural workers (Schwartz et al., 1986; Fenske et al., 2000; Cooper et al., 2001).

In a previous study, our group investigated the presence of multiple OC residues in 150 placental tissues from the same region as that in the present study. We reported a statistically significant association between lower birth weight and a larger number of OC pesticides in placenta, confirming previous observations of an association between persistent organochlorine chemicals and reduced weight and length of newborns (Karmaus & Wolf, 1995; Schade & Heinzow, 1998; Ribas-Fito et al., 2002; Siddiqui et al., 2003; Weisskopf et al., 2005). Although this association was not statistically significant in the present study, a larger number of OC pesticide residues was found in babies with lower birth weight. Finally, a larger number of pesticides per placenta was also significantly associated with mothers who gave birth during the spring.

Among p,p'DDT, isomers and metabolites, p,p'DDE showed both the highest mean concentration (2.79 ng/g of placenta [corresponding to 92.29 ng/g of lipid]) and highest frequency (92.7% of samples). p,p'DDT, the parent

compound, which was detected in 46% of placentas, showed a mean concentration of 0.77 ng/g of placenta (27.16 ng/g of lipid). These findings and the total DDT figures (5.54 ± 5.68 ng/g placenta) are far below the mean values reported by Falcon et al., (2004) in placental tissue of women in a neighbouring region of Southeast Spain. In their series, recruited from 1998 to 2000, they found a mean total DDT value of 49.4 ± 73.6 ng/g of tissue, similar to findings in placenta by Hura et al. (1999) in a Rumanian population in 1996-1997. The present p,p'DDE results are similar to those recently reported in Finland by Shen et al. (2005) in placentas collected from 1997 to 2001, which all contained p,p'DDE at a geometric mean concentration of 21.94 ± 5.25 ng/g of lipid. They are also very similar to findings recently reported by our group (Lopez-Espinosa et al., 2006a) in 150 human placentas. Thus, p,p'DDE was detected in 96% of placental tissue and showed a mean concentration of 2.37 ng/g of placenta (corresponding to 76.62 ng/g of lipid).

Several researchers (Ahlborg et al., 1995; Doong et al., 1999), have reported the importance of the DDE/DDT ratio, since higher values indicate an less recent exposure to the pesticide. A higher ratio means a metabolization of DDT in the environment and organism.

Interestingly, the estimated p,p'DDE/p,p'DDT ratio for placentas was 3.32. In the Canary Islands (Zumbado et al., 2005), DDE/DDT ratios were estimated for lipid-adjusted concentrations in serum and a mean value of 1.02 was found, with very large variations between the different islands. Moreover, in serum of young men from the same geographical area as the present study (mean age of 21 yrs), the p,p'DDE/p,p'DDT ratio was 1.51 (Carreño, 2005). This observation was in part explained by the possibility of contemporary exposure to a source of DDT (Zumbado et al., 2005). However, when the whole group of mothers with p,p'DDE in placental tissue was considered and a p,p'DDT value was assigned, the ratio was 8.85, more similar to other European populations. In the study of Carreño (2005) the ratio after the same calculation had a value of 10.5.

The presence of p,p'DDT in the placenta of young women reported in the present study and in several articles over the past decade (Reichrtova et al., 1999; Falcon et al., 2004; Shen et al., 2005; Lopez-Espinosa et al., 2006a) can

only be explained by current exposure to this pesticide. It has been reported that current exposure to DDT is possible because of its illegal use in agriculture or by its arrival in our environment and food from countries where it is still used (Porta et al., 2002). Furthermore, DDT is used in the production of dicofol (Van de Plassche et al., 2003), a pesticide that is only manufactured in five countries, Spain, Brazil, India and Israel.

In this regard, some studies have reported the possible use of DDT in Spain. First, Espigares et al., (1997) indicated current exposure to DDT beside the River Guadalquivir (South of Spain). Second, the Spanish *Centro Superior de Investigacion Cientifico* reported in 2001 the presence of DDT in soil, air and food in Huelva, a city in the South of Spain. Third, Fernández et al., (2000) found DDT in a park in Madrid. Fourth, dicofol was recently reported to be of the most commonly found pesticides in Spanish vegetables and fruits (Commission of the European Communities. Commission Staff Working Document, 2005). Finally, DDT and DDE were detected in fish and water in a river next to the only dicofol manufacturing facility in Spain (INTERLAB para la Confederación Hidrográfica del Ebro, 1999).

In the present study, an association was found between older women and higher levels of p,p'-DDT. This association was also found in blood of young men in the same area (Carreño, 2005), in the human milk of mothers in a neighbouring region (Martínez et al., 1993) and in blood of mothers in India (Saxena et al., 1981a). Moreover, higher levels of DDE were found in umbilical cord samples from older women (Rhainds et al., 1999; Covaci et al., 2002). However, some studies did not find this association (Krauthacker et al., 1980; Sarcinelli et al., 2003). We also that higher levels of p,p'-DDT and p,p'-DDE were associated with lower and higher BMI, respectively. In this regard, Cerrillo et al. (2005b) investigated the presence of multiple OC residues in adipose tissues in a sample of 458 women from the same region as those in the present study. They reported that all of these women (mean age of 56 ± 0.46 yrs) were positive for one or more OC pesticide residues, suggesting a frequent and widespread exposure to OCs in Southern Spain. Some associations reported by Cerillo et al. (2005b) remain valid for the present results in the same setting, despite the difference in age of the

series. Thus, the relationship they found in women between higher BMI and higher p,p'-DDE concentrations is reflected in the present study. However, study of the influence of pairs of variables on the p,p'-DDE exposure showed that age and BMI were main predictors of p,p'-DDE levels, with higher levels in the group of younger mothers with lower BMI. The present study also found that between higher p,p'-DDT concentrations and more frequent presence of Σ DDTs in placenta were associated with lower maternal weight gain. Mothers with only primary education or less had higher levels of p,p'-DDT. Moreover, o,p'-DDD concentrations were close to a statistically significant association with educational level, with higher levels in mothers with secondary education. Lower educational levels and higher levels of DDT and isomers/metabolites were also reported by Cerrillo et al., (2003) and Araque et al., (2005). Rural residence showed a close-to-significant association with higher frequency of o,p'-DDD in placental tissue, although mean levels were higher in mothers who lived in an urban area. Higher levels of Σ DDTs were also found in mothers who lived in an urban area. Reichtrova et al. (1999) also found higher levels of DDT and DDE in placental samples from an urban area than from a rural area. Finally, there was an association close to significance between levels of Σ DDTs and parity, with higher levels in primiparous mothers and lower levels in mothers with more previous pregnancies, confirming previous results obtained in women from the same region (mean age 61 yrs) (Araque, 2005). Araque found higher levels of Σ DDTs in fat tissue and blood of women without previous pregnancies. Previous studies have demonstrated higher exposure to contaminants in breastfeeding babies (Longnecker & Rogan, 2001) and lower concentrations in breastfeeding mothers (Lopez-Carrillo et al., 2001), with higher levels of OCs pesticides in primiparous than in multiparous mothers (Skaare & Polder, 1990; Nair et al., 1996). A higher number of previous pregnancies has also been associated with lower exposure in the last newborn (Karmaus et al., 2001). However, the cleaning mechanism of bioaccumulated xenobiotics by pregnancies and lactation has not been shown in all studies (Eckenhansen et al., 1981; Martínez et al., 1993).

With regard to newborn variables, an association that was close to significance was observed between higher levels of p,p'-DDT and o,p'-DDT in

newborns with a normal weight for their gestational age and larger head circumferences, respectively. A significant relationship was also found between higher frequency of o,p'-DDT and babies with higher or normal birth weight for their gestational age. In this regard, Longnecker et al., (2001) were not able to find an association between levels of DDE and small birth weight for gestational age. However, higher p,p'-DDE concentrations were significantly associated with lower birth weight in the present study. Several authors have reported an association between intrauterine exposure to DDT (O'Leary et al., 1970a) or DDE (Longnecker et al., 2001; Weisskopf et al., 2005) and lower birth weight, although some groups were not able to show this association (Rogan et al., 1986; Rhoads et al., 1999). Finally, frequency of o,p'-DDD was slightly higher in babies with a lower PI.

Spain is the main consumer of endosulphans in the European Union (Endosulfan Preliminary Dossier, 2003), and endosulphan isomers and metabolites were found in more than 95% of the present series of placentas. As expected, the most frequently detected metabolites were endosulphan-diol and endosulphan-ether (62 and 50.3%), since there is a greater frequency of the more hydrophilic metabolites in serum and urine (Botella et al., 2004). The most abundant commercial endosulphan in the present series was endosulphan-I, which can in part derive from partial metabolism of its congener endosulphan-II (Doong et al., 1999). Shen et al., (2005) detected endosulphan-I and -II in 100 and 50% of the placentas, respectively, higher frequencies than in the present series (54.2% and 3.8% respectively). Cerrillo et al. and Lopez-Espinosa et al. reported similar data on abundance of endosulphan residues in this region of Spain (Cerrillo et al., 2005a; Lopez-Espinosa et al., 2006). Interestingly, the endosulphan concentrations found by Cerillo et al. (Cerrillo et al., 2005b) in adipose tissue of adult women were higher in those who had breastfed their children, challenging the theory that breastfeeding is a main detoxification route.

In the present study, a close-to-significant association was found between higher concentrations of endosulphan-I in women who worked in activities not related to agriculture or housework. When pairs of variables were studied, the group of primiparous women with higher gain weight and the group of

primiparous women who lived in an urban area had the highest levels of endosulphan-I in placental tissue. There was also a significant association between higher endosulphan-II concentrations in placental tissue and lower maternal age and weight gain. Moreover, when pairs of variables were studied, the group of primiparous mothers with higher weight gain had higher levels of this compound. The frequency of this chemical was higher in mothers with lower educational level. There was also an association between higher concentrations and frequency of endosulphan-ether in women who smoked during pregnancy and who were exposed to chemicals during pregnancy. This association between level of endosulphan-ether and smoking was already reported by Carreño (2005) in serum of men from the same region. When pairs of variables were studied, the group of younger women with higher weight gain, and primiparous women living in a rural area had higher levels of this compound in placental tissue. With regard to endosulphan-lactone, higher levels were found in women who lived in an urban area. Moreover, when pairs of variables were studied, women who did not work in agriculture and were exposed to chemicals had higher levels of this pesticide in placenta. A larger amount of endosulphan-diol was close-to-significantly associated with higher BMI and older age. Higher BMI and prenatal smoking were significantly associated with higher concentrations of this compound when pairs of variables were studied. Lopez-Espinosa et al. (2006a) also reported an association between higher BMI and a larger amount of endosulphan-diol in placental tissue. There was a significant association between higher levels of endosulphan-sulphate and younger age, and a close-to-significant relationship with higher BMI and lower weight gain. The positive association between higher levels of this compound and higher BMI in men was also reported by Carreño (2005). We found that more than 50% of smokers had this compound in the placenta. When pairs of variables were studied, older women with higher weight gain had higher levels of this compound. Finally, higher levels of Σ endosulphans were associated with higher BMI, secondary schooling, reported exposure to chemicals and smoking. The positive association between a larger amount of Σ endosulphans and higher BMI was also reported by Lopez-Espinosa et al. (2006a).

With regard to newborn variables, an association that was close to significance was found between higher endosulphan-I levels and lower PI. Moreover, greater endosulphan-ether concentrations were associated with higher birth weight and PI and showed close-to-significant relationship with smaller head circumference. A larger amount of endosulphan-lactone was also significantly related to lower PI, smaller head circumference and normal birth weight for gestational age. Regarding endosulphan-diol, higher levels were found in babies with higher birth weight, larger head circumference and greater gestational age. These associations have also been reported by our group (Lopez-Espinosa et al., 2006a). Higher levels of endosulphan-sulphate were also found in babies with smaller head circumference. Finally, there was an association that was close to significance between higher endosulphan or some of its metabolites and lower birth weight.

With respect to the aldrin group, the order of their frequency was endrin > aldrin > dieldrin. All of them were present in less than 50% of placentas. Endrin was the most frequently detected (34.1% of samples) and showed the highest concentration (1.01 ± 1.98 ng/g placenta or 22.93 ± 66.70 ng/g lipid). This distribution may reflect the young mean age (34 yrs) of our mothers, since Cerrillo et al. found that endrin was more frequently present in younger participants (Cerrillo et al., 2005b). Shen et al. (2005) reported a higher frequency of dieldrin residues (100% of placentas) than in this study (20.2%), although they only observed aldrin in 4.5% of placentas versus the 27.8% that contained aldrin in the present study. Our group reported similar frequencies of aldrin, endrin and dieldrin in the study developed in the same area (26.49%, 34.11% and 22.51%, respectively) (Lopez-Espinosa et al., 2006a).

When pairs of variables were studied, the group of younger mothers with greater BMI, the group of younger and multiparous mothers, and the group of multiparous mothers with higher BMI had higher levels of aldrin. A significant relationship was found between presence of endrin in placental tissue and employment. Thus, the group of women who did not work in agriculture or at home had higher frequency of this compound, whereas a higher concentration was found in housewives. Moreover, a higher level and frequency of endrin were

found in women who reported no exposure to chemicals during pregnancy. Higher levels of endrin were also found in the group of mothers with lower BMI and in the group of women who lived in a rural area and gained less weight. With regard to dieldrin, mother with lower BMI had a higher frequency and concentration of dieldrin in placental tissue. When pairs of variables were studied, older primiparous mothers with higher BMI had higher levels of this compound. All of these findings support the theory of Jorgenson et al. (2001) that there is no occupational exposure to aldrin and dieldrin.

With regard to newborn variables, a higher dieldrin frequency was observed in placentas of mothers who gave birth to babies of greater gestational age or to babies with a normal weight for the gestational age.

Hexachlorobenzene was present in less than 50% of placentas (41.7%) and showed a concentration of 0.53 ± 1.16 ng/g of placenta (15.41 ± 46.46 ng/g of lipid). Lopez-Espinosa et al. (2006a) reported similar data for the frequency (43%) and abundance (0.50 ng/g of placenta or 15.71 ng/g of lipid) in women from the same region. There was a significant association between higher HCB levels and younger age of mothers.

Lindane was detected in 74.8% of the placenta samples, below the 100% described by Shen et al. (Shen et al., 2005) in Finnish mothers but much higher than the 24.5% reported by Falcon et al. (2004). As in the case of p,p'DDE, the mean concentration of lindane (0.39 ± 0.51 ng of lindane per g of placenta or 12.28 ± 31.87 ng of lindane per g of lipid) was considerably below the mean value of 8.33 ng/g of placenta reported by Falcon et al. (2004), higher than the $3.51 (+23.51)$ ng/g of lipid observed by Shen et al. in Finland and very similar to those reported by our group (Lopez-Espinosa et al., 2006a) in placentas from the same geographical area (0.38 ± 0.38 ng of lindane per g of placenta or 12.82 ± 23.95 ng of lindane per g of lipid).

In the present study, a significant relationship was found between higher levels of lindane in mothers and higher BMI, lower weight gain, reported chemical exposure, larger number of pregnancies and smoking. Some of these associations were already reported by our group in studies in the same region. Thus, Cerrillo et al., (2005b) reported higher levels of lindane in mothers with

more children, and Carreño (2005) reported higher concentrations of this pesticide in smokers. There was also an association between higher frequency of lindane in placental tissue and higher birth weight.

With regard to mirex, it was detected in less than 50% of placentas (24.8%) with a mean concentration of 0.31 ± 0.76 ng/g placenta (corresponding to 13.59 ± 64.15 ng/g lipid). Shen et al., (2005), reported a higher frequency of mirex in Finnish placentas (94%). In the present study, a relationship was found between higher levels of this compound and older age. However, when pairs of variables were studied, the group of younger women and smokers had higher levels of this compound. There was also an association that was close to significance between higher frequency of mirex and larger head circumference and lower birth weight for gestational age.

Finally, methoxychlor was present in less than 50% of placentas (30.5%) in the present study, a lower frequency than that reported by Shen et al., (2005) (42%). The higher frequency and concentrations of methoxychlor were related to mothers who lived in an urban area, had lower educational level and smoked. When pairs of variables were studied, multiparous mothers who lived in an urban area had higher levels of methoxychlor.

Three out of four extracts of the 308 placentas in this study were positive in the bioassay for estrogenicity, with a mean TEXB-alpha fraction value of 3.84 ± 9.73 Eeq pM/g of placenta. The estrogenicity of these extracts, which contain organohalogenated xenoestrogens and non-endogenous sex hormones (first 11 min of HPLC eluate) (Pazos et al., 1998; Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004), is considered a marker of the TEXB due to the combined effect of environmental estrogens (Sonnenschein et al., 1995; Ibarluzea et al., 2004; Fernández et al., 2004). In fact, residues of organochlorine pesticides were found in extracts from the present study and in series of placentas from the same geographical region (Cerrillo et al., 2005a; Lopez-Espinosa et al., 2006a), and in other Spanish (Falcon et al., 2004) and worldwide populations, although published data are not abundant (Eckenhansen et al., 1981; Siddiqui & Saxena, 1985; Hura et al., 1999; Reichrtova et al., 1999).

Concentrations of lipophilic xenobiotics are commonly expressed in terms of lipid content in order to compare concentrations from different sources (blood, adipose tissue, etc.). TEXB is expressed in this study as both Eeq per g of placenta and Eeq per g of lipid. The mean value of 177.07 ± 398.00 Eeq pM /g of lipid found was similar to mean values reported in adipose tissue of female residents in the same geographical area (Rivas et al., 2001; Fernández et al., 2004).

Individuals are simultaneously exposed to different organochlorine compounds, due to their bioaccumulation and persistence, and it is important to measure their combined effects (Karmaus, 2004). Different methodologies have been proposed to establish xenoestrogen interactions that derive from possible additive, synergistic, or antagonistic effects (Soto et al., 1997; Shekhar et al., 1997; Payne et al., 2000; Rajapakse et al., 2002; Silva et al., 2002) The TEXB estimated according to the present protocol represents the combined effects of chemical compounds present at variable concentrations, sometimes below proliferative effect threshold levels (Fernández et al., 2004). Additive, synergistic or antagonistic mechanisms may account for the final effect observed in the bioassay. This approach offers an opportunity to investigate exposure to xenoestrogens and may be more appropriate than the determination of individual chemicals in placenta samples.

Major predictors of TEXB-alpha fraction were maternal age, body mass index before pregnancy, parity, birth weight, birth weight related to gestational age and type of delivery.

A significant association was found between higher TEXB-alpha fraction and older women, multiparous mothers and those with more pregnancies, and a close-to significant association was observed between higher frequency of TEXB-alpha and lower maternal BMI. In a previous study, multiparity was also associated with higher levels of estrogenicity in the alpha fraction (Lopez-Espinosa et al., 2006b).

In the present study, a significant association was also observed between higher TEXB and higher newborn birth weight, indicating a relationship between xenoestrogen exposure and foetal growth. This association was also found in a

previous report on placentas from the same region (Lopez-Espinosa et al., 2006b). Newborns of normal weight for their gestational age more frequently showed TEXB-alpha in placenta and the mean levels were also higher in this group. Birth weight has been proposed as a proxy measure for intrauterine estrogen exposure, and Kaijser et al. (2000) found a positive association between higher estriol levels during pregnancy and higher newborn weight at birth. Babies born spontaneously and in the autumn also had a higher frequency and mean TEXB level of the alpha fraction. When the influence of pairs of variables on TEXB-alpha exposure was studied, the group of newborns with greater PI and gestational age had higher levels of TEXB-alpha. All of these results suggest a role for TEXB in foetal growth.

In addition, 84.7% of the beta fractions showed measurable estrogenicity activity in the E-screen assay, with a mean value of 22.82 ± 64.48 Eeq pM/g placenta, equivalent to 1190.97 ± 2603.31 Eeq pM/g lipid.

Major predictors of TEXB-beta fraction were maternal age, body mass index before pregnancy, residence, educational level, employment, parity, ponderal index, head circumference and gestational age. Higher mean levels and frequency of TEXB-beta were found in younger and multiparous mothers. There was also an association between presence/absence of TEXB-beta and employment (100%, 89.37% and 81.25% of agricultural workers, housewives and workers in other types of activity had this compound in placenta) and a close-to-significant relationship between higher TEXB-beta and residence in rural area and secondary schooling. When the influence of pairs of variables on TEXB-beta exposure was studied, the group of agricultural workers and women exposed to chemicals and the group of younger mothers with higher BMI had higher concentrations of this compound in their placental tissue. Ibarluzea et al. (2004) also reported significantly lower TEXB-beta levels in single women compared with married or widowed/separated women. Regarding newborn variables, an association was found between higher levels of TEXB-beta and higher PI. Finally, higher levels were close-to-significantly associated with larger head circumference and higher gestational age.

With regard to the comparison of two methods for the assessment of TEXB in placentas, more than half (62.5%) of the placenta extracts showed measurable estrogenicity in the alpha-fraction in the E-Screen bioassay, with a mean value of 7.18 ± 11.37 Eeq pM/g placenta (310.67 ± 559.72 Eeq pM/g lipid). A smaller number of placentas extracts (20/40) were estrogenic in the YES assay, with a mean value of 6.63 ± 11.04 Eeq pM/g placenta (292.29 ± 546.01 Eeq pM/g lipid).

In addition, around four out of five placentas showed a measurable estrogenicity in the beta-fraction in the E-Screen, a higher frequency than in the YES (72.5%), with a mean value of 30.55 ± 51.27 Eeq pM/g placenta (1258.78 ± 2222.93 Eeq pM/g lipid) and 54.86 ± 55.06 Eeq pM/g placenta (2365.02 ± 3117.88 Eeq pM /g lipid), respectively.

With regard to alpha fraction, there was no significant difference in the estrogenicity of alpha fraction between the E-Screen and YES (Spearman and Mann-Whitney tests). The presence of TEXB was higher in E-Screen, although 7 alpha fractions that were positive in the YES assay were negative in the E-Screen. On the other hand, there were 12 alpha fractions that were positive in E-Screen and negative in YES.

There were no significant differences in the estrogenicity of the beta fraction between E-Screen and YES according to the Spearman test but there were differences using the Mann-Whitney test, with higher mean values in the YES assay. Finally, the frequency of positivity in the beta fraction was higher in E-Screen assay than in YES. There were 9 beta fractions that were positive in E-Screen and negative in YES and 3 beta fractions that were positive in the YES assay and negative in the E-Screen.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

Analysis of the present results and a review of other scientific studies on human exposure to persistent organic pollutants and on human health consequences of this exposure have lead to the following conclusions:

1. The exposure from mother to child *in utero* is qualitatively and quantitatively important. The mean number of pesticides per placenta was 7.61 ± 2.95 pesticides among the 17 organochlorines studied. The order of frequency of detected pesticides was p,p'DDE > lindane > endosulphan-diol > endosulphan-I > o,p'DDT > endosulphan-sulphate > endosulphan-ether > o,p'DDD > p,p'DDT > HCB > endosulphan-lactone > endrin > endosulphan-II > methoxychlor > aldrin > mirex > dieldrin.

2. All analyzed pesticides belong to different chemical groups but all of them are lipophilic and bioaccumulated. The order of concentration of the

pesticides identified in more than half of samples was: endosulphan-diol (4.15 ± 5.02 ng/g placenta or 156.73 ± 298.77 ng/g lipid), p,p'DDE (2.79 ± 3.77 ng/g placenta or 92.29 ± 155.76 ng/g lipid), endosulphan-sulphate (0.83 ± 2.25 ng/g placenta or 28.39 ± 70.01 ng/g lipid), endosulphan-I (0.59 ± 1.28 ng/g placenta or 19.87 ± 50.07 ng/g lipid), o,p'DDT (0.54 ± 0.84 ng/g placenta or 13.28 ± 34.08 ng/g lipid), lindane (0.39 ± 0.51 ng/g placenta or 12.28 ± 31.87 ng/g lipid), endosulphan-ether (0.17 ± 0.41 ng/g placenta or 6.83 ± 23.34 ng/g lipid).

3. The estimation of values of the total effective xenoestrogen burden (TEXB), which quantitatively expresses in estradiol equivalent units (Eeq) the estrogenicity of the placenta samples, showed that 71.4% and 84.7% of alpha and beta fractions, respectively, were positive, with a mean value of 3.84 ± 9.73 Eeq/g placenta (177.07 ± 398.60 Eeq/g lipid) and 22.82 ± 64.48 Eeq/g placenta (1190.97 ± 2603.31 Eeq/g lipid), respectively. This estrogenic activity can interfere in the hormonal function of the placenta and in the hormonal homeostasis of the foetus.

4. In the mothers, a higher frequency and/or abundance of organochlorine pesticides in the placenta were associated with older age (p,p'DDT), higher body mass index, (p,p'DDE, Σ Endosulphans and lindane), lower weight gain during pregnancy (p,p'DDE, endrin, Σ DDTs and lindane), lower educational level (p,p'DDE and methoxychlor), higher occupational exposure (number of pesticides, Σ Endosulphans and lindane), primiparity (Σ DDTs) and smoking (p,p'DDE, Σ Endosulphans and methoxychlor). In the fathers, a higher presence and/or abundance of pesticides were significantly associated with higher exposure (p,p'DDE and lindane), skilled manual work (p,p'DDE and lindane) and lower educational level (number of pesticides, lindane and HCB).

5. Birth and newborn characteristics associated with higher presence and/or abundance of organochlorine pesticides in the placenta were normal weight for gestational age (o,p'DDT, p,p'DDT and dieldrin), higher birth weight

(lindane) or lower birth weight (p,p'DDE and Σ endosulphans) and lower ponderal index (Σ endosulphans).

6. The estrogenic effect of placental tissue has been associated with some characteristics of parents, type of birth and newborns. Thus, a higher TEXB-alpha was found in older and multiparous mothers and in newborns with higher birth weight and with normal weight for the gestational age, suggesting that the estrogenicity of accumulated xenoestrogens play a role in embryonic-foetal development.

7. The consequences for babies of their exposure to organochlorines with disruptive action are not well known. However, since placental exposure occurs during critical periods of embryonic and foetal development, important effects on newborns can be predicted.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abad,E., Llerena,J.J., Saulo,J., Caixach,J., & Rivera,J. (2002). Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs content in food samples from Catalonia (Spain). *Chemosphere*, 46(9-10): 1435-1441.

Abraham,K., Hille,A., Ende,M., & Helge,H. (1994). Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCBs (138, 153, 180) in a breast-fed and a formula-fed infant. *Chemosphere*, 29(9-11): 2279-2286.

Adami,H.O., Bergstrom,R., Mohner,M., Zatonski,W., Storm,H., Ekbohm,A., Tretli,S., Teppo,L., Ziegler,H., & Rahu,M. (1994). Testicular cancer in nine northern European countries. *Int.J.Cancer*, 59(1): 33-38.

Ahlborg,U.G., Lipworth,L., Titus-Ernstoff,L., Hsieh,C.C., Hanberg,A., Baron,J., Trichopoulos,D., & Adami,H.O. (1995). Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit.Rev.Toxicol.*, 25(6): 463-531.

Akre,O., Lipworth,L., Cnattingius,S., Sparen,P., & Ekbohm,A. (1999). Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology*, 10(4): 364-369.

Alawi,M.A., Tamimi,S., & Jaghabir,M. (1999). Storage of organochlorine pesticide in human adipose tissue of Jordanian males and females. *Chemosphere*, 38(12): 2865-2873.

Alvárez-Pineiro, M.E., Simal-Lozano, J., & Lage-Yusty, M.A. (1995). Organochlorine compounds in mussels of the estuarine bays of Galicia (north-west Spain). *Mar. Pollut. Bull.*, 30(7): 484-487.

AMAP. (1998). AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Signes. Xii+859. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). Oslo, Norway.

Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le, G.R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., & Soto, A.M. (1999). Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.*, 107 Suppl 1: 89-108.

Anderson, J.W., Johnstone, B.M., & Remley, D.T. (1999). Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70(4): 525-535.

Annas, G.J. & Elias, S. (1999). Thalidomide and the Titanic: Reconstructing the technology tragedies of the twentieth century. *Am. J. Public Health*, 89(1): 98-101.

Araque, P. (2005). Evaluación de la exposición a xenoestrógenos en pacientes afectas de cáncer de mama durante el curso del tratamiento antineoplásico. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Arino, A., Lázaro, R., Conchello, P., Bayarri, S., & Herrera, A. (1995). The effect of commercial processing on incurred residues of DDE in meat products. *Food Addit. Contam.*, 12(4): 559-566.

Arrebola, F.J., Egea-González, F.J., Moreno, M., Fernández-Gutiérrez, A., Hernández-Torres, M.E., & Martínez-Vidal, J.L. (2001). Evaluation of endosulfan residues in vegetables grown in greenhouses. *Pest. Manag. Sci.*, 57(7): 645-652.

Aschim, E.L., Haugen, T.B., Tretli, S., Daltveit, A.K., & Grotmol, T. (2004). Risk factors for hypospadias in Norwegian boys - association with testicular dysgenesis syndrome? *Int. J. Androl.*, 27(4): 213-221.

Ashford, N. & Miller, C.S. (1998). Low-Level Chemical Exposures: A Challenge for Science and Policy. *Environ. Sci. Tech.*, 32: 508 A-509 A.

ATSDR. ToxFAQs^{RM} for Mirex y Clordecona. (1996a).

ATSDR. Toxicological profile for Hexachlorobenzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1996b). Atlanta, GA.

ATSDR. ToxFAQs^{RM} for Endrin. (1997).

ATSDR. ToxFAQs^{RM} for Aldrin/Dieldrin. (2002).

Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., & Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, 332(5): 281-285.

Badia-Vila,M., Ociepa,M., Mateo,R., & Guitart,R. (2000). Comparison of residue levels of persistent organochlorine compounds in butter from Spain and from other European countries. *J.Environ.Sci.Health B.*, 35(2): 201-210.

Banerjee,B.D. & Hussain,Q.Z. (1986). Effect of sub-chronic endosulfan exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Arch.Toxicol.*, 59(4): 279-284.

Barret,J.R. (2001). Chemicals in breast milk. *Environ.Health Perspect.*, 109: 1.

Bayarri,S., Herrera,A., Conchello,M.P., Arino,A.A., Lázaro,R., & Yagüe,C. (1998). Influence of meat processing and meat starter microorganisms on the degradation of organochlorine contaminants. *J.Agr.Food.Chem.*, 46(8): 3187-3193.

Beard,A.P., Bartlewski,P.M., Chandolia,R.K., Honaramooz,A., & Rawlings,N.C. (1999). Reproductive and endocrine function in rams exposed to the organochlorine pesticides lindane and pentachlorophenol from conception. *J.Reprod.Fertil.*, 115(2): 303-314.

Bell,E.M., Hertz-Picciotto,I., & Beaumont,J.J. (2001a). A case-control study of pesticides and fetal death due to congenital anomalies. *Epidemiology*, 12(2): 148-156.

Bell,E.M., Hertz-Picciotto,I., & Beaumont,J.J. (2001b). Case-cohort analysis of agricultural pesticide applications near maternal residence and selected causes of fetal death. *Am.J.Epidemiol.*, 154(8): 702-710.

Bentabol,A. & Jodral,M. (1995). Determination of organochlorine pesticides in cheese. *J.AOAC Int.*, 78(1): 94-98.

Berkowitz,G.S. & Papiernik,E. (1993). Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol.Rev.*, 15(2): 414-443.

Berkowitz,G.S., Lapinski,R.H., Godbold,J.H., Dolgin,S.E., & Holzman,I.R. (1995). Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Epidemiology*, 6(2): 127-131.

Berkowitz,G.S., Lapinski,R.H., & Wolff,M.S. (1996). The role of DDE and polychlorinated biphenyl levels in preterm birth. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 30(1): 139-141.

Bern,H.A. (1992). The fragile fetus. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. pp. 9-15. Princeton,N.J: Princeton Scientific Publishing.

Bhatia,R., Shiau,R., Petreas,M., Weintraub,J.M., Farhang,L., & Eskenazi,B. (2005). Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ.Health Perspect.*, 113(2): 220-224.

Bjerregaard,P. & Hansen,J.C. (2000). Organochlorines and heavy metals in pregnant women from the Disko Bay area in Greenland. *Sci.Total Environ.*, 245(1-3): 195-202.

Boersma,E.R. & Lanting,C.L. (2000). Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. Consequences for longterm neurological and cognitive development of the child lactation. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 478: 271-287.

Boisen,K.A., Kaleva,M., Main,K.M., Virtanen,H., Haavisto,A.M., Schmidt,I.M., Chellakooty,M., Damgaard,I.N., Mau,C., Reunanen,M., Skakkebaek,N.E., & Toppari,J. (2004). High and increasing prevalence of cryptorchidism in Denmark. *Ugeskr.Laeger*, 166(48): 4372-4375.

Bordajandi,L.R., Gómez,G., Fernández,M.A., Abad,E., Rivera,J., & González,M.J. (2003). Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere*, 53(2): 163-171.

Bordajandi,L.R., Gómez,G., Abad,E., Rivera,J., Del,M.F.-B., Blasco,J., & González,M.J. (2004). Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): levels and health implications. *J Agric.Food Chem.*, 52(4): 992-1001.

Bosse,U., Bannert,N., Niessen,K.H., Teufel,M., & Rose,I. (1996). Chlorinated carbohydrate content of fetal and pediatric organs and tissues. *Zentralbl.Hyg.Umweltmed.*, 198(4): 331-339.

Botella,B., Crespo,J., Rivas,A., Cerrillo,I., Olea-Serrano,M.F., & Olea,N. (2004). Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ.Res.*, 96(1): 34-40.

Botto,L.D., Moore,C.A., Khoury,M.J., & Erickson,J.D. (1999). Neural-tube defects. *N.Engl.J.Med.*, 341(20): 1509-1519.

Brender,J.D. & Suarez,L. (1990). Paternal occupation and anencephaly. *Am.J.Epidemiol.*, 131(3): 517-521.

Brotons,JM. (1994). Análisis químico y biológico (E-Screen) de contaminantes con actividad estrogénica. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Brouwer,A., Ahlborg,U.G., van Leeuwen,F.X., & Feeley,M.M. (1998). Report of the WHO working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere*, 37(9-12): 1627-1643.

Brouwer,A., Longnecker,M.P., Birnbaum,L.S., Cogliano,J., Kostyniak,P., Moore,J., Schantz,S., & Winneke,G. (1999). Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environ.Health Perspect.*, 107 Suppl 4: 639-649.

Bulger,W.H., Muccitelli,R.M., & Kupfer,D. (1978). Interactions of methoxychlor, methoxychlor base-soluble contaminant, and 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with rat uterine estrogen receptor. *J Toxicol Environ Health*, 4(5-6): 881-893.

Burnum,J.F. (1989). The misinformation era: the fall of the medical record. *Ann.Intern.Med*, 110(6): 482-484.

Bush,B., Snow,J., & Koblitz,R. (1984). Polychlorobiphenyl (PCB) congeners, p,p'-DDE, and hexachlorobenzene in maternal and fetal cord blood from mothers in Upstate New York. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.*, 13(5): 517-527.

Butler,W.J., Seddon,L., McMullen,E., Houseman,J., Tofflemire,K., Corriveau,A., Weber,J.P., Mills,C., Smith,S., & Van,O.J. (2003). Organochlorine levels in maternal and umbilical cord blood plasma in Arctic Canada. *Sci.Total Environ.*, 302(1-3): 27-52.

Calafat,A.M., Slakman,A.R., Silva,M.J., Herbert,A.R., & Needham,L.L. (2004). Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 805(1): 49-56.

Campbell,D.M., Webb,J.A., & Hargreave,T.B. (1987). Cryptorchidism in Scotland. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)*, 295(6608): 1235-1236.

Campoy,C., Jimenez,M., Olea-Serrano,M.F., Moreno-Frias,M., Canabate,F., Olea,N., Bayes,R., & Molina-Font,J.A. (2001a). Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum.Dev.*, 65 Suppl: S183-S190.

Campoy,C., Olea-Serrano,F., Jimenez,M., Bayes,R., Canabate,F., Rosales,M.J., Blanca,E., & Olea,N. (2001b). Diet and organochlorine contaminants in women of reproductive age under 40 years old. *Early Hum.Dev.*, 65 Suppl: S173-S182.

Canadian Institute of Child Health (2000). The health of Canada's children: a CICH profile. Ottawa: Canadian Institute of Child Health.

Capilla,J.A. (1979). Estudio bioquímico del glucógeno y lípidos hepáticos, en el desarrollo embrionario y postnatal del allus domesticus. Acción del ACTH. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Cariati,E., Acanfora,L., Branconi,F., Bigazzi,G.C., Capei,R., & Grasso,G. (1983). p-p'DDT in perinatal samples: report on maternal and neonatal measurements. *Biol.Res.Pregnancy Perinatol.*, 4(4): 169-171.

Carlsen,E., Giwercman,A., Keiding,N., & Skakkebaek,N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305(6854): 609-613.

Carlsen,E., Giwercman,A., Keiding,N., & Skakkebaek,N.E. (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 7: 137-139.

Carlson,B. (1999). *Human Embryology and Developmental Biology*. C.V. Mosby; 3rd edition (February 20, 2004).

Carmichael,S.L., Shaw,G.M., Nelson,V., Selvin,S., Torfs,C.P., & Curry,C.J. (2003). Hypospadias in California: trends and descriptive epidemiology. *Epidemiology*, 14(6): 701-706.

Carreño,J. (2005). Exposición de hombres jóvenes a compuestos tóxicos persistentes y bioacumulables en el sureste peninsular. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Carro,N., Garcia,I., Ignacio,M., & Mouteira,A. (2004). Possible influence of lipid content on levels of organochlorine compounds in mussels from Galicia coast (Northwestern, Spain). Spatial and temporal distribution patterns. *Environ.Int.*, 30(4): 457-466.

Castillo,M., Lopez,M.J., Olmos,B., & Olea,N. (2002). Los PCBs se van de paseo. *Rev.Salud Ambient.*, 2: 74-79.

Cerrillo,I. (2003). Exposición de la mujer a compuestos tóxicos persistentes y bioacumulables en el sureste peninsular. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Cerrillo,I., Granada,A., Lopez-Espinosa,M.J., Olmos,B., Jimenez,M., Cano,A., Olea,N., & Fatima Olea-Serrano,M. (2005a). Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ.Res.*, 98(2): 233-239.

Cerrillo,I., Olea-Serrano,M.F., Ibarluzea,J., Exposito,J., Torne,P., Laguna,J., Pedraza,V., & Olea,N. (2005b). Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* (In press).

Chao,H.R., Wang,S.L., Su,P.H., Yu,H.Y., Yu,S.T., & Papke,O. (2005). Levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in primipara breast milk from Taiwan: estimation of dioxins and furans intake for breastfed infants. *J.Hazard.Mater.*, 121(1-3): 1-10.

Chen,J., Chang,S., Duncan,S.A., Okano,H.J., Fishell,G., & Aderem,A. (1996). Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93(13): 6275-6279.

Chilvers,C., Pike,M.C., Forman,D., Fogelman,K., & Wadsworth,M.E. (1984). Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81. *Lancet*, 2(8398): 330-332.

Chowdhury,A.R., Venkatakrishna-Bhatt,H., & Gautam,A.K. (1987). Testicular changes of rats under lindane treatment. *Bull.Environ.Contam Toxicol.*, 38: 154-156.

Cocco,P. (2002). On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad.Saude Publica*, 18(2): 379-402.

Cok,I., Bilgili,A., Ozdemir,M., Ozbek,H., Bilgili,N., & Burgaz,S. (1997). Organochlorine pesticide residues in human breast milk from agricultural regions of Turkey, 1995-1996. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 59(4): 577-582.

Colborn,T. & Clement,C. (1992). Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human Connection. Princeton, N.J.

Colborn,T., vom Saal,F.S., & Soto,A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ.Health Perspect.*, 101(5): 378-384.

Commission of the European Communities.Commission Staff Working Document. (2005). Commission Staff Working Document. Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein. 2003. SEC(2005) 1399. (2005). Brussels 26.10.

Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. (1999). Estrategia Comunitaria en materia de alteradores endocrinos (sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. 17/12/1999.

Conde,C., Maluenda,C., & Arrabal,C. (1993). Hexachlorobenzene (HCB) in human milk in Spain from 1984 to 1991. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 51(6): 827-831.

Cooper,S.P., Burau,K., Sweeney,A., Robison,T., Smith,M.A., Symanski,E., Colt,J.S., Laseter,J., & Zahm,S.H. (2001). Prenatal exposure to pesticides: a feasibility study among migrant and seasonal farmworkers. *Am.J.Ind.Med.*, 40(5): 578-585.

Covaci,A., Jorens,P., Jacquemyn,Y., & Schepens,P. (2002). Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum. *Sci.Total Environ.*, 298(1-3): 45-53.

Cressey,P.J. & Vannoort,R.W. (2003). Pesticide content of infant formulae and weaning foods available in New Zealand. *Food Addit.Contam.*, 20(1): 57-64.

Cruz,S., Lino,C., & Silveira,M.I. (2003). Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. *Sci.Total Environ.*, 317(1-3): 23-35.

CSIC. (2001). Índice Huelva. Segundo informe del estudio que coordina el Consejo Superior de Investigaciones científicas sobre el diagnóstico ambiental y sanitario de la ría de Huelva. Consultado en www.csic.es/hispano/huelva2.

Cummings,A.M. & Metcalf,J.L. (1994). Mechanisms of the stimulation of rat uterine peroxidase activity by methoxychlor. *Reprod Toxicol.*, 8(6): 477-486.

Cummings,A.M. & Metcalf,J.L. (1995a). Methoxychlor regulates rat uterine estrogen-induced protein. *Toxicol Appl.Pharmacol.*, 130(1): 154-160.

Cummings,A.M. & Metcalf,J.L. (1995b). Effects of estrogen, progesterone, and methoxychlor on surgically induced endometriosis in rats. *Fundam.Appl.Toxicol.*, 27(2): 287-290.

Cummings,A.M. (1997). Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Crit.Rev.Toxicol.*, 27(4): 367-379.

Cupp,A.S., Uzumcu,M., Suzuki,H., Dirks,K., Phillips,B., & Skinner,M.K. (2003). Effect of transient embryonic in vivo exposure to the endocrine disruptor methoxychlor on embryonic and postnatal testis development. *J.Androl.*, 24(5): 736-745.

Dallaire,F., Dewailly,E., Laliberte,C., Muckle,G., & Ayotte,P. (2002). Temporal trends of organochlorine concentrations in umbilical cord blood of newborns from the lower north shore of the St. Lawrence river (Quebec, Canada). *Environ.Health Perspect.*, 110(8): 835-838.

Darvill,T., Lonky,E., Reihman,J., Stewart,P., & Pagano,J. (2000). Prenatal exposure to PCBs and infant performance on the fagan test of infant intelligence. *Neurotoxicology*, 21(6): 1029-1038.

Day,N.L., Richardson,G., Robles,N., Sambamoorthi,U., Taylor,P., Scher,M., Stoffer,D., Jasperse,D., & Cornelius,M. (1990). Effect of Prenatal Alcohol Exposure on Growth and Morphology of Offspring at 8 Months of Age. *Pediatrics*, 85(5): 748-752.

De Doubilet,P.M., Benson,C.B., Nadel,A.S., & Ringer,S.A. (1997a). Improved birth weight table for neonates developed from gestations dated by early sonography. *J.Ultrasound Med.*, 16(241): 249.

De Doubilet,P.M., Benson,C.B., Nadel,A.S., & Ringer,S.A. (1997b). Improved birth weight table for neonates developed from gestations dated by early sonography. *J Ultrasound Med*, 16: 241-249.

DeKoning,E.P. & Karmaus,W. (2000). PCB exposure in utero and via breast milk. A review. *J.Expo.Anal.Environ.Epidemiol.*, 10(3): 285-293.

Depue,R.H. (1984). Maternal and gestational factors affecting the risk of cryptorchidism and inguinal hernia. *Int.J.Epidemiol.*, 13(3): 311-318.

Dewailly,E., Nantel,A., Weber,J.P., & Meyer,F. (1989). High levels of PCBs in breast milk of Inuit women from arctic Quebec. *Bull.Environ.Contam Toxicol.*, 43(5): 641-646.

Dewailly,E., Ayotte,P., Bruneau,S., Gingras,S., Belles-Isles,M., & Roy,R. (2000). Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ.Health Perspect.*, 108(3): 205-211.

Dieckmann,W.J., Davis,M.E., Rynkiewicz,L.M., & Pottinger,R.E. (1953). Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 66(5): 1062-1081.

Dich,J., Zahm,S.H., Hanberg,A., & Adami,H.O. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control*, 8(3): 420-443.

Dodds,E.C. & Lawson,W. (1936). Synthetic Estrogenic Agents without the phenantrene nucleus? *Nature*, 13(996).

Dolk,H. (1998). Rise in prevalence of hypospadias. *Lancet*, 351(9105): 770.

Domingo,J.L., Schuhmacher,M., Granero,S., & Llobet,J.M. (1999). PCDDs and PCDFs in food samples from Catalonia, Spain. *Chemosphere*, 38(3517-3528).

Doong,R.A., Lee,C.Y., & Sun,Y.C. (1999). Dietary intake and residues of organochlorine pesticides in foods from Hsinchu, Taiwan. *J.AOAC Int.*, 82: 677-682.

Dorea,J.G., Cruz-Granja,A.C., Lacayo-Romero,M.L., & Cuadra-Leal,J. (2001). Perinatal metabolism of dichlorodiphenyldichloroethylene in Nicaraguan mothers. *Environ.Res.*, 86(3): 229-237.

Eckenhansen,F.W., Bennett,D., Beynon,K.I., & Elgar,K.E. (1981). Organochlorine pesticide concentrations in perinatal samples from mothers and babies. *Arch.Environ.Health*, 36(2): 81-92.

Ekbohm,A. (1998). Growing evidence that several human cancers may originate in utero. *Semin.Cancer Biol.*, 8(4): 237-244.

Endosulfan Preliminary Dossier. p. 55. (2003). Umweltbundesamt, Berlin.

Ernst,J., Warner,M.H., Morgan,A., Townes,B.D., Eiler,J., & Coppel,D.B. (1986). Factor analysis of the Wechsler Memory Scale: is the associate learning subtest an unclear measure? *Arch Clin.Neuropsychol.*, 1(4): 309-314.

Espigares,M., Coca,C., Fernández-Crehuet,O., Moreno,O., Bueno,A., & Galvez,R. (1997). Pesticide concentrations in the waters from a section of the Guadalquivir river basin, Spain. *Environ.Toxicol.Water.Qual.*, 12(249): 256.

European Commission. (2001). Monitoring of pesticide residues in products of plant origin in the European Union, Norway and Iceland. 1999 Report. SANCO/397/01-Final, Bruselas.

Falco,G., Bocio,A., Llobet,J.M., Domingo,J.L., Casas,C., & Teixido,A. (2004). Dietary intake of hexachlorobenzene in Catalonia, Spain. *Sci.Total Environ.*, 322(1-3): 63-70.

Falcon,M., Oliva,J., Osuna,E., Barba,A., & Luna,A. (2004). HCH and DDT residues in human placentas in Murcia (Spain). *Toxicology*, 195(2-3): 203-208.

Fang,S.C., Fallin,E., & Freed,V.H. (1977). Maternal transfer of 14C-p,p'DDT via placenta and milk and its metabolism in infant rats. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.*, 5(4): 427-436.

Fangstrom,B., Strid,A., Grandjean,P., Weihe,P., & Bergman,A. (2005). A retrospective study of PBDEs and PCBs in human milk from the Faroe Islands. *Environ.Health*, 4: 12.

Fenske,R.A., Kissel,J.C., Lu,C., Kalman,D.A., Simcox,N.J., Allen,E.H., & Keifer,M.C. (2000). Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community. *Environ.Health Perspect.*, 108(6): 515-520.

Fernández Alba,A.R., Aguera,A., Contretas,M., Penuela,G., Ferrer,I., & Barcelo,D. (1998). Comparison of variopus sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters. *J.Chromatography*, 823: 35-47.

Fernández,M., Cuesta,S., Jimenez,O., Garcia,M.A., Hernández,L.M., Marina,M.L., & González,M.J. (2000). Organochlorine and heavy metal residues in the water/sediment system of the Southeast Regional Park in Madrid, Spain. *Chemosphere*, 41(6): 801-812.

Fernández M.A., Gómara, B., Herrero, L, Bordajandi, L. R., Ramos, L., Abad, E., Rivera, J., & González, M. J. (2002). Levels of persistent organic pollutants (PCDD/Fs and Dioxin-like PCBs) in commercial food samples from Spain (1998-2001). Comunicación científica (Póster) presentada a la JAIS, Barcelona.

Fernández,M.F. (2001). Significado biológico y análisis de la carga estrogénica total efectiva. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Fernández,M.F., Rivas,A., Olea-Serrano,F., Cerrillo,I., Molina-Molina,J.M., Araque,P., Martínez-Vidal,J.L., & Olea,N. (2004). Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal.Bioanal.Chem.*, 379(1): 163-170.

Finnegan,J.K., Haag,H.B., & Larson,P.S. (1949). Tissue distribution and elimination of DDD and DDT following oral elimination to dogs and rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 72(2): 357-360.

Fitzgerald,E.F., Hwang,S.A., Deres,D.A., Bush,B., Cook,K., & Worswick,P. (2001). The association between local fish consumption and DDE, mirex, and HCB concentrations in the breast milk of Mohawk women at Akwesasne. *J.Expo.Anal.Environ.Epidemiol.*, 11(5): 381-388.

Forman,D. & Moller,H. (1994). Testicular cancer. *Cancer Surv.*, 19-20: 323-341.

Foster,W.G., Jarrell,J.F., Younglai,E.V., Wade,M.G., Arnold,D.L., & Jordan,S. (1996). An overview of some reproductive toxicology studies conducted at Health Canada. *Toxicol Ind.Health*, 12(3-4): 447-459.

Frenich,A.G., Pablos Espada,M.C., Martínez Vidal,J.L., & Molina,L. (2001). Broad-spectrum determination of pesticides in groundwater by gas chromatography with electron capture detection, nitrogen-phosphorus detection, and tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*, 84(6): 1751-1762.

Gale,W.L., Patino,R., & Maule,A.G. (2004). Interactions of xenobiotics with xenoestrogen with estrogen receptors alpha and beta and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 136(3): 338-345.

Gallelli,G., Mangini,S., & Gerbino,C. (1995). Organochlorine residues in human adipose and hepatic tissues from autopsy sources in northern Italy. *J.Toxicol.Environ.Health*, 46(3): 293-300.

Gallenberg,L.A. & Vodcnik,M.J. (1989). Transfer of persistent chemicals in milk. *Drug Metab.Rev.*, 21(2): 277-317.

Ganapathy,V. & Prasad,P.D. (2005). Role of transporters in placental transfer of drugs. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 207(2 Suppl): 381-387.

Garat,J.M. (1987). Malformaciones del aparato genitourinal. Malformaciones genitales. In J.M.Garat & R.Gosálbez (Eds.), *Urologia Pediátrica* pp. 313-396. Salvat. Barcelona.

García Repetto,R., Garrido,I., & Repetto,M. (1996). Determination of organochlorine , organophosphorus, and triazine pesticide-residues in wine by Gas-Chromatography with Electron-Capture and Nitrogen-Phosphorus detection. *J AOAC Internat*, 79(6): 1423-1427.

Garcia,A.M., Benavides,F.G., Fletcher,T., & Orts,E. (1998). Paternal exposure to pesticides and congenital malformations. *Scand.J.Work Environ.Health*, 24(6): 473-480.

Garcia,A.M., Fletcher,T., Benavides,F.G., & Orts,E. (1999a). Parental agricultural work and selected congenital malformations. *Am.J.Epidemiol.*, 149(1): 64-74.

Garcia,E.M., Cabrera,C., Sánchez,J., Lorenzo,M.L., & Lopez,M.C. (1999b). Chromium levels in potable water, fruit juices and soft drinks: influence on dietary intake. *Sci.Total Environ.*, 241(1-3): 143-150.

Garcia-Repetto,R. & Repetto,M. (1997). HCH and DDT residues in drinking water from the South of Spain, 1991-1994. *Bull.Environ.Contam Toxicol.*, 59(6): 875-881.

Garcia-Rodriguez,J., Garcia-Martin,M., Noguerras-Ocana,M., de Dios Luna-del-Castillo, Espigares,G.M., Olea,N., & Lardelli-Claret,P. (1996). Exposure to pesticides and

cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ. Health Perspect.*, 104(10): 1090-1095.

Garrido, M.D., Bentabol, A., Jodral, M., & Pozo, R. (1994). HCB levels in Spanish sterilized milk. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53(4): 524-527.

Garry, V.F., Schreinemachers, D., Harkins, M.E., & Griffith, J. (1996). Pesticide applicators, biocides, and birth defects in rural Minnesota. *Environ. Health Perspect.*, 104(4): 394-399.

Gerhard, I., Daniel, V., Link, S., Monga, B., & Runnebaum, B. (1998). Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. *Environ. Health Perspect.*, 106(10): 675-681.

Geschickter, C.F. (1939). Mammary carcinoma in the rat with metastasis induced by estrogen. *Science*, 89: 35-37.

Giwercman, A., Carlsen, E., Keiding, N., & Skakkebaek, N.E. (1993). Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. *Environ. Health Perspect.*, 101 Suppl 2: 65-71.

Gladen, B.C., Rogan, W.J., Hardy, P., Thullen, J., Tingelstad, J., & Tully, M. (1988). Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. *J. Pediatr.*, 113(6): 991-995.

Gladen, B.C., Ragan, N.B., & Rogan, W.J. (2000). Pubertal growth and development and prenatal and lactational exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene. *J. Pediatr.*, 136(4): 490-496.

Gocmen, A., Peters, H.A., Cripps, D.J., Bryan, G.T., & Morris, C.R. (1989). Hexachlorobenzene episode in Turkey. *Biomed. Environ. Sci.*, 2(1): 36-43.

Golfopoulou, S.K., Nikolaou, A.D., Kostopoulou, M.N., Xilourgidis, N.K., Vagi, M.C., & Lekkas, D.T. (2003). Organochlorine pesticides in the surface waters of Northern Greece. *Chemosphere*, 50(4): 507-516.

Gomara, B., Bordajandi, L.R., Fernández, M.A., Herrero, L., Abad, E., Abalos, M., Rivera, J., & González, M.J. (2005). Levels and trends of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Spanish commercial fish and shellfish products, 1995-2003. *J. Agric. Food. Chem.*, 53(21): 8406-8413.

Gormley, K.L. & Teather, K.L. (2003). Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54(3): 330-338.

Greene, R. (1939). Experimental intersexuality: Modification of sexual development of the white rat with a synthetic estrogen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 41: 169-170.

Greenpeace y Ecologistas en Acción. (2003). Uso actual de DDT en España: El caso de Montecinca. Noviembre.

- Gupta,P.K. & Gupta,R.C.** (1979). Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan. *A Review Toxicol.*, 13: 115-130.
- Hall,D.L., Payne,L.A., Putnam,J.M., & Huet-Hudson,Y.M.** (1997). Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. *Reprod.Toxicol.*, 11(5): 703-708.
- Hamel,A., Mergler,D., Takser,L., Simoneau,L., & Lafond,J.** (2003). Effects of low concentrations of organochlorine compounds in women on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblast. *Toxicol.Sci.*, 76(1): 182-189.
- Harada,M.** (1976). Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Bull Institute Constitutional Med (Kumamoto University)*, 25: 26-74.
- Harry,G.J.** (1994). Introduction to Developmental Neurotoxicology. In G.J. Harry (Ed.), *Developmental Neurotoxicology* pp. 1-7. Boca Raton: CRC Press.
- Hayes,W.J. & Laws,E.R.** (1991). Handbook of pesticides toxicology. Vol III. New York/London: Academic Press.
- Hernández,F., Serrano,R., Miralles,M.C., & Font,N.** (1996). Gas liquid chromatography and enzyme-linked immune sorbent assay in pesticide monitoring of surface water from the Western Mediterranean (Comunidad Valenciana, Spain). *Cromatographia*, 42: 151-158.
- Hernández,F., Pitarch,E., Serrano,R., Gaspar,J.V., & Olea,N.** (2002). Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatographic cleanup and gas chromatographic analysis. *J Anal.Toxicol*, 26(2): 94-103.
- Hernández,L.M., Fernández,M.A., Jiménez,B., González,M.J., & Frutos,J.F.** (1994). Organochlorine pollutants in meats and cow's milk from Madrid (Spain). *Bull.EnvIRON.Contam.Toxicol.*, 52(246): 253.
- Herrera,A., Arino,A., Conchello,P., Lázaro,R., Bayarri,S., Perez-Arquillue,C., Garrido,M.D., Jodral,M., & Pozo,R.** (1996). Estimates of mean daily intakes of persistent organochlorine pesticides from Spanish fatty foodstuffs. *Bull.EnvIRON.Contam.Toxicol.*, 56(2): 173-177.
- Horwitz,K.B., Koseki,Y., & McGuire,W.L.** (1978). Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology*, 103: 1742-1751.
- Hosie,S., Loff,S., Witt,K., Niessen,K., & Waag,K.L.** (2000). Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes? *Eur.J.Pediatr.Surg.*, 10(5): 304-309.
- Huang,Q. & Huang,X.** (1987). The effect of benzene hexachloride on mouse sperm. *Zhejiang Yike Daxue Xuebao*, 16: 9-12.
- Hunt,J.S. & Orr,H.T.** (1992). HLA and maternal-fetal recognition. *FASEB J.*, 6(6): 2344-2348.
- Hura,C., Leanca,M., Rusu,L., & Hura,B.A.** (1999). Risk assessment of pollution with pesticides in food in the Eastern Romania area (1996-1997). *Toxicol.Lett.*, 107(1-3): 103-107.

Husmann,D.A. & Levy,J.B. (1995). Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology*, 46(2): 267-276.

Huston,J.M., Hasthorpe,S., & Heyns,C. (1997). Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr.Rev.*, 18(2): 259-280.

IARC. (2003). Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins. International Agency for Cancer Research. www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol69/dioxin.html.

Ibarluzea,J.J., Fernández,M.F., Santa-Marina,L., Olea-Serrano,M.F., Rivas,A.M., Aurrekoetxea,J.J., Exposito,J., Lorenzo,M., Torne,P., Villalobos,M., Pedraza,V., Sasco,A.J., & Olea,N. (2004). Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control*, 15(6): 591-600.

Infante-Rivard,C., Labuda,D., Krajinovic,M., & Sinnett,D. (1999). Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology*, 10(5): 481-487.

INTERLAB para la Confederación Hidrográfica del Ebro. Estudio de la situación piscícola en el río Cinca a su paso por la localidad de Monzón (Huesca). (1999).

Irvine,D.S. (1994). Falling sperm quality. *BMJ*, 309(6952): 476.

Iyengar,G.V. & Rapp,A. (2001). Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 2: essential minor, trace and other (non-essential) elements in human placenta. *Sci.Total Environ.*, 280(1-3): 207-219.

Jacobson,J.L., Fein,G.G., Jacobson,S.W., Schwartz,P.M., & Dowler,J.K. (1984a). The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *Am.J.Public Health*, 74(4): 378-379.

Jacobson,J.L., Jacobson SW, Fein GG, Schwartz PM, & Dowler JK (1984b). Prenatal exposure to an environmental toxin: a test of the multiple effect model. *Dev Psychol*, 20: 523-532.

Jacobson,J.L., Humphrey,H.E., Jacobson,S.W., Schantz,S.L., Mullin,M.D., & Welch,R. (1989). Determinants of polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated biphenyls (PBBs), and dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) levels in the sera of young children. *Am.J.Public Health*, 79(10): 1401-1404.

Jacobson,J.L. & Jacobson,S.W. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N.Engl.J.Med.*, 335(11): 783-789.

JAMA (1970). Evaluation of the present status of DDT with respect to man. *Journal of the American Association*, 212: 383-384.

Jarrell,J., Gocmen,A., Foster,W., Brant,R., Chan,S., & Sevcik,M. (1998). Evaluation of reproductive outcomes in women inadvertently exposed to hexachlorobenzene in southeastern Turkey in the 1950s. *Reproductive Toxicology*, 12(4): 469-476.

Jensen,A.A. & Slorach,S.A. (1991). Chemical contaminants in human milk. CRC Press Boca Raton, Fl.

Jensen, J., Adare, K., & Shearer, R. (1997). Canadian Artic Contaminants Assessment Report (CACAR).

Jensen,R.G. (1996). The lipids in human milk. *Prog Lipid Res*, 35(1): 53-92.

Jimenez,M. (2000). Análisis de pesticidas organoclorados en medios biológicos de madres lactantes y su relación con la dieta. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Jin,L., Tran,D.Q., Ide,C.F., McLachlan,J.A., & Arnold,S.F. (1997). Several synthetic chemicals inhibit progesterone receptor-mediated transactivation in yeast. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 233(1): 139-146.

Jobling,S. & Sumpter,J.P. (1993). Male sexual development in "a sea of oestrogen". *Lancet*, 342(8863): 124-125.

John Radeliffe Hospital Cryptorchidism Study Group (1986). Cryptorchidism: an apparent substantial increase since 1960. *Br.Med.J.*, 293(1401): 1404.

Jorgenson,J.L. (2001). Aldrin and dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environ.Health Perspect.*, 109 Suppl 1: 113-139.

Kaiglova,A., Reichrtova,E., Adamcakova,A., & Wsolova,L. (2001). Lactate dehydrogenase activity in human placenta following exposure to environmental pollutants. *Physiol.Res.*, 50(5): 525-528.

Kaijser,M., Granath,F., Jacobsen,G., Cnattingius,S., & Ekbohm,A. (2000). Maternal pregnancy estriol levels in relation to anamnestic and fetal anthropometric data. *Epidemiology*, 11(3): 315-319.

Kanja,L.W., Skaare,J.U., Ojwang,S.B., & Maitai,C.K. (1992). A comparison of organochlorine pesticide residues in maternal adipose tissue, maternal blood, cord blood, and human milk from mother/infant pairs. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 22(1): 21-24.

Kaplan,G.W. (1993). Nomenclature of cryptorchidism. *Eur.J.Pediatr.*, 152 Suppl 2: S17-S19.

Karmaus,W. & Wolf,N. (1995). Reduced birthweight and length in the offspring of females exposed to PCDFs, PCP, and lindane. *Environ.Health Perspect.*, 103(12): 1120-1125.

Karmaus,W., DeKoning,E.P., Kruse,H., Witten,J., & Osius,N. (2001a). Early childhood determinants of organochlorine concentrations in school-aged children. *Pediatr.Res.*, 50(3): 331-336.

Karmaus,W., Kuehr,J., & Kruse,H. (2001b). Infections and atopic disorders in childhood and organochlorine exposure. *Arch.Environ.Health*, 56(6): 485-492.

Karmaus,W., Davis,S., Chen,Q., Kuehr,J., & Kruse,H. (2003). Atopic manifestations, breast-feeding protection and the adverse effect of DDE. *Paediatr.Perinat.Epidemiol.*, 17(2): 212-220.

Kelce,W.R., Stone,C.R., Laws,S.C., Gray,L.E., Kemppainen,J.A., & Wilson,E.M. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375(6532): 581-585.

Kelce,W.R. & Wilson,E.M. (1997). Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J.Mol.Med.*, 75(3): 198-207.

Kinloch,D., Kuhnlein,H., & Muir,D.C. (1992). Inuit foods and diet: a preliminary assessment of benefits and risks. *Sci.Total Environ.*, 122(1-2): 247-278.

Kojima,H., Iida,M., Katsura,E., Kanetoshi,A., Hori,Y., & Kobayashi,K. (2003). Effects of a diphenyl ether-type herbicide, chlornitrofen, and its amino derivative on androgen and estrogen receptor activities. *Environ.Health Perspect.*, 111(4): 497-502.

Koopman-Esseboom,C., Huisman,M., Weisglas-Kuperus,N., Boersma,E.R., De Ridder,M.A., van der Paauw,C.G., Tuinstra,L.G., & Sauer,P.J. (1994a). Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in The Netherlands. *Chemosphere*, 29(9-11): 2327-2338.

Koopman-Esseboom,C., Huisman,M., Weisglas-Kuperus,N., van der Paauw,C.G., Tuinstra,L.G., Boersma,E.R., & Sauer,P.J. (1994b). PCB and dioxin levels in plasma and human milk of 418 Dutch women and their infants. Predictive value of PCB congener levels in maternal plasma for fetal and infant's exposure to PCBs and dioxins. *Chemosphere*, 28: 1721-1732.

Korrick,S.A., Chen,C., Damokosh,A.I., Ni,J., Liu,X., Cho,S.I., Altshul,L., Ryan,L., & Xu,X. (2001). Association of DDT with spontaneous abortion: a case-control study. *Ann.Epidemiol.*, 11(7): 491-496.

Krauthacker,B., ebic-Kolbah,T., Buntic,A., Tkalcevic,B., & Reiner,E. (1980). DDT residues in samples of human milk, and in mothers' and cord blood serum, in a continental town in Croatia (Yugoslavia). *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 46(3): 267-273.

Krauthacker,B., Reiner,E., Votava-Raic,A., Tjesic-Drinkovic,D., & Batinic,D. (1998). Organochlorine pesticides and PCBs in human milk collected from mothers nursing hospitalized children. *Chemosphere*, 37(1): 27-32.

Krimsky,S. (2000). *Hormonal Chaos. The Scientific and Social Origins of the Environmental Endocrine Hypothesis.* The Johns Hopkins University Press.

Kristensen,P., Andersen,A., Irgens,L.M., Bye,A.S., & Sundheim,L. (1996). Cancer in offspring of parents engaged in agricultural activities in Norway: incidence and risk factors in the farm environment. *Int.J.Cancer*, 65(1): 39-50.

Kristensen,P., Irgens,L.M., Andersen,A., Bye,A.S., & Sundheim,L. (1997a). Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology*, 8(5): 537-544.

Kristensen,P., Irgens,L.M., Andersen,A., Bye,A.S., & Sundheim,L. (1997b). Gestational age, birth weight, and perinatal death among births to Norwegian farmers, 1967-1991. *Am.J.Epidemiol.*, 146(4): 329-338.

Lackmann,G.M., Goen,T., Tolliner,U., Schaller,K.H., & Angerer,J. (1996). PCBs and HCB in serum of full-term German neonates. *Lancet*, 348(9033): 1035.

Lackmann,G.M., Angerer,J., Salzberger,U., & Tollner,U. (1999). Influence of maternal age and duration of pregnancy on serum concentrations of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene in full-term neonates. *Biol.Neonate*, 76(4): 214-219.

LaKind,J.S., Berlin,C.M., Park,C.N., Naiman,D.Q., & Gudka,N.J. (2000). Methodology for characterizing distributions of incremental body burdens of 2,3,7,8-TCDD and DDE from breast milk in North American nursing infants. *J.Toxicol.Environ.Health A*, 59(8): 605-639.

Larsen,W.J. (1997). *Human Embryology*. New York: Churchill Livingstone.

Lázaro,R., Herrera,A., Arino,A., Conchello,M.P., & Bayarris,S. (1996). Organochlorine pesticide-residues in total diet samples from Aragón (Northeastern Spain). *J.Agr.Food.Chem.*, 44(9): 2742-2747.

Lee,P.A., Chernausek,S.D., Hokken-Koelega,A.C., & Czernichow,P. (2003). International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics*, 111(6 Pt 1): 1253-1261.

Leoni,V., Fabiani,L., Marinelli,G., Morini,A., Aleandri,V., Pozzi,V., Cappa,F., Barbati,D., Puccetti,G., & Tarsitani,G.F. (1986). Spontaneous abortion in relation to the presence of hexachlorobenzene in the Italian environment. *I.A.R.C.Sci.Publ.*, 77: 143-146.

Lippman,M.E., Huff,K.K., & Jakesz,R. (1986). Estrogens regulate production of specific growth factors in hormone-dependent human breast cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 464: 11-16.

Livingston,J.E. & Poland,B.J. (1980). A study of spontaneously aborted twins. *Teratology*, 21(2): 139-148.

Llobet,J.M., Bocio,A., Domingo,J.L., Teixido,A., Casas,C., & Muller,L. (2003a). Levels of polychlorinated biphenyls in food from Catalonia, Spain: estimated dietary intake. *J.Food.Prot.*, 66(3): 479-484.

Llobet,J.M., Domingo,J.L., Bocio,A., Casas,C., Teixido,A., & Muller,L. (2003b). Human exposure to dioxins through the diet in Catalonia, Spain: carcinogenic and non-carcinogenic risk. *Chemosphere*, 50(9): 1193-1200.

Long,L.G. & Winefordner,J.D. (1983). Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal.Chem.*, 55: 712-724.

Longnecker,M.P., Rogan,W.J., & Lucier,G. (1997). The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu.Rev.Public Health*, 18: 211-244.

Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Gladen, B.C., & Berendes, H.W. (1999). Serial levels of serum organochlorines during pregnancy and postpartum. *Arch. Environ. Health*, 54(2): 110-114.

Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Zhou, H., & Brock, J.W. (2001). Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *Lancet*, 358(9276): 110-114.

Longnecker, M.P. & Rogan, W.J. (2001). Persistent organic pollutants in children. *Pediatr. Res.*, 50(3): 322-323.

Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Zhou, H., Gray, K.A., Needham, L.L., & Wilcox, A.J. (2002). Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. *Am. J. Epidemiol.*, 155(4): 313-322.

López-Carrillo, L., Torres-Sánchez, L., Moline, J., Ireland, K., & Wolff, M.S. (2001). Breast-feeding and serum p,p'DDT levels among Mexican women of childbearing age: a pilot study. *Environ. Res.*, 87(3): 131-135.

López-Espinosa, M.J., Granada, A., Carreño, J., Salvatierra, M., Olea-Serrano, F., & Olea, N. (2006a). Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta* (in press).

López-Espinosa, M.J., Granada, A., Molina-Molina, J.M., Fernández, M.F., Avivar, C., Olea-Serrano, F., & Olea, N. (2006b). Assessment of the estrogenicity due to chemical residues in human placenta. *Toxicology* (In press).

López-Navarrete, E. (2001). Exposición a xenobióticos estrogénicos y alteraciones congénitas de la anatomía del aparato genital masculino. Tesis Doctoral.

López-y-López-Leiton, Alvarez-Pineiro, M.E., Lage-Yuste, M.A., & Cortizo-Davina, J.L. (2001). Levels of seven PCBs used as markers of dioxin in commercial pork meat in Spain. *Journal of AOAC International*, 84(6): 1799-1801.

Losada, A., Fernández, N., Díez, M.J., Teran, M.T., García, J.J., & Sierra, M. (1996). Organochlorine pesticide residues in bovine milk from Leon (Spain). *Sci. Total Environ.*, 181(2): 133-135.

Ludwicki, J.K. & Goralczyk, K. (1994). Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52(3): 400-403.

Maier-Bode, H. (1968). Properties, effect, residues and analytics of the insecticide endosulfan. *Residue. Rev.*, 22: 1-44.

Marti, I., Lloret, R., Martín-Alonso, J., & Ventura, F. (2005). Determination of chlorinated toluenes in raw and treated water samples from the Llobregat river by closed loop stripping analysis and gas chromatography-mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A*, 1077(1): 68-73.

Martinetti, M., Maghnie, M., Salvaneschi, L., Di, N.N., Daielli, C., Palladini, G., & Cuccia, M. (1992). Immunogenetic and hormonal study of cryptorchidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74(1): 39-42.

Martínez Vidal, J.L., Arrebola, F.J., Garrido, F.A., Martínez Fernández, J., & Mateu Sánchez, M. (2004). Validation of a Gas Chromatographic–Tandem Mass Spectrometric method for analysis of pesticide residues in six food commodities. Selection of a reference matrix for calibration. *Chromatographia*, 59: 321-327.

Martínez, M.E., Romanos, L.A., Praena, C.M., Repetto, J.M., & Martínez, R.D. (1993). [Organochlorine compounds: correlation between maternal and infantile blood levels, maternal milk and maternal-infantile parameters. Study in the province of Huelva]. *An.Esp.Pediatr.*, 38(6): 493-498.

Martínez, M.P., Angulo, R., Pozo, R., & Jodral, M. (1997). Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. *Food Chem.Toxicol.*, 35(6): 621-624.

Martínez-Frias, M.L., Prieto, D., Prieto, L., Bermejo, E., Rodríguez-Pinilla, E., & Cuevas, L. (2004). Secular decreasing trend of the frequency of hypospadias among newborn male infants in Spain. *Birth Defects Res A Clin.Mol.Teratol.*, 70(2): 75-81.

Massey, R. (2002). Having Faith: An Ecologist's Journey to Motherhood. *J.Public Health Policy*, 23(4): 511-517.

Matlai, P. & Beral, V. (1985). Trends in congenital malformations of external genitalia. *Lancet*, 1(8420): 108.

Matsumura, F. (1985). *Toxicology of insecticides*. New York: Plenum.

McBride, W.G. (1961). Thalidomide and Congenital Abnormalities. *Lancet*, 2: 1358-1363.

McNamara, J.P. (1994). Lipid metabolism in adipose tissue during lactation: a model of a metabolic control system. *J.Nutr.*, 124(8 Suppl): 1383S-1391S.

Medina, M.B. & Sherman, J.T. (1986). High performance liquid chromatographic separation of anabolic oestrogens and ultraviolet detection of 17 beta-oestradiol, zeranol, diethylstilboestrol or zearalenone in avian muscle tissue extracts. *Food Addit.Contam.*, 3(3): 263-272.

Mes, J., Doyle, J.A., Adams, B.R., Davies, D.J., & Turton, D. (1984). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk and blood of Canadian women during lactation. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.*, 13(2): 217-223.

Miller, W.R. & Sharpe, R.M. (1998). Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-Related cancer*, 5(69): 96.

Mittendorf, R. (1995). Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology*, 51(6): 435-445.

Moline, J.M., Golden, A.L., Bar-Chama, N., Smith, E., Rauch, M.E., Chapin, R.E., Perreault, S.D., Schrader, S.M., Suk, W.A., & Landrigan, P.J. (2000). Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environ.Health Perspect.*, 108(9): 803-813.

Moller, H. & Weidner, I.S. (1999). Epidemiology of cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology*, 10(4): 352-354.

Moore,K.L. & Persaud TVN (1993). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Philadelphia: Saunders.

Moreno,F.M., Garrido,F.A., Martínez Vidal,J.L., Mateu,S.M., Olea,F., & Olea,N. (2001). Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.*, 760(1): 1-15.

Mortensen,E.L., Michaelsen,K.F., Sanders,S.A., & Reinisch,J.M. (2002). The association between duration of breastfeeding and adult intelligence. *JAMA*, 287(18): 2365-2371.

Mortensen,G.K., Main,K.M., Andersson,A.M., Leffers,H., & Skakkebaek,N.E. (2005). Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal.Bioanal.Chem.*, 382(4): 1084-1092.

Mountfort,K.A., Kelly,J., Jickells,S.M., & Castle,L. (1997). Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. *Food Addit.Contam.*, 14(6-7): 737-740.

Moysich,K.B., Ambrosone,C.B., Vena,J.E., Shields,P.G., Mendola,P., Kostyniak,P., Greizerstein,H., Graham,S., Marshall,J.R., Schisterman,E.F., & Freudenheim,J.L. (1998). Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 7(3): 181-188.

Muller,W.F., Hobson,W., Fuller,G.B., Knauf,W., Coulston,F., & Korte,F. (1978). Endocrine effects of chlorinated hydrocarbons in rhesus monkeys. *Ecotoxicol.EnvIRON Saf.*, 2(2): 161-172.

Murphy,R.S., Kutz,F.W., & Strassman,S.C. (1983). Selected pesticide residues or metabolites in blood and urine specimens from a general population survey. *Environ.Health Perspect.*, 48: 81-86.

Mussalo-Rauhamaa,H. (1991). Partitioning and levels of neutral organochlorine compounds in human serum, blood cells, and adipose and liver tissue. *Sci.Total Environ.*, 103(2-3): 159-175.

Myllynen,P., Pasanen,M., & Pelkonen,O. (2005). Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*, 26(5): 361-371.

Nair,A., Mandapati,R., Dureja,P., & Pillai,M.K. (1996). DDT and HCH load in mothers and their infants in Delhi, India. *Bull.EnvIRON.Contam Toxicol.*, 56(1): 58-64.

Nathanielsz,P.W. (1996). *Life before birth: The challenges of fetal development*. New York:W. H. Freeman and Company.

Navarro-Blasco,I. & Varez-Galindo,J.I. (2005). Lead levels in retail samples of Spanish infant formulae and their contribution to dietary intake of infants. *Food Addit.Contam.*, 22(8): 726-734.

Nelson,C.P., Park,J.M., Wan,J., Bloom,D.A., Dunn,R.L., & Wei,J.T. (2005). The increasing incidence of congenital penile anomalies in the United States. *J Urol.*, 174(4 Pt 2): 1573-1576.

Nerin,C., Battle,R., Domeno,C., & Echarri,I. (1997). Quantitative analysis of pesticides in postconsumer recycled plastics using off-line supercritical-fluid-extraction gcecd source. *Anal.Chem.*, 69(16): 3304-3313.

Nicolopoulou-Stamati,P. & Pitsos,M.A. (2001). The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. *Human Reproduction Update*, 7(3): 323-330.

Niessen,K.H., Ramolla,J., Binder,M., Brugmann,G., & Hofmann,U. (1984). Chlorinated hydrocarbons in adipose tissue of infants and toddlers: inventory and studies on their association with intake of mothers' milk. *Eur.J.Pediatr.*, 142(4): 238-244.

Nurminen,T., Rantala,K., Kurppa,K., & Holmberg,P.C. (1995). Agricultural work during pregnancy and selected structural malformations in Finland. *Epidemiology*, 6(1): 23-30.

O'Leary,J.A., Davies,J.E., Edmundson,W.F., & Feldman,M. (1970a). Correlation of prematurity and DDE levels in fetal whole blood. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 106(6): 939.

O'Leary,J.A., Davies,J.E., Edmundson,W.F., & Reich,G.A. (1970b). Transplacental passage of pesticides. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 107(1): 65-68.

O'Leary,J.A., Davies,J.E., & Feldman,M. (1970c). Spontaneous abortion and human pesticide residues of DDT and DDE. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 108(8): 1291-1292.

Ohi,G. (1999). Endocrine disrupting chemicals and carcinogenicity. *Gan To Kagaku Ryoho*, 26(3): 263-268.

Okonda`Ahoka,O., Lavaur,E., Le Sech,J., Phu Lich,N., & Le Moan,G. (1984). Etude de l`mpregnation par les pesticides organo-halogeneus au Zaire. *Ann.Fals.Exp.Chim.*, 77: 531-540.

Olea N, Molina MJ, Garcia-Martin,M., & et al (1996). Modern agricultural practices: the human price. In Soto AM, C.Sonnenschein, & Colborn T (Eds.), *Endocrine disruption and reproductive effects in wildlife and humans* pp. 455-474. Amsterdam: The Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers.

Olea,N. & Olea-Serrano,F. (1996). Oestrogens and the environment. *Eur J Cancer Prev.*, 5(6): 491-496.

Olea,N., Olea-Serrano,F., Lardelli-Claret,P., Rivas,A., & Barba-Navarro,A. (1999). Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol.Ind.Health*, 15(1-2): 151-158.

Olea,N., Fernández,M.F., & Rivas,A. (2000). Evaluación de la disrupción endocrina. In E.De la Peña & E.Gómez (Eds.), *Evaluación toxicológica de los plaguicidas y la sanidad ambiental*. pp. 89-97. Murcia.

Olea,N., Fernández,M.F., Araque,P., & Serrano,F. (2002). Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac.Sanit.*, 16(261): 267.

Olea,N., López,M.J., Fernández,M.F., & Olea-Serrano,F. (2003). Aspectos que relacionan la salud humana y las prácticas agrarias. In Universidad de Castilla la Mancha (Ed.), *Fundamentos de Agricultura Ecológica* pp. 43-62. Universidad de Castilla la Mancha.

Olmos,B. (2005). Exposición medioambiental a xenoestrógenos y riesgo de criptorquidia e hipospadias. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Olmos,B., Fernández,M.F., Granada,A., López-Espinosa,M.J., Molina-Molina,J.M., Fernández,J.M., Cruz,M., Olea-Serrano,M.F., & Olea,N. (2006). Human exposure to endocrine disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias. A nested case-control study. *Environ.Health Perspect.*, (In press).

Olshan,A.F., Baird,P.A., & Teschke,K. (1989). Paternal occupational exposures and the risk of Down syndrome. *Am.J.Hum.Genet.*, 44(5): 646-651.

Otludil,B., Cengiz,E.I., Yildirim,M.Z., Unver,O., & Unlu,E. (2004). The effects of endosulfan on the great ramshorn snail *Planorbis* *corneus* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. *Chemosphere*, 56(7): 707-716.

Ousterhout,J., Struck,R.F., & Nelson,J.A. (1981). Estrogenic activities on methoxychlor metabolites. *Biochem.Pharmacol.*, 30(20): 2869-2871.

Pacifici,G.M. & Nottoli,R. (1995). Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin.Pharmacokinet.*, 28(3): 235-269.

Pardio,V.T., Waliszewski,K.N., Landin,L.A., & Bautista,R.G. (2003). Organochlorine pesticide residues in cow's milk from a tropical region of Mexico. *Food Addit.Contam.*, 20(3): 259-269.

Park,D., Minor,M.D., & Propper,C.R. (2004). Toxic response of endosulfan to breeding and non-breeding female mosquitofish. *J Environ Biol*, 25(2): 119-124.

Parrón, T, Alarcón, R, Parrón, C, & Gálvez, R. (2005). Alteraciones congénitas del aparato genitourinario masculino y exposición a xenoestrógenos ambientales:plaguicidas. *Revista de Toxicología.Congreso de Toxicología.Murcia* 22(2): 133.

Pastore,L.M., Hertz-Picciotto,I., & Beaumont,J.J. (1997). Risk of stillbirth from occupational and residential exposures. *Occup.Environ.Med.*, 54(7): 511-518.

Paulozzi,L.J., Erickson,J.D., & Jackson,R.J. (1997). Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics*, 100(5): 831-834.

Paulozzi,L.J. (1999). International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ.Health Perspect.*, 107(4): 297-302.

Payan,J.P., Saillenfait,A.M., Bonnet,P., Fabry,J.P., Langonne,I., & Sabate,J.P. (1995). Assessment of the developmental toxicity and placental transfer of 1,2-dichloroethane in rats. *Fundam.Appl.Toxicol.*, 28(2): 187-198.

Payne,J., Rajapakse,N., Wilkins,M., & Kortenkamp,A. (2000). Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ.Health Perspect.*, 108(10): 983-987.

Pazos,P., Perez,P., Rivas,A., Nieto,R., Botella,B., Crespo,J., Olea-Serrano,F., Fernández,M.F., Exposito,J., Olea,N., & Pedraza,V. (1998). Development of a marker of estrogenic exposure in breast cancer patients. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 444: 29-40.

Penuela,G.A. & Barceló,D. (1998). Application of C-18 disks followed by gas chromatography techniques to degradation kinetics, stability and monitoring of endosulfan in water. *J Chromatography*, 795(93): 104.

Pereg,D., Dewailly,E., Poirier,G.G., & Ayotte,P. (2002). Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and placental CYP1A1 activity in Inuit women from northern Quebec. *Environ.Health Perspect.*, 110(6): 607-612.

Pérez-Gómez,P. (1996). Identificación y caracterización de productos químicos con actividad estrogénica. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Pew Environmental Health Commission. (1999). *Healthy from the Start: Why America Needs a Better System to Track and Understand Birth Defects and the Environment.* Johns Hopkins School of Public Health.

Pogoda,J.M. & Preston-Martin,S. (1997). Household pesticides and risk of pediatric brain tumors. *Environ.Health Perspect.*, 105(11): 1214-1220.

Polishuk,Z.W., Wassermann,D., Wassermann,M., Cucos,S., & Ron,M. (1977). Organochlorine compounds in mother and fetus during labor. *Environ.Res.*, 13(2): 278-284.

Porta,M., Kogevinas,M., Zumeta,E., Sunyer,J., Ribas-Fito,N., Ruiz,L., Jarrod,M., Vioque,J., Alguacil,J., Martin,P., Malats,N., & Ayude,D. (2002). Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish population: a puzzle without pieces and the protection of public health. *Gac.Sanit.*, 16(3): 257-266.

Porter,M.P., Faizan,M.K., Grady,R.W., & Mueller,B.A. (2005). Hypospadias in Washington State: maternal risk factors and prevalence trends. *Pediatrics*, 115(4): e495-e499.

Pozo Lora,R., Polo Villar,L.M., Jodral Villarejo,M., & Herrera Marteache,A. (1983). Hexachlorobenzene in Spanish margarines. *Rev.Sanid.Hig.Publica.(Madr)*, 57(1-2): 75-80.

Procianoy,R.S. & Schvartsman,S. (1981). Blood pesticide concentration in mothers and their newborn infants. Relation to prematurity. *Acta Paediatr.Scand.*, 70(6): 925-928.

Quintana,J., Marti,I., & Ventura,F. (2001). Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *J.Chromatogr.A*, 938(1-2): 3-13.

Rajapakse,N., Silva,E., & Kortenkamp,A. (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ.Health Perspect.*, 110(9): 917-921.

Ralph,J.L., Orgebin-Crist,M.C., Lareyre,J.J., & Nelson,C.C. (2003). Disruption of androgen regulation in the prostate by the environmental contaminant hexachlorobenzene. *Environ.Health Perspect.*, 111(4): 461-466.

Ramesh,A. & Ravi,P.E. (2003). Determination of residues of endosulfan in human blood by a negative ion chemical ionization gas chromatographic/mass spectrometric method: impact of long-term aerial spray exposure. *Pest.Manag.Sci*, 59(3): 252-258.

Ramos,L., Eljarrat,E., Hernández,L.M., Rivera,J., & González,M.J. (1999a). Levels of polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in comercial yoghurt samples in Spain. Comparision with different dairy products. *Analytica.Chimica.Acta*, 402: 241-252.

Ramos,L., Eljarrat,E., Hernández,L.M., Rivera,J., & González,M.J. (1999b). Comparative study of methodologies for the analysis of PCDDs and PCDFs in powdered full-fat milk. PCB, PCDD and PCDF levels in commercial samples from Spain. *Chemosphere*, 38(11): 2577-2589.

Ramos,L., Eljarrat,E., Hernández,L.M., Rivera,J., & González,M.J. (1999c). Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in commercial butter samples in Spain. *Chemosphere*, 38(13): 3141-3153.

Reichrtova,E., Ciznar,P., Prachar,V., Palkovicova,L., & Veningerova,M. (1999). Cord serum immunoglobulin E related to the environmental contamination of human placentas with organochlorine compounds. *Environ.Health Perspect.*, 107(11): 895-899.

Restrepo,M., Munoz,N., Day,N., Parra,J.E., Hernández,C., Blettner,M., & Giraldo,A. (1990). Birth defects among children born to a population occupationally exposed to pesticides in Colombia. *Scand.J.Work Environ.Health*, 16(4): 239-246.

Reynolds,F. & Knott,C. (1989). Pharmacokinetics in pregnancy and placental drug transfer. *Oxf.Rev.Reprod.Biol.*, 11: 389-449.

Rhains,M., Levallois,P., Dewailly,E., & Ayotte,P. (1999). Lead, mercury, and organochlorine compound levels in cord blood in Quebec, Canada. *Arch.Environ.Health*, 54(1): 40-47.

Ribas-Fito,N., Sala,M., Cardo,E., Mazon,C., De Muga,M.E., Verdu,A., Marco,E., Grimalt,J.O., & Sunyer,J. (2002). Association of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds with anthropometric measures at birth. *Pediatr.Res.*, 52(2): 163-167.

Ribas-Fito,N., Cardo,E., Sala,M., Eulalia de,M.M., Mazon,C., Verdu,A., Kogevinas,M., Grimalt,J.O., & Sunyer,J. (2003). Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics*, 111(5 Pt 1): e580-e585.

Riley,M.M., Halliday,J.L., & Lumley,J.M. (1998). Congenital malformations in Victoria, Australia, 1983-95: an overview of infant characteristics. *J Paediatr.Child Health*, 34(3): 233-240.

Rivas,A. (1999). Análisis de sustancias estrogénicas en tejido adiposo: Marcadores de exposición en cáncer de mama. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Rivas,A., Fernández,M.F., Cerrillo,I., Ibarluzea,J., Olea-Serrano,M.F., Pedraza,V., & Olea,N. (2001). Human exposure to endocrine disrupters: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS*, 109(3): 185-197.

Robinson,P.E., Mack,G.A., Remmers,J., Levy,R., & Mohadjer,L. (1990). Trends of PCB, hexachlorobenzene, and beta-benzene hexachloride levels in the adipose tissue of the U.S. population. *Environ Res*, 53(2): 175-192.

Rodier,P.M. (1994). Comparative postnatal neurologic development. In H.L.Needleman & D.Bellinger (Eds.), *Prenatal exposure to toxicants: Developmental consequences* pp. 3-23. Baltimore, MD, USA: Johns Hopkins University Press.

Rogan,W.J., Gladen,B.C., McKinney,J.D., Carreras,N., Hardy,P., Thullen,J., Tingelstad,J., & Tully,M. (1986a). Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects of maternal factors and previous lactation. *Am.J.Public Health*, 76(2): 172-177.

Rogan,W.J., Gladen,B.C., McKinney,J.D., Carreras,N., Hardy,P., Thullen,J., Tinglestad,J., & Tully,M. (1986b). Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J.Pediatr.*, 109(2): 335-341.

Rogan,W.J., Gladen,B.C., McKinney,J.D., Carreras,N., Hardy,P., Thullen,J., Tingelstad,J., & Tully,M. (1987). Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects on growth, morbidity, and duration of lactation. *Am.J.Public Health*, 77(10): 1294-1297.

Rogan,W.J., Gladen,B.C., Hung,K.L., Koong,S.L., Shih,L.Y., Taylor J.S., Wu,Y.C., Yang,D., Ragan,N.B., & Hsu,C.C. (1988). Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*, 241(4863): 334-336.

Routledge,E. & Sumpter,J. (1996). Estrogenicity activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ.Toxic.Chem.*, 15: 241-248.

Rueda-Domingo,M., López,N.E., Nogueras-Ocana,M., Lardelli-Claret,P., Jimenez-Moleon,J., & Zuluaga-Gómez,A. (2001). Risk factors for cryptorchidism. *Gac.Sanit.*, 15(5): 398-405.

Sagrera-Ruano,J., Domínguez-Boada,B., Méndez-Pérez,J.M., & Rodríguez-Ramírez,U. (2003). Testing for 16 organochlorine pesticides in bottled waters in Gran Canaria. *Alimentaria*, 344(87): 89.

Sahagún,A.M., Terán,M., García,J.J., Sierra,M., Fernández,N., & José-Díez,M. (1998). Organochlorine pesticide residues in muscle tissue of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, taken from four fish farms in Leon, Spain. *Food Addit.and Contam.*, 15(5): 501-505.

Sala,M., Ribas-Fito,N., Cardo,E., De Muga,M.E., Marco,E., Mazon,C., Verdu,A., Grimalt,J.O., & Sunyer,J. (2001). Levels of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds in cord blood: exposure across placenta. *Chemosphere*, 43(4-7): 895-901.

Salama,A.M., Bakry,N.M., & Abou-Donia,M.B. (1993). A review article on placental transfer of pesticides. *J Occup.Med.Toxicol.*, 2: 383-397.

Sánchez-Hernández,J.C., Borghini,F., Corral,A., & Grimalt,J.O. (2004). Field uptake rates of hydrophobic organic contaminants by semipermeable membrane devices: environmental monitoring considerations. *J Environ Monit.*, 6(11): 919-925.

Sarcinelli,P.N., Pereira,A.C., Mesquita,S.A., Oliveira-Silva,J.J., Meyer,A., Menezes,M.A., Alves,S.R., Mattos,R.C., Moreira,J.C., & Wolff,M. (2003). Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. *Environ.Res.*, 91(3): 143-150.

Savitz,D.A., Olshan,A.F., & Gallagher,K. (1996). Maternal occupation and pregnancy outcome. *Epidemiology*, 7: 269-274.

Savitz,D.A., Arbuckle,T., Kaczor,D., & Curtis,K.M. (1997). Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am.J.Epidemiol.*, 146(12): 1025-1036.

Saxena,M.C., Seth,T.D., & Mahajan,P.L. (1980a). Organo chlorine pesticides in human placenta and accompanying fluid. *Int.J.Enviro.Anal.Chem.*, 7(3): 245-251.

Saxena,M.C., Siddiqui,M.K., Bhargava,A.K., Seth,T.D., Krishnamurti,C.R., & Kutty,D. (1980b). Role of chlorinated hydrocarbon pesticides in abortions and premature labour. *Toxicology*, 17(3): 323-331.

Saxena,M.C., Siddiqui,M.K., Bhargava,A.K., Murti,C.R., & Kutty,D. (1981a). Placental transfer of pesticides in humans. *Arch.Toxicol.*, 48(2-3): 127-134.

Saxena,M.C., Siddiqui,M.K., Seth,T.D., Krishna Murti,C.R., Bhargava,A.K., & Kutty,D. (1981b). Organochlorine pesticides in specimens from women undergoing spontaneous abortion, premature of full-term delivery. *J.Anal.Toxicol.*, 5(1): 6-9.

Schade,G. & Heinzow,B. (1998). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *Sci.Total Environ.*, 215(1-2): 31-39.

Schantz,S.L., Jacobson,J.L., Humphrey,H.E., Jacobson,S.W., Welch,R., & Gasior,D. (1994). Determinants of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the sera of mothers and children from Michigan farms with PCB-contaminated silos. *Arch.Enviro.Health*, 49(6): 452-458.

Schecter,A., Startin,J., Wright,C., Papke,O., Ball,M., & Lis,A. (1996). Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in human placental and fetal tissues from the U.S. and in placentas from Yu-Cheng exposed mothers. *Chemosphere*, 32(3): 551-557.

Scheele,J.S. (1998). A comparison of the concentrations of certain pesticides and polychlorinated hydrocarbons in bone marrow and fat tissue. *J.Enviro.Pathol.Toxicol.Oncol.*, 17(1): 65-68.

Schwartz,D.A., Newsum,L.A., & Heifetz,R.M. (1986). Parental occupation and birth outcome in an agricultural community. *Scand.J.Work Environ.Health*, 12(1): 51-54.

Seba,D.B. & Snedaker,S.C. (1995). Frequency of occurrence of organochlorine pesticides in sea surface slicks in Atlantic and Pacific coastal waters. *Mar.Res.*, 4(27): 32.

Sever,L.E. (1995). Looking for causes of neural tube defects: where does the environment fit in? *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 6: 165-171.

Sharpe,R.M. & Skakkebaek,N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341(8857): 1392-1395.

Sharpe,R.M. (1995). Reproductive biology. Another DDT connection. *Nature*, 375(6532): 538-539.

Shekhar,P.V., Werdell,J., & Basrur,V.S. (1997). Environmental estrogen stimulation of growth and estrogen receptor function in preneoplastic and cancerous human breast cell lines. *J Natl.Cancer Inst.*, 89(23): 1774-1782.

Shen,H., Main,K.M., Kaleva,M., Virtanen,H., Haavisto,A.M., Skakkebaek,N.E., Toppari,J., & Schramm,K.W. (2005). Prenatal organochlorine pesticides in placentas from Finland: exposure of male infants born during 1997-2000. *Placenta*, 26: 512-514.

Shu,X.O. (1995). Maternal smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: Results from a prospective study. *Epidemiology*, 6: 115-120.

Siddiqui,M.K., Saxena,M.C., Bhargava,A.K., Seth,T.D., Murti,C.R., & Kutty,D. (1981). Agrochemicals in the maternal blood, milk, and cord blood: a source of toxicants for prenatals and neonates. *Environ.Res.*, 24(1): 24-32.

Siddiqui,M.K. & Saxena,M.C. (1985). Placenta and milk as excretory routes of lipophilic pesticides in women. *Hum.Toxicol.*, 4(3): 249-254.

Siddiqui,M.K., Srivastava,S., Srivastava,S.P., Mehrotra,P.K., Mathur,N., & Tandon,I. (2003). Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 76(1): 75-80.

Silva,E., Rajapakse,N., & Kortenkamp,A. (2002). Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ.Sci.Technol.*, 36(8): 1751-1756.

Skaare,J.U. & Polder,A. (1990a). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk of Norwegian women during lactation. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 19(5): 640-645.

Skaare,J.U. & Polder,A. (1990b). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk of Norwegian women during lactation. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 19(5): 640-645.

Skakkebaek,N.E. & Keiding,N. (1994). Changes in semen and the testis. *BMJ*, 309(6965): 1316-1317.

Skakkebaek,N.E., Rajpert-De,M.E., Jorgensen,N., Carlsen,E., Petersen,P.M., Giwercman,A., Andersen,A.G., Jensen,T.K., Andersson,A.M., & Muller,J. (1998). Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS*, 106(1): 3-11.

Skakkebaek,N.E., Rajpert-De,M.E., & Main,K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum.Reprod.*, 16(5): 972-978.

Smith,A.G., Dinsdale,D., Cabral,J.R., & Wright,A.L. (1987). Goitre and wasting induced in hamsters by hexachlorobenzene. *Arch Toxicol*, 60(5): 343-349.

Smith,D. (1999). Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *Int J Epidemiol.*, 28(2): 179-188.

Sonnenschein,C., Soto,A.M., Fernández,M.F., Olea,N., Olea-Serrano,M.F., & Ruiz-López,M.D. (1995). Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin.Chem.*, 41(12 Pt 2): 1888-1895.

Soto,A.M., Lin T-M, & Justicia H (1992). An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In T.Colborn & Clement C (Eds.), *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection* pp. 295-309. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing.

Soto,A.M., Chung,K.L., & Sonnenschein,C. (1994). The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect*, 102(4): 380-383.

Soto,A.M., Sonnenschein,C., Chung,K.L., Fernández,M.F., Olea,N., & Serrano,F.O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 7: 113-122.

Soto,A.M., Fernández,M.F., Luizzi,M.F., Oles Karasko,A.S., & Sonnenschein,C. (1997). Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ.Health Perspect.*, 105 Suppl 3: 647-654.

Soule,H.D., Vázquez,D., Albert,S., & Brennan,M.J. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst*, 51: 1400-1413.

Spitz,M.R., Sider,J.G., Pollack,E.S., Lynch,H.K., & Newell,G.R. (1986). Incidence and descriptive features of testicular cancer among United States whites, blacks, and Hispanics, 1973-1982. *Cancer*, 58(8): 1785-1790.

Spyker,J.M. (2000). Assessing the impact of low chemicals on development:behavioral and latent effects. *Fed Proc*, 34: 1835-1844.

Steingraber,S. (2001). *Having Faith: An Ecologist's Journey to Motherhood*. Cambridge: Perseus Publishing.

Steinmetz,R., Young,P.C., Caperell-Grant,A., Gize,E.A., Madhukar,B.V., Ben-Jonathan,N., & Bigsby,R.M. (1996). Novel estrogenic action of the pesticide residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 56(23): 5403-5409.

Stresser,D.M. & Kupfer,D. (1998). Human cytochrome P450-catalyzed conversion of the proestrogenic pesticide methoxychlor into an estrogen. Role of CYP2C19 and CYP1A2 in O-demethylation. *Drug Metab Dispos.*, 26(9): 868-874.

Sun,Y., Irie,M., Kishikawa,N., Wada,M., Kuroda,N., & Nakashima,K. (2004). Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed.Chromatogr.*, 18(8): 501-507.

Suzuki,K. & Martin,P.M. (1994). Neurotoxicants and the Developing Brain. In G.J.Harry (Ed.), *Developmental Neurotoxicology* pp. 9-32. Boca Raton: CRC Press.

Swan,S.H., Elkin,E.P., & Fenster,L. (1997). Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ.Health Perspect.*, 105(11): 1228-1232.

Swerdloff,R.S., Overstreet,J.W., Sokol,R.Z., & Rajfer,J. (1985). UCLA conference. Infertility in the male. *Ann.Intern.Med.*, 103(6 (Pt 1)): 906-919.

Thornton,J. (2000). *Pandora's Poison: Chlorine, health, and a new environmental strategy.* Cambridge: MIT Press.

To-Figueras,J., Rodamilans,M., Gómez,J., & Corbella,J. (1986). Hexachlorobenzene residues in the general population of Barcelona (Spain). *IARC Sci Publ.*,(77): 147-148.

To-Figueras,J., Barrot,C., Rodamilans,M., Gómez-Catalan,J., Torra,M., Brunet,M., Sabater,F., & Corbella,J. (1995). Accumulation of hexachlorobenzene in humans: a long standing risk. *Hum Exp Toxicol*, 14(1): 20-23.

Toppari,J., Larsen,J.C., Christiansen,P., Giwercman,A., Grandjean,P., Guillette,L.J., Jr., Jegou,B., Jensen,T.K., Jouannet,P., Keiding,N., Leffers,H., McLachlan,J.A., Meyer,O., Muller,J., Rajpert-De,M.E., Scheike,T., Sharpe,R., Sumpter,J., & Skakkebaek,N.E. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ.Health Perspect.*, 104 Suppl 4: 741-803.

Travis,C.C., Hattemer-Frey,H.A., & Arms,A.D. (1988). Relationship between dietary intake of organic chemicals and their concentrations in human adipose tissue and breast milk. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 17(4): 473-478.

Ulrich,E.M., Caparell-Grant,A., Jung,S.H., Hites,R.A., & Bigsby,R.M. (2001). Environmental xenoestrogen tissue concentrations correlated to biological responses in mice. *Environ.Health Perspect.*, 109: 303.

United Nations Environment Programme. (2002). Persistent Organic Pollutants. Viewed on October 31.

Urieta,I., Jalon,M., & Eguilero,I. (1996). Food surveillance in the Basque Country (Spain). II. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron and zinc through the Total Diet Study, 1990/91. *Food Addit.Contam*, 13(1): 29-52.

Ursinyova,M. & Masanova,V. (2005). Cadmium, lead and mercury in human milk from Slovakia. *Food Addit.Contam*, 22(6): 579-589.

Valenzuela,B. (1996). Determinación del efecto estrogénico de plaguicidas organoclorados. Tesis Doctoral.

Van de Plassche, E. J., Schwegler, AMGR., Rasenberg, M., & Schouten, G. (2003). DDT in dicofol. www.unepce.org. June.

Van Ert,M. & Sullivan,J.B. (1992). Organochlorine pesticides. In J.B.Sullivan & G.R.Krieger (Eds.), *Hazardous materials toxicology. Clinical principles of environmental health* pp. 1027-1052. Baltimore: Williams & Wilkins.

Van Velsen,F.L., Danse,L.H., van Leeuwen,F.X., Dormans,J.A., & Van Logten,M.J. (1986). The subchronic oral toxicity of the beta-isomer of hexachlorocyclohexane in rats. *Fundam.Appl.Toxicol*, 6(4): 697-712.

Viana,E., Molto,J.C., & Font,G. (1996). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. *J.Chromatogr.A.*, 754(1-2): 437-444.

Vidaeff,A.C. & Sever,L.E. (2005). In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod.Toxicol.*, 20(1): 5-20.

Vidal,J.L.M., González,F.J.E., Glass,C.R., Galera,M.M., & Cano,M.L.C. (1997). Analysis of lindane, alpha-endosulfan and beta endosulfan and endosulfan sulfate in greenhouse air by gas-chromatography source. *J.Chromatog.*, 765(1): 99-108.

Villalobos,M., Olea,N., Brotons,J.A., Olea-Serrano,M.F., Ruiz de Almodóvar,J.M., & Pedraza,V. (1995). The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ.Health Perspect.*, 103(9): 844-850.

Vingard,E., Lundberg,I., Haal,E.K., & Brolin,E. (2002). [Working environment within health care services--from words to action]. *Lakartidningen*, 99(22): 2532-2536.

Virtanen,H.E., Kaleva,M., Haavisto,A.M., Schmidt,I.M., Chellakooty,M., Main,K.M., Skakkebaek,N.E., & Toppari,J. (2001). The birth rate of hypospadias in the Turku area in Finland. *APMIS*, 109(2): 96-100.

Vom Saal,F.S., Nagel,S.C., Palanza,P., Boechler,M., Parmigiani,S., & Welshons,W.V. (1995). Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicol Lett.*, 77(1-3): 343-350.

Vonier,P.M., Crain,D.A., McLachlan,J.A., Guillette,L.J., Jr., & Arnold,S.F. (1996). Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ.Health Perspect.*, 104(12): 1318-1322.

Vreugdenhil,H.J., Slijper,F.M., Mulder,P.G., & Weisglas-Kuperus,N. (2002). Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environ.Health Perspect.*, 110(10): A593-A598.

Waliszewski,S.M., Aguirre,A.A., Infanzon,R.M., Rivera,J., & Infanzon,R. (1998). Time trend of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue in Veracruz, Mexico: 1988-1997 survey. *Sci.Total Environ.*, 221(2-3): 201-204.

Waliszewski,S.M., Aguirre,A.A., Infanzon,R.M., López-Carrillo,L., & Torres-Sánchez,L. (2000a). Comparison of organochlorine pesticide levels in adipose tissue and blood serum from mothers living in Veracruz, Mexico. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 64(1): 8-15.

Waliszewski,S.M., Aguirre,A.A., Infanzon,R.M., & Siliceo,J. (2000b). Partitioning coefficients of organochlorine pesticides between mother blood serum and umbilical blood serum. *Bull.Environ.Contam Toxicol.*, 65(3): 293-299.

Waliszewski,S.M., Aguirre,A.A., Infanzon,R.M., & Siliceo,J. (2000c). Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud Publica Mex.*, 42(5): 384-390.

Waliszewski,S.M., Aguirre,A.A., Infanzon,R.M., Silva,C.S., & Siliceo,J. (2001). Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz, Mexico. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 40(3): 432-438.

Waliszewski,S.M., Aguirre,A.A., Infanzon,R.M., & Siliceo,J. (2002). Persistent organochlorine pesticide levels in maternal blood serum, colostrum, and mature milk. *Bull.Environ.Contam Toxicol.*, 68(3): 324-331.

Wang,J. & Wang,B. (2002). Study on risk factors of cryptorchidism. *Zhonghua Liu Xing.Bing.Xue.Za Zhi.*, 23(3): 190-193.

Wang,S.L., Lin,C.Y., Guo,Y.L., Lin,L.Y., Chou,W.L., & Chang,L.W. (2004). Infant exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs)--correlation between prenatal and postnatal exposure. *Chemosphere*, 54(10): 1459-1473.

Wassermann,M., Ron,M., Bercovici,B., Wassermann,D., Cucos,S., & Pines,A. (1982). Premature delivery and organochlorine compounds: polychlorinated biphenyls and some organochlorine insecticides. *Environ.Res.*, 28(1): 106-112.

Weidner,I.S., Moller,H., Jensen,T.K., & Skakkebaek,N.E. (1998). Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ.Health Perspect.*, 106(12): 793-796.

Weidner,I.S., Moller,H., Jensen,T.K., & Skakkebaek,N.E. (1999). Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J.Urol.*, 161(5): 1606-1609.

Weisskopf,M.G., Anderson,H.A., Hanrahan,L.P., Kanarek,M.S., Falk,C.M., Steenport,D.M., & Draheim,L.A. (2005). Maternal exposure to Great Lakes sport-caught fish and dichlorodiphenyl dichloroethylene, but not polychlorinated biphenyls, is associated with reduced birth weight. *Environ.Res.*, 97(2): 149-162.

Weybridge. (1996). Report of the Proceedings of the European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. UNEP. United Kingdom.

Whyatt,R.M. & Perera,F.P. (1995). Application of biologic markers to studies of environmental risks in children and the developing fetus. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 6: 105-110.

Wilkinson,T.J., Colls,B.M., & Schluter,P.J. (1992). Increased incidence of germ cell testicular cancer in New Zealand Maoris. *Br.J.Cancer*, 65(5): 769-771.

Willis,W.O., Depeyster,A., Molgaard,C.A., Walker,C., & Mackendrick,T. (1993). Pregnancy Outcome Among Women Exposed to Pesticides Through Work Or Residence in An Agricultural Area. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 35(9): 943-949.

Wirth,E.F., Lund,S.A., Fulton,M.H., & Scott,G.I. (2002). Reproductive alterations in adult grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, following sublethal, chronic endosulfan exposure. *Aquat.Toxicol.*, 59(1-2): 93-99.

Wolff,M.S. & Anderson,H.A. (1999). Environmental contaminants and body fat distribution. *Cancer Epidemiol.Biomark.Prev.*, 8: 951-952.

Wong, M. Environmental Studies No. 49 Chemical Residues in Fish and Wildlife Harvested in Northern Canada, Department of Indian Affairs and Northern Development. (1986).

World Health Organization (WHO). Congenital Malformations Worldwide: A report from the international clearinghouse for birth defects monitoring systems. (1991). Elsevier, Oxford, UK.

WWF European Toxic Program Report. April. (2000).

You, L., Gazi, E., rchibeque-Engle, S., Casanova, M., Conolly, R.B., & Heck, H.A. (1999). Transplacental and lactational transfer of p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 157(2): 134-144.

Yu, M.L., Hsu, C.C., Gladen, B.C., & Rogan, W.J. (1991). In utero PCB/PCDF exposure: relation of developmental delay to dysmorphology and dose. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13(2): 195-202.

Zahm, S.H. & Ward, M.H. (1998). Pesticides and childhood cancer. *Environ. Health Perspect.*, 106 Suppl 3: 893-908.

Zumbado, M., Goethals, M., varez-Leon, E.E., Luzardo, O.P., Cabrera, F., Serra-Majem, L., & Dominguez-Boada, L. (2005). Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). *Sci. Total Environ.*, 339(1-3): 49-62.

9. ANEXO I



CUESTIONARIO

ESTUDIO SOBRE SALUD REPRODUCTIVA

Y FACTORES MEDIOAMBIENTALES

Hospital: *Clínico Universitario San Cecilio*

Servicio: *Obstetricia y Ginecología*

Encuestador:

Identificación:

--	--	--	--

Código:

--	--	--	--

Felicitaciones por el nacimiento de su hijo.

Se le invita a participar en un estudio sobre Salud Reproductiva y factores medioambientales. La participación es totalmente voluntaria.

Por favor conteste a las preguntas del entrevistador.

El cuestionario contiene preguntas relacionadas con su embarazo reciente y el período anterior a éste. Otras preguntas están relacionadas con el parto y el nacimiento de su hijo.

- A) Preguntas Básicas
- B) Embarazo último y embarzos previos
- C) Aspectos generales de su Salud
- D) Educación y Condiciones de Trabajo
- E) Estilo de Vida

Debe contestar cuantas preguntas sea posible. Algunas de ellas pueden presentar dificultad, pero por favor intente contestarlas de forma precisa. Aunque la mayoría de las cuestiones deberán ser contestadas por usted algunas preguntas se refieren al padre del niño.

Cómo rellenar el cuestionario:

- Cada parte (A-E) puede ser contestada independientemente.
- Algunas preguntas pueden ser contestadas SI o NO, en otras se deberá elegir entre diversas opciones. Elija la/s opción/opciones que le parezcan más correctas, en su caso, y escriba el número/s apropiado/s en la casilla de la derecha o marque la casilla.
- Hay algunas preguntas abiertas en las que usted deberá escribir un texto, por ej. el nombre de un medicamento, o indicar el número exacto en la casilla, por ej. el número esperado de

hijos. Preguntas relacionadas con la duración de acontecimientos, por ej. ingreso en el hospital, pueden ser contestadas indicando la/s semana/s de gestación en la/s cual/es ocurrió.

- Si usted no sabe la respuesta correcta puede escribir "?" en alguna casilla o línea.*
- Por favor vea que hay dos numeraciones independientes en el cuestionario. La única numeración que es relevante para usted, es la primera de la izquierda, por ej. cuando pase de pregunta. El número pequeño de las casillas de la parte derecha de la página sirve exclusivamente para introducir los datos en un programa de ordenador.*
- Si tiene alguna pregunta o comentario el encuestador atenderá sus requerimientos.*
- Puede contactar con su médico o con nosotros en el número de teléfono*

¡Gracias por su cooperación!

CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS

Nombre (por favor escriba en letras mayúsculas)	
Fecha de nacimiento de la madre	
No. Seguridad Social	
Identificación	
Código	
Dirección:	
	Población
	Provincia
	D.P.
No. Teléfono del domicilio.	
No. Teléfono del trabajo.	
No. Teléfono de posibles contactos	
Fecha en la que completó el cuestionario.	<input type="text"/>
Fecha del parto.	
Hospital elegido para el parto.	

HOJA DE NO RESPUESTA

Dirigido a pacientes que por diversos motivos no han deseado participar en el estudio.

¿Ha sido previamente informada del estudio?

Sí No

Motivo de no participación:

No quiere NS/NC

A) PREGUNTAS BASICAS

1. Fecha de nacimiento del padre (dd -mm -aa)	A3 <input type="text"/>
2. Altura de la madre en cm. Sea tan precisa como sea posible.	A6 <input type="text"/>
3. ¿Cuál era su peso antes del embarazo en kg ?Puede usar un decimal, p.ej. 60.5 Kg o 61.0 Kg.	A8 <input type="text"/>
4. ¿Cuál es su peso actual en Kg? (Al término del embarazo previo al parto)	A9 <input type="text"/>

B) EMBARAZO ÚLTIMO Y EMBARAZOS PREVIOS

1. ¿Ha usado algún anticonceptivo hormonal (píldora, diafragma o tratamiento hormonal) antes de que supiera que estaba embarazada (en las primeras semanas del embarazo) ? 1. Sí 2. No	B12 <input type="checkbox"/>
2. ¿Cuándo dejó de usar métodos anticonceptivos (mm-aa)?Métodos anticonceptivos incluidos, preservativo, DIU, anticonceptivos orales, diafragma, gel, crema, espumas, método de Ogino, y otros (p.ej. interrumpir el coito).	B15 <input type="text"/>
3. ¿ Cuánto tiempo pasó desde que dejó los anticonceptivos (de cualquier tipo) hasta que se quedó embarazada? (El tiempo durante el cual mantuvo relaciones sexuales (coito) sin usar anticonceptivos) Menos de 2 meses 2-4 meses 5-6 meses 7-9 meses 10-12 meses 1-2 años 7. Más de 2 años	B17 <input type="checkbox"/>
4. ¿ Ha estado sometido a tratamiento de infertilidad, alguno de los miembros de la pareja, en relación con este último embarazo? Sí 2. No (ir a la pregunta 8)	B19 <input type="checkbox"/>
Si es sí, ¿qué tratamiento recibió? Por favor marque la casilla apropiada. Puede elegir varias opciones y marcar varias casillas. Tratamiento hormonal (ir a la pregunta 8) Inseminación Fertilización in vitro/ ICSI Operación. quirúrgica Otros	B20-24 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

6. Si fue tratada por inseminación ó IVF/ICSI, por favor responda si el semen fué 1. de su marido 2. de un donante	B25 <input type="checkbox"/>
7. Si fue tratada por inseminación ó IVF/ICSI, por favor responda si el óvulo fue 1. suyo propio 2. de una donante	<input type="checkbox"/> B26
8. ¿Ha tomado medicación alguna mientras intentaba quedarse embarazada ? 1. Sí (por favor complete esta tabla) 2. No (ir a la pregunta 9)	<input type="checkbox"/> B27

Si es sí, complete la siguiente tabla de forma tan precisa como le sea posible. Si no puede recordar el nombre del medicamento deje el espacio vacío.

Nombre del medicamento	Enfermedad	Dosis Diaria	No. de días
Ej. Paracetamol	Dolor muscular	500 mg x 3	3
B28	B29	B30	B31
B32	B33	B34	B35
B36	B37	B38	B39
B40	B41	B42	B43

9. ¿Ha sufrido algunos de los problemas/enfermedades mencionados abajo? Si es sí, por favor indique durante qué semana/s de gestación

Problema	No	Sí	Semana de Gestación
Pérdida de líquido amniótico		B46	B47
Naúseas		B60	B61
Vómitos		B62	B63

10. ¿ Le han puesto un empaste dental blanco (no metálico) durante este embarazo ? 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 12)	B66 <input type="checkbox"/>
11. Si es sí, ¿durante qué semana/s de la gestación ? Señale la/s casilla/s apropiada/s. 1. Semana 0-13. 2. Semana 14-26 3. Semana 27-42	B67-69 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
12. ¿Ha tenido alguna hemorragia vaginal durante su embarazo ? Esta pregunta también incluye manchas 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 14)	B83 <input type="checkbox"/>

<p>13. Si es sí, ¿durante qué trimestre de la gestación tuvo una hemorragia ..</p> <p>1. durante el primer trimestre</p> <p>2. durante el segundo trimestre</p> <p>3. durante el tercer trimestre</p>	<p>B85-87</p> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<p>14. ¿Ha tomado alguna medicina durante este embarazo ?</p> <p>1. Sí (por favor complete la siguiente tabla)</p> <p>2. No (ir a la pregunta 15)</p>	<p>B91</p> <input type="checkbox"/>

Si es SI, por favor complete la siguiente tabla tan cuidadosamente como sea posible. Por favor recuerde además indicar el uso de pomadas tales como cremas de corticoides. Si no puede recordar el nombre del medicamento deje la tabla vacía.

Nombre	Enfermedad	Dosis diaria	No. De días	Semana de gestación
Ej. Paracetamol	Dolor muscular	500 mg x 3	2	14
B92	B93	B94	B95	B96
B97	B98	B99	B100	B101
B102	B103	B104	B105	B106
B107	B108	B109	B110	B111

<p>15. Tuvo algún episodio febril durante las primeras 14 semanas de su embarazo?</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No</p>	<p>B112</p> <input type="checkbox"/>
<p>16. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre durante este embarazo?</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No</p>	<p>B120</p> <input type="checkbox"/>
<p>17. ¿Ha estado embarazada con anterioridad?</p> <p>1. Sí (por favor complete la siguiente tabla)</p> <p>2. No (ir a la sección C)</p>	<p>B121</p> <input type="checkbox"/>

La siguiente tabla resume algunos embarazos previos que usted podría haber tenido. Las primeras dos líneas dan ejemplos de cómo utilizar la tabla. Por favor intente ser lo más precisa posible. En la columna "Enfermedades" puede escribir algunos de las enfermedades mencionadas en el apartado C - b)1 ó alteraciones cromosómicas.

No	Año	Duración emb. (semanas)	Sexo	Peso (g)	Enferm.	Aborto	M. neonatal	Mal parto	Emb E.U.
Ej.	1980	5				X			
Ej.	1992	39	Niña	3010					
1/B122-130									
2/B131-139									
3/B140-148									
4/B149-157									
5/B158-166									
6/B167-175									
7/B176-184									
8/B185-193									
9/B194-202									
10/B203-211									

C. ASPECTOS GENERALES DE LA SALUD:

a) Ginecología y Obstetricia

1. ¿Qué edad tenía usted cuando tuvo su primera menstruación/regla? <i>Escriba su edad en años completos, si fuera posible también en medios años. P.ej. 13.0 ó 12.5</i>	<input type="text"/> ^{C1}
2. ¿ Ha usado alguna vez el DIU como método anticonceptivo ? 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 4</i>)	4.1.1.1 ^C <input type="text"/> ⁴
3. Si ha usado un DIU hormonal, por favor indique por cuanto tiempo. <i>Añadir los años en los que lo usó, incluso si ha habido interrupciones en su empleo</i> 1. Menos de un año 2. 1-2 años 3. 2-5 años 4. Más de 5 años	<input type="text"/> ^{C6}
4. ¿Ha usado alguna vez anticonceptivos orales ó implantes ? 1. Sí 2. No	<input type="text"/> ^{C7}
5. Si es SI, ¿ Durante cuánto tiempo? <i>Añadir los años que incluso ha habido interrupciones</i> 1. Menos de 1 año 2. 1-2 años 3. 3-5 años 4. 6-10 años 5. 11-15 años 6. Más de 15 años	<input type="text"/> ^{C8}

b) Salud general

Esta parte del cuestionario se refiere a aspectos generales de la salud. Si tiene (ha tenido) algunas de las enfermedades abajo mencionadas.

1. ¿Ha tenido alguna de las siguientes enfermedades? La tabla debe ser completada por la madre y el padre, marcando SI o NO. Por favor complete la misma información para los/as hermanos/as del niño esperado.

	Madre		Padre		Hermano I		Hermano II	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
RIÑÓN/ VEJIGA								
Falta de un riñón C140-143								
GÓNADAS								
Hipospadias C176-178								
Epispadia C179-181								
Mala apertura de la uretra C182-184								
Criptorquidismo(uni- o bilateral) C201-203								

D. EDUCACION Y CONDICIONES DE TRABAJO

Esta sección consta de dos partes : las preguntas 1-15 debe contestarlas la madre, las preguntas 16-29 el padre

<p>1. ¿Cuál es su estado civil ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Casada 2. Conviviendo con su pareja 3. Soltera 	<p style="text-align: right;">D1</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>2. ¿Cuál es su trabajo actual/ qué soporte financiero recibe? Elija sólo una opción .</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor /Trabajador en una finca (<i>ir a la pregunta 7</i>) 2. Otro tipo de negocio propio (<i>ir a la pregunta 5</i>) 3. Trabajo con su esposo (<i>ir a la pregunta 5</i>) 4. Trabajo especializado (<i>ir a la pregunta 5</i>) 5. Trabajo no especializado (<i>ir a la pregunta 5</i>) 6. Empleado/Servicio público (<i>ir a la pregunta 5</i>) 7. Recibiendo educación/ Formación (<i>ir a la pregunta 3</i>) 8. Jubilación anticipada/ Pensionista (<i>ir a la pregunta 3</i>) 9. Ama de casa/Sin otro trabajo (<i>ir a la pregunta 3</i>) 10. Subsidio de desempleo (<i>ir a la pregunta 3</i>) 11. Maternidad ó Permiso de Maternidad (<i>ir a la pregunta 3</i>) 12. Otros (<i>ir a la pregunta 3</i>) 	<p style="text-align: right;">D2</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>3. ¿Ha tenido durante los últimos 3 años trabajo durante 3 meses ó más ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 10</i>) 	<p style="text-align: right;">D3</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>

<p>4. ¿Qué ocupación tuvo mas recientemente (durante 3 meses o más)?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor/Trabajo en una finca <i>(ir a la pregunta 7)</i> 1. Otro tipo de negocio propio <i>(ir a la pregunta 8)</i> 2. Trabajo con su cónyuge <i>(ir a la pregunta 8)</i> 3. Trabajo especializado <i>(ir a la pregunta 5)</i> 4. Trabajo no especializado <i>(ir a la pregunta 5)</i> 5. Empleado/ Servicio público <i>(ir a la pregunta 9)</i> 6. Otro <i>(ir a la pregunta 9)</i> 	<p>D4</p> <input data-bbox="1385 517 1469 595" type="checkbox"/>
<p>5. ¿Tiene algún empleado en su trabajo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No <i>(ir a la pregunta 9)</i> 	<p>D5</p> <input data-bbox="1385 667 1469 745" type="checkbox"/>
<p>6. ¿Cuántos empleados tiene o ha tenido en total en su trabajo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1-10 <i>(ir a la pregunta 9)</i> 2. 11-50 <i>(ir a la pregunta 9)</i> 3. Más de 50 <i>(ir a la pregunta 9)</i> 	<p>D6</p> <input data-bbox="1385 842 1469 909" type="checkbox"/>
<p>7. ¿Cómo de grande es/era su finca (incluida la parte arrendada, no incluida la dada en arriendo).</p> <p style="text-align: center;">No. De hectáreas: _____</p>	<p>D7</p> <input data-bbox="1385 999 1469 1066" type="checkbox"/>
<p>8. ¿Cuántos empleados tiene su plantilla (sin incluirse usted y su cónyuge) ?</p> <p style="text-align: center;">No. De empleados: _____</p>	<p>D8</p> <input data-bbox="1385 1189 1469 1256" type="checkbox"/>
<p>9. ¿Cuál es su ocupación exacta? Por favor de una descripción precisa (p.ej. principal encargado de la oficina de hacienda)_</p>	<p>D9</p> <input data-bbox="1385 1301 1469 1368" type="checkbox"/>
<p>10. ¿Ha completado alguna formación educacional? Por favor considere solo la formación que sea cualificada.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No <i>(ir a la pregunta 14)</i> 	<p>D10</p> <input data-bbox="1385 1447 1469 1525" type="checkbox"/>
<p>11. Si es SI, ¿qué cualificación tiene?. Si tiene varias (p.ej formación en un trabajo especializado y graduación universitaria), por favor indique la de mayor grado:</p> <p>_____</p>	<p>D11</p> <input data-bbox="1385 1671 1469 1738" type="checkbox"/>
<p>12. ¿Cuánto duró su formación ?</p> <p style="text-align: center;">Años: _____</p> <p style="text-align: center;">Meses: _____</p>	<p>D12-13</p> <input data-bbox="1385 1805 1469 1883" type="checkbox"/> <input data-bbox="1385 1827 1469 1883" type="checkbox"/>

<p>13. ¿A qué grupo pertenece su formación ? <i>Por favor elija sólo una respuesta, la formación más cualificada.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sin estudios 2. Estudios primarios 3. Estudios medios 4. Estudios superiores 3. Formación profesional 5. Diplomatura 	<p>D14</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>14. ¿Ha estado expuesto - bajo su consentimiento - a productos químicos en su trabajo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 16</i>) 	<p>D15</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>15. Si es SI, ¿a qué productos químicos?. <i>Escriba el nombre, tipo o para qué ha usado el producto</i></p> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	<p>D16</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>16. (Las preguntas 16-29 deberán ser contestadas por el padre) ¿Cuál es su ocupación/ de qué vive? <i>Elija solo una opción.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor/Trabajador en una finca (<i>ir a la pregunta 21</i>) 2. Otro tipo de negocio propio (<i>ir a la pregunta 19</i>) 3. Trabajo con su esposa (<i>ir a la pregunta 19</i>) 4. Trabajo especializado (<i>ir a la pregunta 19</i>) 5. Trabajo no especializado (<i>ir a la pregunta 19</i>) 6. Empleado/Servicio Publico (<i>ir a la pregunta 19</i>) 7. Recibiendo educación/ Formación (<i>ir a la pregunta 17</i>) 8. Jubilación anticipada/Pensionista (<i>ir a la 17</i>) 9. Amo de casa / Sin otro empleo (<i>ir a la pregunta 17</i>) 10. Subsidio de desempleo (<i>ir a la pregunta 17</i>) 11. Permiso de Paternidad (<i>ir a la pregunta 17</i>) 12. Otros (<i>ir a la pregunta 17</i>) 	<p>D17</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>17. ¿Ha tenido durante los ultimos 3 años un trabajo durante 3 meses o más ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 24</i>) 	<p>D18</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
<p>18. ¿ Qué ocupación tuvo mas recientemente (durante 3 meses o más) ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agricultor/Trabajo en una finca (<i>ir a la pregunta 21</i>) 2. Otro tipo de negocio propio (<i>ir a la pregunta 22</i>) 3. Trabajo con su cónyuje (<i>ir a la pregunta 22</i>) 4. Trabajo especializado (<i>ir a la pregunta 19</i>) 5. Trabajo no especializado(<i>ir a la pregunta 19</i>) 6. Empleado /Servicio Público (<i>ir a la pregunta 23</i>) 7. Otro (<i>ir a la pregunta 23</i>) 	<p>D19</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>

<p>19. ¿Tiene algún empleado en su trabajo ?</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D20
<p>20. ¿Cuántos empleados tiene o ha tenido en total en su trabajo ?</p> <p>1. 1-10 (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p> <p>2. 11-50 (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p> <p>3. Más de 50 (<i>ir a la pregunta 23</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D21
<p>21. ¿Cómo de grande es /era la finca (incluida la parte arrendada , no incluida la dada en arriendo) ?</p> <p>No. de hectáreas _____</p>	<input type="checkbox"/> D22
<p>22. ¿Cuántos empleados tiene su plantilla (sin incluirse usted ni su cónyuge) ?</p> <p>No. de empleados: _____</p>	<input type="checkbox"/> D23
<p>23. ¿Cuál es su ocupación exacta?. Por favor dé una descripción precisa (p.ej. principal encargado de la oficina de Hacienda)</p>	<input type="checkbox"/> D24
<p>24. ¿Ha completado alguna formación educacional? Por favor considere solo la formación que sea cualificada</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No (<i>ir a la pregunta 28</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D25
<p>25. Si es SI, ¿qué cualificación tiene? Si tiene varias (p.ej. formación en un trabajo especializado y graduación universitaria), por favor indique la de mayor grado.</p> <p>_____</p>	<input type="checkbox"/> D26
<p>26. ¿Cuánto duró su formación ?</p> <p>Años: _____</p> <p>Meses: _____</p>	<input type="checkbox"/> D27-28
<p>27. ¿A qué grupo pertenece su formación? Por favor elija solo una respuesta, la formación mas cualificada.</p> <p>1. Sin estudios</p> <p>2. Estudios primarios</p> <p>3. Estudios medios</p> <p>4. Estudios superiores</p> <p>5. Formación profesional</p> <p>6. Diplomatura.</p>	<input type="checkbox"/> D29
<p>28. ¿Ha estado expuesto -bajo su consentimiento- a productos químicos en su trabajo ?</p> <p>1. Sí</p> <p>2. No (<i>ir a la seccion E</i>)</p>	<input type="checkbox"/> D30
<p>29 Si es SI, ¿qué productos químicos?. Escriba el nombre, tipo o para qué se usa el producto.</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<input type="checkbox"/> D31

E. ESTILO DE VIDA

<p>1. ¿ Ha usado algún cosmético durante su embarazo (la pregunta no incluye maquillaje) ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 5) 	<p style="text-align: right;">E1</p> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>
<p>2. Si es SI , ¿qué tipo de cosmético ha usado? <i>Puede elegir varias opciones de la lista de abajo y marcar la /s casilla/s apropiada/s</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Crema..... 2. Loción..... 3. Ungüento..... 4. Aceite..... 5. Polvos..... 6. Otros..... 	<p style="text-align: right;">E2-7</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>3. Si es SI , ¿para qué parte del cuerpo usó los cosméticos? <i>Puede elegir varias opciones de la lista de abajo y marcar la/s casilla/s apropiada/s</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Todo el cuerpo..... 2. Brazos y/o piernas..... 3. Parte superior del cuerpo..... 4. Parte inferior del cuerpo..... 5. Sólo barriga..... 6. Varias..... 	<p style="text-align: right;">E8-13</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>4. Si es SI, ¿con qué frecuencia usó los cosméticos. ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diariamente 2. Más de una vez a la semana 3. Más de una vez al mes 4. Menos de una vez al mes/rara vez. 	<p style="text-align: right;">E14</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 30px; margin: 0 auto;"></div>
<p>5a. ¿Se ha teñido el pelo, ondulado, hecho permanente o echado mechas durante su embarazo? Esta pregunta no incluye champú colorante. <i>Puede elegir varias opciones de la lista de abajo y marcar la/s casilla/s.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No (ir a la pregunta 6)..... 2. Si, mechas..... 3. Sí,tinte..... 4. Sí, hecho permanente-ondulada..... 	<p style="text-align: right;">E15-18</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>5b. Si es SI, ¿durante qué semana de la gestación? (Marque la/s casilla/s apropiada/s).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Semana 0-13..... 2. Semana 14-26..... 3. Semana 27-42..... 	<p style="text-align: right;">E19-21</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div>
<p>5c. Si es SI, ¿cuántas veces se ha teñido el pelo, ondulado, hecho permanente ó echado mechas? Introduzca el número total en la casilla. _____</p>	<p style="text-align: right;">E22</p> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>

6. ¿Ha tomado alguna dieta complementaria durante el embarazo ? 1. Sí (por favor complete la siguiente tabla) 2. No (ir a la pregunta 7)	E23 <input type="checkbox"/>

Por favor, añada dietas suplementarias, tales como medicina alternativa, té de hierbas. En la columna "frecuencia" puede responder una de las tres posibilidades: diariamente, más de una vez a la semana, menos de una vez a la semana.

	Nombre del producto	Frecuencia	Semana de Gestación
Ej.	Vitamina C	Diariamente	Desde la 12 a ahora
Vitaminas Esenciales	E24	E25	E26
Multivitaminas	E27	E28	E29
Ácido Fólico	E30	E31	E32
Hierro	E33	E34	E35
Calcio	E36	E37	E38
Aceite de pescado (A. Hígado de Bacalao)	E39	E40	E41
Otro E42	E43	E44	E45
Otro E46	E47	E48	E49

7. ¿ Cuántos vasos de agua bebe diariamente ? 1. Ninguno 2. 1-3 vasos / día 3. Más de 3 vasos / día	E50 <input type="checkbox"/>
8. ¿Es usted vegetariana ? 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 10)	E51 <input type="checkbox"/>
9. Si es SI, ¿qué tipo de vegetariana ? 1. Como pescado ó aves de corral..... 2. Como huevos y leche..... 3. Solo como frutas y verduras (vegetariana estricta).	E52-54 <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
10. ¿Ha comido alguna vez comida ecológica ? 1. Sí 2. No (ir a la pregunta 13)	E55 <input type="checkbox"/>

<p>11. Si es SI, ¿con qué frecuencia ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diariamente/ varias veces a la semana 2. 1-4 veces al mes 3. Muy rara vez/ nunca 	<p>E56</p> <input type="checkbox"/>
<p>12. Si es sí, ¿qué porcentaje de su dieta es ecológico? Por favor responda a cada una de los tipos de la lista de abajo. Puede usar una puntuación del 0 al 100. 0 = no haber comido nunca comida ecológica de ese tipo, 100 = comer solo comida ecológica.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Frutas y verduras 2. Pan 3. Carne..... 4. Productos del día..... 5. Otros..... 	<p>E57-61</p> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
<p>13. ¿Usa recipientes de plástico en el microondas para calentar comida ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 15</i>) 	<p>E62</p> <input type="checkbox"/>
<p>14. Si es SI ¿con qué frecuencia ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Varias veces a la semana 2. Varias veces al mes 3. Menos de una vez al mes 4. Nunca 	<p>E63</p> <input type="checkbox"/>
<p>15. ¿Cuánto ha comido ó bebido de media de lo siguiente durante el embarazo. Por favor, responda de forma individual para cada tipo, y use "0" para aquello que no ha tomado.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Café (tazas al día)..... 2. Té (tazas al día)..... 3. Cacao (tazas al día)..... 4. Cola (litros por semana). 5. Cerveza (botellas por semana)..... 6. Vino (vasos por semana)..... 7. Alcohol fuerte/ licores (vasos por semana)..... 8. Barras de chocolate (gramos por semana) 200 grs p.ej. 1 = 60 gramos, 1 = 200 gramos 	<p>E68-75</p> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
<p>16. ¿Cuántas veces durante este embarazo ha bebido en exceso? <i>Piense también al comienzo de su embarazo</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nunca 2. 1-2 veces 3. 3 ó más veces 	<p>E76</p> <input type="checkbox"/>
<p>17. ¿Ha tomado marihuana durante el embarazo ?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2. No 	<p>E77</p> <input type="checkbox"/>
<p>18. ¿Ha estado tomando pastillas, anfetaminas o otras drogas estimulantes durante su embarazo?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sí 2.No 	<p>E80</p> <input type="checkbox"/>

<p>19. ¿Ha fumado durante este embarazo?</p> <p>1. Sí 2. No</p>	<p>E99</p> <input type="checkbox"/>
<p>20. ¿Cuánto fuma por día?</p> <p>1. Cigarrillos..... 2. Cheroots..... 3. Puros..... 4. Pipas.....</p>	<p>E104-107</p> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
<p>21. ¿Dejó de fumar después de quedarse embarazada?</p> <p>1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 26</i>) 3. Parcialmente / No, pero lo reduje</p>	<p>E110</p> <input type="checkbox"/>
<p>22. Si es Sí, ¿en qué semana de gestación?</p> <p>_____</p>	<p>E111</p> <input type="checkbox"/>
<p>23. Si es SI, ¿usó parches de nicotina, chicles o sprays para dejarlo?</p> <p>1. Sí 2. No (<i>ir a la pregunta 26</i>)</p>	<p>E112</p> <input type="checkbox"/>
<p>24. Si es SI, ¿qué producto usó?</p> <p>1. Chicles con nicotina 2. Parches con nicotina 3. Spray con nicotina</p>	<p>E113</p> <input type="checkbox"/>
<p>25. Si es SI, ¿en qué semana(s) de gestación lo usó? Escriba la semana dentro de la casilla</p> <p>1. Semana 0-13 2. Semana 14-26 3. Semana 27-42 4. Durante todo el embarazo</p>	<p>E114</p> <input type="checkbox"/>
<p>26. ¿Ha estado expuesta al humo del tabaco forma pasiva p. ej. fuma su pareja o la gente de su oficina?</p> <p>1. Sí 2. No</p>	<p>E115</p> <input type="checkbox"/>
<p>27. Si es SI, ¿cuántas horas al día de media?</p> <p>1. Menos de $\frac{1}{2}$ hora 2. $\frac{1}{2}$-2 horas 3. Más de 2 horas</p>	<p>E116</p> <input type="checkbox"/>

28. ¿ Con qué frecuencia tomó alguna de las siguientes comidas durante el embarazo

	Nunca	1-3 veces al mes	1-3 veces semana	4-6 veces semana	Una o más veces al día
Yogur E118-122					
Quesos frescos E123-127					
Quesos añejos E128-132					
Huevos E133-137					
Tofu, miso E138-142					
Carne de soja p.ej. hamburguesas y salchichas vegetarianas E143-147					
Guisantes, habichuelas, lentejas, garbanzos E148-152					
Ensalada (lechuga, tomates,etc) E153-157					
Vegetales verdes frescos E158-162					
Otros vegetales frescos (zanahorias,etc) E163-167					
Vegetales congelados E168-172					
Conservas vegetales (incluidos las conservas de tomates)E173-177					
Fruta fresca E178-182					
Zumo de fruta fresca E183-187					
Conserva de fruta o tetra brike de zumo de fruta.E188-192					
Fruta seca E193-197					
Aves (pollo, pavo).E198-202					
Carne (vaca, cordero, cerdo, jamón, bacon, ternera, hamburguesa) .E203-207					
Hígado, paté de hígado, riñón, corazón, callos					
Pescado blanco fresco o congelado (bacalao, platija, dedos de pescado)E213-217					
Otro pescado fresco o congelado (sardina, boquerón, salmonete, atún, arenque, ahumados, trucha, salmón)E218-222					
Marisco fresco o congelado (camarones, coquinas, almejas)E223-227					
Pescado en conservaE228-232					
Carne en conserva E233-237					
Judías guisadas E238-242					
Otras alubias en conserva E243-247					
Comida orgánica o de cosecha propia E248-252					
Chocolate E253-257					

29. Por favor indique si estuvo personalmente en contacto con alguno de los siguientes productos en el trabajo y si es así, durante cuántas horas a la semana:

Labor		Número de horas por semana
VDU Screen/computadoras	E258-263	
Spray para el pelo	E264-269	
Humos del plástico	E270-275	
Productos de limpieza incluyendo desinfectantes	E276-281	
Disolventes (orgánicos) (formaldehído, glutaraldehído, óxido etileno)	E282-287	
Pinturas	E288-293	
Tinta de imprenta	E294-299	
Pintura delgada	E300-305	
Tintes y pigmentos	E306-311	
Cola	E312-317	
Pesticidas	E318-323	
Productos químicos fotográficos	E324-329	
Metales pesados (plomo, mercurio cadmio)?	E330-335	
Otros metales (hierro, zinc, aluminio)?	E336-341	
Humos de soldar	E342-347	
Humos de fábrica	E348-353	
Humos de tubo de escape (diesel, gasolina)?	E354-359	
Rayos-X (radiación iónica)?	E360-365	
Radiación no iónica (UV, infrarrojos)?	E366-371	
Anestésicos	E372-377	
Citostáticos y antibióticos	E378-383	
Vibraciones	E384-389	
Grano, paja, papel y polvo textil.	E390-395	
Polvo	E396-401	
Otros productos químicos, por favor especifíquelos .E402-407		

Ya ha finalizado este cuestionario. Muchas gracias por todo el tiempo y esfuerzo que ha puesto. Si tiene algún comentario/crítica por favor escribala aquí:

OBSERVACIONES: