



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, i Medicina Preventiva

Universitat Autònoma de Barcelona

Curso 2015/2016

**EXPOSICIONES AMBIENTALES DURANTE EL
EMBARAZO Y EVENTOS REPRODUCTIVOS**

MEMORIA TESIS DOCTORAL

Alumna: Silvia Agramunt Garcia

Co-directores: Ramón Carreras / Manolis Kogevinas

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento muy especial a mis co-directores y a mi familia, sin los que nada de todo esto hubiera sido posible.

Agradecimiento general al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital del Mar, al Servicio de Pediatría del Hospital del Mar, al CREAL, a los partners de NewGeneris y a las madres y bebés que participaron en el estudio.

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1. Dioxinas	6
1.2. Óxido de etileno	9
1.3. Acrilamida.....	10
1.4. Eventos reproductivos: distancia ano-genital	11
1.5. Eventos reproductivos: parámetros biométricos y gestacionales.....	14
2. Hipótesis y objetivos	15
3. Material y métodos.....	17
3.1. Población de estudio	17
3.2. Recogida de datos	17
3.3. Distancia ano-genital.....	18
3.4. Recogida, procesamiento, almacenaje y distribución de muestras sanguíneas.....	19
3.5. Ensayo DR- CALUX [®]	19
3.6. Óxido de etileno	19
3.7. Acrilamida.....	20
3.8. Dieta materna	21
3.9. Análisis estadístico.....	22
3.10. Colaboración en la Cohorte NewGeneris	23
4. Resultados	25
4.1. Dioxinas y distancia ano-genital	25
4.2. Dioxinas y parámetros antropométricos en el nacimiento	30
4.3. Óxido de etileno y eventos reproductivos.....	37
4.4. Acrilamida y eventos reproductivos	49
5. Discusión.....	58
5.1. Dioxinas y distancia ano-genital	58
5.2. Dioxinas y eventos reproductivos	60
5.3. Óxido de etileno y eventos reproductivos.....	63
5.4 Acrilamida y eventos reproductivos	65
6. Conclusiones	69
7. Bibliografía.....	70

1. Introducción

La exposición intra-útero a múltiples factores ambientales puede influenciar a varios parámetros tales como la edad gestacional, el peso, el perímetro cefálico o la distancia ano-genital al nacer, con sus consecuencias deletéreas para el futuro crecimiento y desarrollo del organismo¹.

En este trabajo hemos analizado diferentes tóxicos ambientales y los hemos relacionado con eventos reproductivos.

1.1. Dioxinas

El primer grupo de tóxicos analizado ha sido el de las dioxinas, un grupo de hidrocarburos aromáticos halogenados que incluye 75 dibenzodioxinas policlorinadas (PCDDs) y 135 dibenzofuranos (PCDFs)². La toxicidad de cada dioxina difiere ampliamente por lo que, de las 210 posibles variantes, sólo 17 se consideran de interés toxicológico por tener enlaces con átomos de cloro en las posiciones 2-, 3-, 7- y 8- de los dos anillos aromáticos, siendo el compuesto más tóxico 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD, dioxin) (ver Figura 1).

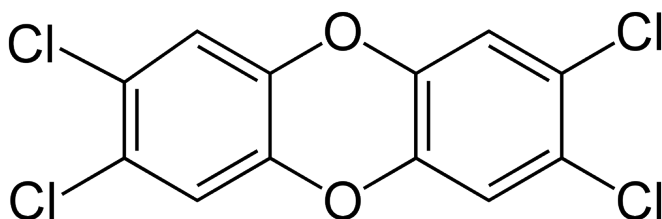


Figura 1 - 2,3,7,8 – tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD)

Los bifenilos policlorinados (PCBs) son un grupo de 209 sustancias de los que destacan por sus propiedades toxicológicas análogas a las dioxinas, 12 moléculas incluidas en los grupos *non-ortho* y *mono-ortho*, comúnmente referidos en la literatura como “*dioxin-like* PCBs”³.

Las dioxinas se utilizaron en los años 70 como herbicidas (fenoxi-herbicidas, también conocidos bajo el nombre de “Agente Naranja” en la Guerra del Vietnam), aunque en la actualidad, son productos de desecho de múltiples procesos químicos. Su origen procede principalmente de residuos de la combustión del carbón, gas natural o plásticos,

procesos de reciclaje del metal, incineración de residuos domésticos y enblanqueamiento de la pulpa de celulosa para la fabricación de papel, entre otros procesos⁴. Dado su origen, las dioxinas se encuentran principalmente adheridas a cenizas, por lo que pequeñas partículas pueden ser transportadas a largas distancias desde el lugar de emisión de la combustión, están ampliamente extendidas en el ambiente y son persistentes en el tiempo⁵. Los PCBs no son residuos, sino productos manufacturados intencionadamente para el uso en múltiples procesos industriales y comerciales, ya que son materiales no inflamables, químicamente estables, con baja conductividad y un alto punto de ebullición. La producción y uso de PCBs se prohibió en la mayoría de países en 1985, pero grandes cantidades de estas sustancias todavía permanecen en equipamientos eléctricos, algunos productos de plástico y suelos de edificios³. En este trabajo nos referiremos con el término dioxinas a ambos grupos, dioxinas y *dioxin-like* PCBs.

Las dioxinas son lipofílicas, se metabolizan y se eliminan lentamente del organismo y tienen tendencia a bioacumularse, con una vida media en humanos de entre 7 y 8 años para la TCDD, la sustancia más tóxica del grupo. Dada su hidrofobia, en ambientes acuáticos las dioxinas se adhieren a la materia orgánica como el plancton, que es ingerido por animales de mayor tamaño, entrando y acumulándose en cada eslabón de la cadena alimentaria mediante un proceso conocido como biomagnificación⁶.

La mayoría de los efectos están causados mediante el receptor citosólico AhR (receptor de hidrocarburos aromáticos) que, cuando se une a la molécula de dioxina, se internaliza y es translocado en el núcleo, donde forma un heterodímero activo junto con el translocador nuclear de hidrocarburos aromáticos (ARNT). Este heterodímero AhR/ARNT se une al elemento específico de respuesta xenobiótica (XRE), un elemento localizado en la región promotora del gen objeto, resultando en un aumento de expresión del gen en cuestión. El gen objeto es habitualmente un gen codificador de una proteína enzimática con capacidad para metabolizar dioxinas y otros xenobióticos, como el citocromo P450A1 (CYP1A1), P450A2 (CYP1A2) o el P450B1 (CYP1B1), así como enzimas de fase II como la glutatión-S-transferasa A1 (GST-A1) o UDP-glucuronosiltransferasas (UGT1-06). Aun estas múltiples posibilidades, el gen que más potentemente se induce tras la activación de AhR es CYP1A1^{7,8}. Dado que existen polimorfismos genéticos en los genes de los citocromos, existen múltiples estudios recientes que han estudiado la relación entre ciertos genotipos de CYP1A1 y AhR y un

perfil de susceptibilidad genética a la exposición a dioxinas⁹, presentando mayores niveles de dioxinas en los tejidos, según el perfil genético¹⁰.

El nivel de toxicidad de cada dioxina difiere considerablemente, por lo que la OMS estableció en 1997 el concepto de factor de toxicidad equivalente o TEF, en relación a TCDD, que tendría un TEF de 1. A partir de ahí, a cada congénico de PCDD, PCDF y *dioxin-like* PCB se le asignó un valor de TEF. Para calcular la toxicidad de una mezcla de dioxinas, se multiplican la concentración de cada sustancia por su TEF, y se suma hasta obtener un valor de toxo-equivalencia o TEQ. Cada 5 años la OMS revisa los TEF mediante análisis y consultas con expertos, la última de los cuales se ha publicado en 2013, donde se validan los valores de 2005¹¹ y se acuerda añadir las dioxinas polibrominadas en el concepto de sustancias con TEF¹².

Para medir la TEF en sangre, el método más utilizado en la actualidad por su alta fiabilidad, relativo bajo coste comparado con el clásico HRGC/HRMS¹³ y requerimiento de sólo pequeñas cantidades de plasma sanguíneo, es el DR Calux® (Dioxin-Responsive Chemically Activated LUciferase eXpression)¹⁴, que mide la capacidad de una mezcla de sustancias para activar la expresión de genes dependientes de AhR del gen de la luciferasa de luciérnaga (enzima generadora de luz) en líneas celulares modificadas. Además, debido a que en el proceso se realizan múltiples lavados, sólo los compuestos estables (como las dioxinas) son medibles.

En cuanto a los efectos de las dioxinas en la salud, desde 1997, la OMS clasifica la TCDD como sustancias del grupo I de la clasificación de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), es decir, como “carcinógeno conocido en humanos”, basado en los datos epidemiológicos publicados previamente¹⁵. Existen múltiples estudios observacionales a largo plazo, realizados en población sobre-expuesta a dioxinas de forma aguda o bien con exposiciones crónicas ocupacionales en los que se observa de forma consistente, un aumento del número de muertes totales, y también por cáncer de pulmón, linfoma y sarcoma¹⁶.

Asimismo, dado que el receptor AhR no sólo se activa cuando se une a dioxinas sino que también juega un papel fundamental en la regulación hormonal fisiológica del organismo y tiene una estrecha relación con los receptores de estrógenos y andrógenos¹⁷, se han observado efectos en el desarrollo, hormonales y reproductivos. Las dioxinas acumuladas en el organismo pueden transferirse de madre a hijo a través de la placenta en el ambiente intrauterino¹⁸, tras el nacimiento mediante la lactancia

materna¹⁹ y más adelante a través de la dieta, que supondría más del 95% del origen de la exposición a dioxinas en la población general expuesta de forma no-ocupacional²⁰.

Los estudios realizados en mujeres embarazadas expuestas accidentalmente a altos niveles de dioxinas sugieren que la exposición prenatal a dioxinas podría afectar al desarrollo y crecimiento infantil. Una explosión de una planta química en Seveso (Italia) en el año 1976, produjo la mayor exposición conocida de TCDD a la población. Se han descrito alteraciones en la ratio de sexo del recién nacido²¹ y disminución del peso al nacer en los individuos con mayor exposición²². En relación a la población vietnamita y veteranos de guerra americanos expuestos al agente naranja, se observó un aumento en la incidencia de defectos congénitos en sus hijos²³. Existen múltiples estudios publicados que relacionan exposición a dioxinas durante el embarazo y efectos adversos en los recién nacidos^{24,25,26,27,28,29,30,31}. De éstos, sólo tres estudios determinaron dioxinas en sangre de cordón umbilical^{24,25,29} aunque midieron una selección limitada de PCBs.

En el presente estudio, se ha medido la actividad “*dioxin-like*” en plasma de pares madre-cordón de la cohorte NewGeneris, incluyendo individuos de 5 países europeos, y se ha relacionado con peso al nacer, perímetro cefálico, edad gestacional y distancia ano-genital, estratificando los resultados según el sexo del recién nacido.

1.2. Óxido de etileno

El óxido de etileno es una sustancia con propiedades carcinogénicas y mutagénicas, tal y como se ha publicado en varios estudios in-vitro e in-vivo, realizados en animales de experimentación y humanos respectivamente^{32,33}. El óxido de etileno se ha utilizado en la industria química para producir etilenglicol, surfactantes no iónicos y otros derivados, y también es utilizado como agente esterilizante. Aunque es clasificado como un carcinógeno de clase I “Carcinogénico en humanos”³⁴, la evidencia de sus efectos en humanos es escasa, probablemente debido a las bajas dosis de exposición exógena en la población general. Globalmente, el óxido de etileno es una sustancia con potencial carcinogénico y genotóxico con una contribución probablemente baja o no significativa al riesgo de cáncer en humanos.

La exposición a óxido de etileno puede ser exógena o endógena. Fumar tabaco es la principal fuente de exposición exógena a óxido de etileno a través de la inhalación de partículas de la combustión de cigarrillos. Paralelamente, los trabajadores de la industria

y el personal de los servicios de esterilización de material médico pueden estar sometidos a exposición a óxido de etileno de forma ocupacional exógena.

En cuanto a la exposición endógena, en la población general, el óxido de etileno procede de la producción endógena de etileno. Esta molécula deriva de la peroxidación lipídica, la oxidación de metionina libre³⁵, la oxidación del grupo hemo de hemoglobina³⁶ y el metabolismo de las bacterias intestinales³⁷.

Los aductos de hemoglobina, como el de valanina (HOEtVal), pueden utilizarse para monitorizar las dosis sanguíneas de óxido de etileno para estudios de asesoramiento de riesgo a partir de una amplia gama de exposiciones a este tóxico³⁸. Los niveles de aductos de hemoglobina han mostrado una correlación lineal significativa con la exposición a óxido de etileno (en rangos entre 0 y 200ppm) y con aductos de ADN, que son los más ampliamente utilizados.

Algunos eventos reproductivos se han relacionado con la exposición a óxido de etileno, como el aborto espontáneo y de pérdida del embarazo en enfermeras expuestas ocupacionalmente a óxido de etileno. El grupo de Gresie-Brusin³⁹ publicó un estudio doble cruzado, incluyendo 98 embarazos únicos de madres que trabajaban en unidades de esterilización utilizando óxido de etileno. Las madres con altos niveles de exposición tenían un riesgo mayor de aborto espontáneo (OR de 20.8, IC 95% 2.1 – 199) y pérdida del embarazo en cualquier semana de la gestación (OR 8.6, CI 95% 1.8-43.7) comparadas con las madres con bajos niveles de exposición.

Teniendo en cuenta esta información, nos hemos centrado en el efecto potencial de la exposición intra-útero a óxido de etileno en cuanto al peso al nacer, el perímetro cefálico al nacer y la edad gestacional. La hipótesis de Barker^{40,41} ha mostrado de qué manera estos eventos reproductivos pueden estar relacionados con efectos deletéreos en la vida posterior, tales como: peor desarrollo neuropsicológico o aumento del riesgo de hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares.

1.3. Acrilamida

La acrilamida es una sustancia neurotóxica en humanos y animales y está clasificada como probable carcinógeno en humanos desde 1994, por la IARC. La exposición ocupacional y el tabaco fueron originalmente planteados como principales fuentes de exposición a acrilamida en humanos⁴², pero posteriormente se descubrió de forma inesperada que la acrilamida formaba parte de una gran variedad de comidas a base de

carbohidratos, acumulada durante la cocción (principalmente al freír u hornear) a altas temperaturas⁴³. La preocupación mundial sobre los potenciales efectos negativos en la salud, procedentes de la exposición dietética a acrilamida, generó nuevos estudios, que hallaron acrilamida en comidas comúnmente consumidas como patatas fritas, patatas “chips”, galletas, cereales de desayuno y café^{44,45,46}.

La exposición prenatal a acrilamida es de especial interés porque se han descrito efectos reproductivos y del desarrollo en roedores, incluyendo descenso en el peso al nacer dosis-dependiente según la exposición a acrilamida y malformaciones musculoesqueléticas en los roedores expuestos intra-uterinamente^{47,48}.

La acrilamida y su metabolito glicidamida son reactivos y pueden formar aductos en zonas nucleofílicas de proteínas y ADN. La glicidamida tiene una reactividad mucho mayor con el ADN que la acrilamida, y se considera de mayor genotoxicidad que la sustancia de origen⁴⁹. Los aductos de hemoglobina pueden utilizarse como biomarcadores de dosis interna en sangre para sustancias reactivas como acrilamida⁵⁰. La detección de aductos de hemoglobina de acrilamida en sangre umbilical humana^{51,52}, así como estudios de acrilamida en estudios de perfusión placentaria *ex vivo*⁵³, muestran que la acrilamida atraviesa la placenta humana.

Ante los posible efectos de salud asociados con la amplia gama de exposición dietética a acrilamida, empezando *in utero*⁵⁴, hemos analizado la asociación entre la exposición prenatal a acrilamida, medido como aductos de hemoglobina en sangre de cordón y eventos reproductivos, en un estudio multicéntrico europeo. También analizamos la exposición prenatal a acrilamida basada en cuestionarios de frecuencia alimentaria y asociaciones entre exposición dietética materna a acrilamida, niveles de aductos en sangre de cordón y eventos reproductivos, con la hipótesis de que una mayor ingesta de comida rica en acrilamida durante el embarazo se asocia a una reducción en el crecimiento intrauterino.

1.4. Eventos reproductivos: distancia ano-genital

En las últimas décadas existe una creciente preocupación por el aumento secular de anomalías congénitas genitales (hipospadias⁵⁵, criptorquidia⁵⁶), el empeoramiento de la calidad del semen⁵⁷ y el cáncer testicular⁵⁸. Según la *hipótesis de la disrupción endocrinológica*⁵⁹, todas estas enfermedades estarían relacionadas con la exposición intrauterina a sustancias que actuarían como antiandrógenos. El hecho de que la

distribución geográfica de estas enfermedades no sea homogénea¹ apoya el papel etiológico de los factores ambientales. La distancia anogenital (DAG) es un parámetro antropométrico que se ha validado en algunos estudios como un marcador sensible de exposición intrauterina a andrógenos y antiandrógenos^{60,61}.

El dimorfismo sexual en humanos depende del correcto desarrollo de los órganos genitales en los periodos embrionario y fetal. Aunque el sexo del embrión es determinado genéticamente en el momento de la fecundación, los genitales externos son ambiguos en la etapa embrionaria. A partir de las 9 semanas de vida intrauterina empiezan a percibirse las características sexuales diferenciales, siendo clara la diferencia a las 12 semanas⁶².

El desarrollo de los genitales externos depende de la influencia hormonal en la circulación fetal. Por una parte, en el embrión masculino los testículos producen sustancia inhibidora de Müller y andrógenos, que provoca la regresión del conducto paramesonéfrico y estimula el crecimiento del pene y la fusión de las eminencias escrotales. Así, el desarrollo de los genitales externos masculinos se realiza mediante un ambiente hormonal androgénico, que ocurre gracias a los testículos fetales. Se produce un alargamiento del tubérculo genital (falo) y un cierre de los pliegues uretrales, formando la uretra peneana. Si esta fusión es incompleta, nos hallamos ante un hipospadias, con el meato urinario en la cara ventral del pene. Asimismo, también pueden producirse otras malformaciones como la criptorquidia, epispadias y extrofia vesical, en relación a la incorrecta diferenciación de los órganos genitourinarios⁶³.

Por otra parte, en el embrión femenino, el conducto paramesonéfrico -en ausencia de sustancias inhibitoras- se convierte en el conducto genital principal de la mujer. Así, se produce el descenso de los ovarios, la formación de las trompas de Falopio, y las partes caudales fusionadas forman el cuerpo uterino. Los genitales externos se ven modulados por los estrógenos producidos por la placenta y por la madre. Los pliegues uretrales no se fusionan, formando los labios menores; y el tubérculo genital forma el clítoris; quedando el vestíbulo a cargo del surco urogenital⁶⁴. Queda clara la importancia, en el desarrollo de ambos sexos, del ambiente hormonal intrauterino.

La *hipótesis de la disrupción endocrinológica* surgió a partir de los hallazgos de múltiples estudios que apuntaban a un empeoramiento en la calidad del semen^{65,66}. En un metanálisis de 101 estudios publicados, destacaba una disminución estadísticamente significativa en la concentración media de espermatozoides, de 113 millones/mililitro en 1940 a 66 millones/mililitro en 1996^{3,67}. Asimismo, se objetivó que la prevalencia de

criptorquidia dobló desde la década de los 70 a los 90 en Gran Bretaña² y EE.UU.⁶⁸. Este hecho es de especial relevancia, pues esta anomalía está relacionada con esterilidad⁶⁹ y cáncer testicular⁷⁰. De hecho, el grupo de Skakkebaek propuso en 2001 que los testículos no descendidos, el hipospadias, la calidad seminal disminuida y el cáncer testicular, forman parte de una única entidad, el *síndrome disgenésico testicular*⁷¹.

Según el consenso de Princeton en 1992⁷², se define como *disruptor endocrinológico* (también conocidos como xenoestrógenos, estrógenos xenobióticos, moduladores endocrinológicos ambientales o EDCs –*endocrine-disrupting chemicals*) a toda sustancia exógena con capacidad de alterar el ambiente hormonal normal y la reproducción de organismos intactos o su descendencia.

Estas moléculas se hallan principalmente en productos pesticidas, como el metoxiclor, o los ya retirados DDT y policlorobifenilos (PCBs). Los derivados fenólicos (fenilfenol, nonoxinol o bisfenol A) son utilizados como desinfectantes, espermicidas o herbicidas. Otras moléculas como las hormonas femeninas naturales o sintéticas (fármacos, fitoestrógenos, micoestrógenos u otros) pueden contaminar el agua, la tierra y los alimentos. Paralelamente, también se han encontrado sustancias farmacológicas con efecto disruptor en muestras de agua, tales como antibióticos, antiepilépticos, beta-bloqueantes o hipolipemiantes⁷³.

Los ésteres del ácido ftálico o ftalatos (dibutil ftalato –DBP-, benzilbutil ftalato –BzBP-, di-2-etilhexil ftalato –DEHP-, di-isononil ftalato), hallados ampliamente en productos cosméticos, plásticos, pinturas y herbicidas, también se han relacionado con efectos reproductivos antiandrogénicos en animales^{74,75}, como criptorquidia, hipospadias o disminución de la distancia anogenital.

Aunque las dioxinas se han relacionado con efectos hormonales y reproductivos previamente, no se han publicado previamente estudios relacionando DAG y dioxinas en humanos (sí en animales).

Todas estas moléculas actúan activando y modulando la producción del receptor estrogénico (RE), que se halla principalmente en las gónadas, tanto femeninas como masculinas. Para el correcto desarrollo y funcionamiento de los órganos genitales es preciso un equilibrio entre andrógenos y estrógenos. Un exceso de estos últimos produce una disminución en la actividad esteroidogénica de los enzimas conversores de progesterona en testosterona⁷⁶. Asimismo, también se ha demostrado que los estrógenos disminuyen la producción de FSH en los fetos varones, provocando una

disminución en la producción de células de Sertoli, con la consiguiente disminución en la concentración espermática⁷⁷.

1.5. Eventos reproductivos: parámetros biométricos y gestacionales

El peso al nacer es un parámetro antropométrico estandarizado que mide la masa corporal del bebé recién nacido, habitualmente en gramos. Los factores principales del peso al nacer son la edad gestacional y el crecimiento fetal intra-útero, éste último determinado por la genética, la salud y dieta maternas, factores socio-económicos, el tabaquismo, la gemelaridad y otras variables como la exposición a factores ambientales. En cualquier caso, y tal y como fue descrito según la hipótesis de Barker, la variable peso al nacer está relacionada con consecuencias a largo plazo tales como hipertensión, obesidad y diabetes.

El perímetro cefálico al nacer es otro de los parámetros antropométricos recogidos de forma estándar a los recién nacidos, utilizando una cinta métrica alrededor del hueso frontal, parietales y occipital. Este parámetro es indicador de crecimiento cerebral, y su disminución se ha relacionado con retraso psicomotor.

La edad gestacional consiste en la medida de la duración del embarazo desde el primer día de la última menstruación de la mujer embarazada hasta el día del nacimiento, y se suele medir en semanas y/o días. En caso de no tener información sobre la menstruación, se suelen hacer estimaciones ecográficas que varían según la edad gestacional, aunque la más fiable es la medida de la longitud craneo-caudal cuando el feto mide entre 45 y 84mm (esto es, entre 10 y 12 semanas de amenorrea). Este parámetro –junto con su correcta estimación- es clave para el resultado obstétrico final, no sólo en cuanto a su influencia en el peso y perímetro cefálicos, sino también como garantía de madurez de los órganos vitales principales tales como pulmones y cerebro. Como conceptos básicos para el análisis estadístico, consideramos gestación a término un embarazo que acaba entre las 37 y 42 semanas cumplidas, y una gestación pretérmino –con distintos grados de gravedad según su lejanía al límite del término- a todo embarazo que acaba antes de la semana 37.

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La **hipótesis principal** de la tesis es que la exposición intra-útero a compuestos con efecto disruptor endocrinológico podría causar alteraciones antropométricas neonatales con posibles efectos deletéreos en la salud general y reproductiva de esos niños.

Múltiples estudios han relacionado la exposición a altas dosis de dioxinas con aumento de riesgo de cáncer o incluso muerte, así como efectos hormonales a través de la estimulación de receptores del organismo. Así, nuestra hipótesis es que, aún en dosis bajas, la exposición a dioxinas en una fase crítica del desarrollo podría aumentar el riesgo de eventos reproductivos adversos tales como una disminución del peso al nacer, el perímetro cefálico, la edad gestacional o la distancia ano-genital (AGD), un marcador novedoso de exposición a disruptores hormonales con potencial significado a largo plazo.

Tanto las dioxinas como el óxido de etileno han sido clasificados por la IARC como carcinógeno de Clase I y en el caso de óxido de etileno se ha relacionado con aumento de la tasa de abortos y parto prematuro, por lo que nuestra hipótesis es que una mayor exposición a esta sustancia aumenta el riesgo de eventos reproductivos adversos.

En cuanto a la acrilamida, está clasificada como probable carcinógeno por la IARC y se ha relacionado su exposición a altas dosis con malformaciones fetales en animales de experimentación. Así, nuestra hipótesis es que, aunque la exposición en la población general sea baja, la exposición a acrilamida durante el desarrollo intra-uterino podría producir eventos reproductivos adversos.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

1. En el caso del estudio de exposición a dioxinas y AGD, la hipótesis es que una mayor exposición intra-útero a sustancias con efecto *dioxin-like*, medidas a partir del bioensayo DR CALUX®, se asocia a una disminución en la AGD.

2. En cuanto al estudio de exposición a dioxinas y eventos reproductivos, la hipótesis es que una mayor exposición a sustancias con efecto *dioxin-like*, medidas a partir del bioensayo DR CALUX®, se asocia a una disminución en el peso al nacer, el perímetro cefálico al nacer y la edad gestacional.

3. En cuanto al estudio de exposición a óxido de etileno y eventos reproductivos, la hipótesis es que una mayor exposición intra-útero a óxido de etileno, medido a través de aductos de hemoglobina, se asocia a una disminución en el peso al nacer, el perímetro cefálico al nacer y la edad gestacional.

4. En cuanto al estudio de exposición a acrilamida y eventos reproductivos, la hipótesis es que una mayor exposición intra-útero a acrilamida, medido a través de aductos de hemoglobina, se asocia a una disminución en el peso al nacer, el perímetro cefálico al nacer y la edad gestacional.

3. Material y métodos

3.1. Población de estudio

La población del presente estudio pertenece al estudio multicéntrico europeo NewGeneris (Newborns and Genotoxic exposure risks)⁷⁸, que incluye cohortes de 5 países europeos: Noruega (MoBa: Bramat y Barmiljoe), Reino Unido (Born in Bradford, BiB), Dinamarca (Danish NewGeneris biobank, Copenhague), Grecia (estudio RHEA, Heraklion, Creta) y España (cohorte INMA en Sabadell, cohorte Hospital del Mar en Barcelona).

Las mujeres embarazadas fueron reclutadas entre 2006 y 2010 en once maternidades localizadas respectivamente en Oslo y Arkeshus, Noruega; Bradford, Reino Unido; Copenhague, Dinamarca; Heraklion, Grecia; y Sabadell y Barcelona, España.

Todos los procedimientos de investigación fueron presentados y aprobados por los Comités de Ética locales en cada centro y todas las pacientes incluidas firmaron consentimiento informado. Los documentos relacionados con la Revisión Ética del estudio NewGeneris y todas sus cohortes constan en el Anexo Técnico al contrato No 016320-2 con la Comisión de la Unión Europea y en la web del estudio NewGeneris⁷⁹.

Los criterios de inclusión fueron embarazadas sin enfermedades víricas graves transmisibles por contacto sanguíneo (VIH, hepatitis B y C), con gestaciones únicas y que accedieran a participar en el estudio cediendo sangre materna, sangre de cordón umbilical y entrevista extensa sobre hábitos de vida y frecuencias alimentarias.

3.2. Recogida de datos

La información sobre peso al nacer, talla y perímetro cefálico fue recogida de los registros médicos por parte de un colaborador perteneciente a cada centro. En las cohortes de Reino Unido, Dinamarca, Grecia y España, la edad gestacional fue calculada según el intervalo entre la fecha de inicio de la última menstruación y la fecha del parto o bien corregido por ecografía de primer trimestre en casos de discordancia superior a 7 días entre la amenorrea y las biometrías ecográficas. En la cohorte de Noruega la edad gestacional se registró mayoritariamente acorde a la fecha de última menstruación aportada por cada madre.

Los cuestionarios sobre estilo de vida y frecuencias alimentarias se utilizaron para obtener información sobre nutrición, estado de salud materna, exposiciones ambientales y ocupacionales, estilo de vida y factores socioeconómicos durante la gestación.

3.3. Distancia ano-genital

Las mediciones se realizaron siguiendo el protocolo utilizado por anteriores autores^{80,81}, utilizando una superficie plana y un medidor electrónico de 150 mm con precisión centesimal (Cal C/PROOF 150mm IP67; TESA Technology, Renens, Suiza).

Como se puede observar en la figura 2, se realizaron distintas mediciones perineales. Para los varones, se realizaron 3 medidas: *distancia anogenital* (de zona intermedia del ano hasta cara anterior de la base del pene), *distancia ano-escrotal* (de zona intermedia del ano hasta línea cutánea inferior del escroto) y *anchura peneana*.

Para las mujeres, se realizaron sólo 2 medidas: *distancia anogenital* (de zona intermedia del ano hasta clítoris) y *distancia ano-horquilla* (de zona intermedia del ano hasta zona inferior horquilla vulvar).

Los bebés se colocaron con las extremidades inferiores en abducción, las rodillas flexionadas y los pies unidos sobre la zona umbilical para medir las distancias ano-escrotal y ano-horquilla. Asimismo, se colocaron con las extremidades inferiores en abducción y rodillas flexionadas para medir la distancia anogenital y la anchura peneana.

Las medidas fueron realizadas por un solo observador en la cohorte del Hospital del Mar, y por cuatro observadores en Heraklion, todos ellos con entrenamiento y validación previos y con una variabilidad interobservador estudiada mínima.

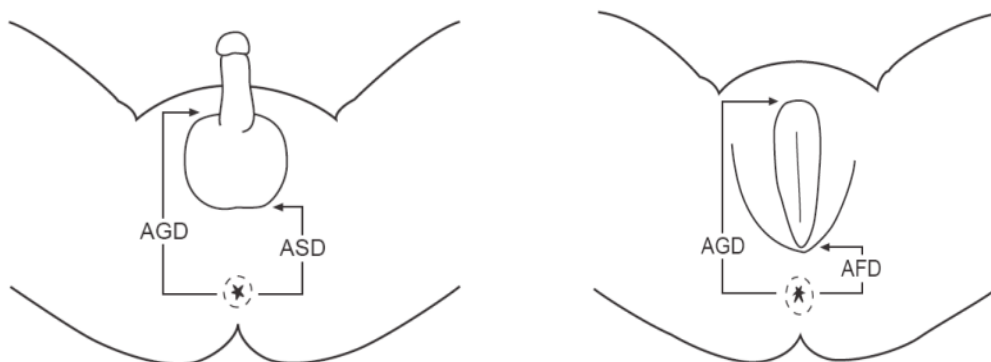


Figura 2- Distancia ano-genital

3.4. Recogida, procesamiento, almacenaje y distribución de muestras sanguíneas

Los protocolos extensos de recogida, procesamiento, almacenaje y distribución de muestras sanguíneas obtenidas en el estudio NewGeneris fueron publicados previamente⁷⁹.

Brevemente, se recogieron 40 mililitros de sangre materna por cada participante, que se repartieron en 3 tubos heparinizados con EDTA (BD Vacutainer, Plymouth, Reino Unido) a 4°C, un tubo de 1mL fotoprotegido y 0.4mL en un Eppendorf con RNA later. Para la sangre de cordón umbilical, el procedimiento fue similar pero con 30mL. Ambas muestras se recogieron inmediatamente postparto. Las muestras fueron centrifugadas y conservadas a -20°C para ser enviadas a Amsterdam en hielo seco en el caso del ensayo DR- CALUX[®].

3.5. Ensayo DR- CALUX[®]

La medición de la actividad “*dioxin-like*” en plasma se realizó mediante el ensayo DR-CALUX[®] en los laboratorios de Biodetection Systems BV, en Amsterdam, Holanda.

El ensayo DR-CALUX[®] está basado en una línea celular modificada de hepatoma de rata H4IIE, que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional de AhR. El protocolo de procesamiento de muestras está previamente publicado y validado para la medida de actividad de dioxinas en humanos⁸².

De este modo, cuando las células están expuestas a dioxinas o sustancias con efecto “*dioxin-like*”, se unen al receptor AhR y éste activa la expresión de luciferasa así como otras proteínas y enzimas asociadas a la respuesta de las dioxinas. A continuación se añade el substrato luciferina, tras lo cual, se emite luz en relación a la cantidad de luciferasa expresada. La cantidad de luz emitida es proporcional a la intensidad de unión al receptor AhR. La luminiscencia se calibra en relación a 2,3,7,8-TCDD en unidades de toxo-equivalencia (TEQs) y resulta expresada en picogramos CALUX[®]-TEQ/gramos de lípido o plasma según aplique.

3.6. Óxido de etileno

Los aductos de hemoglobina de óxido de etileno en sangre materna y umbilical se determinaron mediante el procedimiento “adduct FIRE” (R-Edman isotiocianato fluoresceína, siglas en inglés)⁸³ utilizando el cromatografía líquida junto con espectrometría de masas en tándem. Este procedimiento consistía en un sistema

Prominence Shimadzu LC 20 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) junto con un instrumento tipo API3200 Qtrap con interfase TurboIonSpray® obtenida de Sciex (Concord, ON, Canada). Se utilizó una columna de oro hipersilo (1.9_μm, 2.1°Ø150mm) (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EEUU) con un filtro tipo Tridente (cap frits 0.5_μm 2mm) (Restek., PA, EEUU). La fase móvil consistió de A: ácido fórmico al 0.1% en ácido cianúrico al 25% en agua destilada, y B: la misma fórmula. El gradiente A se aplicó del 10% de B al 70% de B en 13 minutos, se aplicó flujo isocrático 5 minutos a la solución B al 70% y luego se pasó al 100% B en 5 minutos, antes de re-equilibrar la columna con la fase móvil inicial. La inyección de volumen fue de 20 mililitros ya la velocidad de flujo fue de 100 mililitros por minuto. La configuración del instrumento de espectrometría de masas, con los valores en V, fueron: 80V de potencial de desfragmentación, 10V de potencial de entrada, 56V de energía de colisión, 30 unidades arbitrarias de gas nebulizador (N2), 20 unidades arbitrarias de gas turbo (N2), 30 unidades arbitrarias de gas cortina (N2), 5 unidades arbitrarias de gas colisión (N2), voltaje en espray iónico de 4500V a una temperatura de vaporización de 400°C. El análisis de las muestras procesadas se realizó en el modo iónico positivo, utilizando monitorización reactiva múltiple (MRM) con las transiciones siguientes: comp. 1 m/z 560.1→517.1; 2 m/z 567.1→517.1; comp. 3 m/z 576.1→531.1; 4 m/z 583.1→538.1; comp. 5 m/z 533.1→460.1; y comp. 6 m/z 540.1→460.1. El límite de cuantificación se situó en 10 veces el nivel del ruido.

3.7. Acrilamida

Población de estudio

El estudio se realizó en el marco del consorcio NewGeneris (www.newgeneris.org) como parte de la investigación explorando el impacto de la dieta durante el embarazo en la salud infantil⁷⁸. Las mujeres embarazadas fueron incluidas entre 2006 y 2010 en 11 maternidades localizadas en Dinamarca, Grecia, Noruega, España e Inglaterra^{84,85,86,87}. Los criterios de elegibilidad generales del estudio se aplicaron para la inclusión de las madres. Las tasas de participación precisas no se pueden estimar debido a que se aplicaron múltiples filtros para la inclusión de las madres en el estudio NewGeneris, como dar a luz en los períodos de recogida y procesamiento de sangre de cordón, conseguir suficiente volumen de sangre de cordón, procesamiento correcto de la muestra y análisis de biomarcadores.

La información de las características maternas de las pacientes con resultados de aductos de hemoglobina estaba disponible para 1151 pares madre-hijo. Se excluyeron 16 pares de gemelos y 34 pares madre-hijo con información incompleta en cuanto a hábito tabáquico, edad gestacional, peso al nacer o sexo del bebé, quedando 1101 pares madre-hijo para análisis. La información referente a peso al nacer, perímetro cefálico al nacer, edad gestacional, sexo del bebé y tipo de parto se obtuvieron de las historias clínicas. La edad gestacional se estimó basándose en el intervalo entre la fecha del primer día de la última regla y el día del parto, corregido por medidas ecográficas en caso de discrepancia igual o mayor a 7 días. Las medidas ecográficas fueron recogidas por la mayoría de participantes de Inglaterra, Noruega y España. Definimos niños pequeños por edad gestacional, a aquellos que tuvieron un peso por debajo del percentil 10 respecto a la tabla de referencia de cada cohorte en crecimiento fetal (con un peso medio de 2838g para todos los niños pequeños para edad gestacional), estratificado por semana completa de gestación y sexo fetal.

La aprobación del comité de ética se obtuvo de todos los comités locales en cada centro, junto con el consentimiento informado firmado de todas las pacientes incluídas.

Aductos de hemoglobina de acrilamida y glicidamida en sangre de cordón y materna

La sangre de cordón se recogió en tubos de heparina de la placenta puncionando el cordón umbilical inmediatamente después del parto, siguiendo el protocolo habitual en cada centro. Los eritrocitos se separaban por centrifugación y se almacenaban a -20°C antes y después del envío en hielo seco. Los aductos de hemoglobina de acrilamida y glicidamida fueron simultáneamente determinados mediante el procedimiento “FIRE” (previamente descrito en este texto) en 1101 muestras de sangre de cordón y 172 muestras de sangre materna. Brevemente, las valinas aducidas en N-terminal se analizaron mediante el reagente isotiocianato-5-fluoresceína tipo Edman. Las moléculas extraídas se purificaron con extracción de fase sólida y analizadas mediante cromatografía líquida – espectrometría de masas.

3.8. Dieta materna

Se recogió información detallada sobre la dieta materna en el embarazo, utilizando cuestionarios de frecuencia dietética, recogidos antes o en el momento del parto. Se agruparon comidas y bebidas en ocho grupos conocidos como potencialmente ricos en

acrilamida basados en similitudes en el tipo de composición y procesamiento de las comidas en cada grupo —específicamente, patatas fritas, patatas “chips”, cereales de desayuno, pan crujiente, café, galletas, productos de pastelería, pan y tostadas⁵⁴. Desarrollamos un índice de comida rica en acrilamida para no fumadoras, siguiendo el mismo método utilizado para evaluar la dieta Mediterránea⁸⁸. El índice estaba basado en el consumo de los ocho grupos de comida (tal y como hemos mencionado previamente); cada mujer no fumadora recibía una puntuación de 0 por cada comida con un consumo por debajo de la mediana de su país y una puntuación de 1, si su consumo era por encima de la mediana. Las puntuaciones fueron sumados para cada mujer en un rango entre 0 (mínimo consumo) y 8 (máximo). En todos los análisis de dieta se excluyeron las mujeres sin cuestionario de frecuencia dietética (146), las que fumaron durante los últimos 4 meses de embarazo (129) y 25 mujeres con una ingesta de menos de 500 o más de 6000 kilocalorías al día^{89,90}.

3.9. Análisis estadístico

Inicialmente se ha realizado un estudio estadístico descriptivo para reflejar los datos demográficos, recodificando variables cuantitativas como peso al nacer, en variables agrupadas como “bajo peso al nacer” o “peso al nacer en categorías”. También se ha calculado la prevalencia de PEG (pequeño para edad gestacional) teniendo en cuenta el peso y la edad gestacional al nacimiento.

Se han construido modelos de regresión lineal para evaluar la asociación entre peso al nacer, el perímetro cefálico y la edad gestacional comparados con cada sustancia a estudio (dioxinas, óxido de etileno, acrilamida).

Utilizamos modelos de regresión logística para los eventos reproductivos evaluados en una escala continua (peso al nacer, perímetro cefálico al nacer) mediante beta-coeficientes calculados en un intervalo de confianza del 95%. Los modelos de regresión logística binomial se utilizaron para determinar riesgos relativos (RRs) e intervalos del 95% de confianza para pequeño para edad gestacional. Los niveles de aductos de hemoglobina fueron modulados en una escala continua (efecto estimado por incrementos de 10 pmol/g de hemoglobina) o categorizados acordes a cuartiles de distribución. Todos los modelos fueron ajustados por país de nacimiento y edad gestacional (semanas de embarazo completas). El ajuste completo se basó en una selección a priori de potenciales factores de riesgo para peso al nacer reducido

incluyendo hábito tabáquico materno, tabaquismo pasivo, sexo, IMC pre-gestacional, paridad (0, igual o superior a 1), edad materna, etnia materna (blancas, no blancas), y educación materna (baja, media, alta), este último como marcador de nivel socioeconómico.

En el caso de acrilamida, además, los modelos se ajustaron por consumo alto o bajo durante el embarazo (según medianas de consumo específicas por país) de fruta y vegetales (basado en un cuestionario de entre 20 y 61 preguntas), pescado (fresco, en lata, secado, y pescado preparado y marisco), y refrescos como marcadores de una dieta más versus menos sana. Las asociaciones de la dieta materna con los niveles de aductos de hemoglobina de acrilamida en sangre de cordón y con peso al nacer, se estimaron utilizando modelos de regresión logística, ajustados tal y como hemos descrito. Las curvas de respuesta-exposición fueron estimadas, utilizando modelos generalizados aditivos (GAM), con el índice dietético modulado como una línea aplanada con 2 grados de libertad, ajustada por país y edad gestacional.

Los resultados fueron analizados para toda la población y en algunos casos, como en el estudio de óxido de etileno o acrilamida, también estratificando para madres no-fumadoras. La vida media de los eritrocitos es de 4 meses en adultos, por lo que las mujeres que nunca fumaron o dejaron de fumar 4 meses antes del embarazo, se categorizaron como “no fumadoras” y las que nunca fumaron se categorizaron como “nunca fumadoras”.

Además de las asociaciones estimadas ajustadas por país, estimamos asociaciones específicas para cada país entre aductos de hemoglobina de acrilamida / óxido de etileno y peso al nacer y se realizó un meta-análisis para estudiar los efectos cumulativos.

Utilizamos niveles alpha del 5% como referencia, para el valor estadístico de significancia y Stata S.E. versión 10.0 para los análisis estadísticos (StataCorp, College Station, Texas, EEUU).

3.10. Colaboración en la Cohorte NewGeneris

En el Servicio de Obstetricia y Ginecología y dentro del programa de doctorado he formado parte de la cohorte multicéntrica NewGeneris, en el grupo de trabajo incluido en el CREAL (Centre de Recerca Epidemiològica i Ambiental), lo que me ha permitido colaborar de forma fluida con los demás grupos de trabajo y participar en múltiples publicaciones, resumidas en la Tabla 1.

En los múltiples trabajos publicados, destaca la relación entre los eventos reproductivos y la cantidad de aductos “bulky”, que son un marcador integrado de exposición a substancias aromáticas, y que a su vez se asocia a mayor masa corporal y dieta no saludable.

Por su parte, los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de origen nuclear que se originan por roturas cromosómicas debido a errores de la replicación del ADN y su estudio en diferentes tipos de linfocitos también es útil en el asesoramiento de exposición a substancias genotóxicas con potenciales efectos deletéreos en el futuro como el aumento de riesgo de cáncer.

Trabajo	Resumen objetivos	Resumen resultados
Pedersen M y otros, 2013 ⁹¹	Relación entre aductos “bulky” en ADN de sangre umbilical y consumo de frutas y vegetales versus peso al nacer	Un mayor nivel de aductos “bulky” se asoció a menor peso al nacer, más pronunciado en madres con bajo consumo de frutas y vegetales
Pedersen M y otros, 2015 ⁹²	Predictores fetales, maternos, dietéticos y ambientales de aductos “bulky” en ADN de sangre umbilical	Residir en países sud-Europeos, IMC materno alto, cesárea, niños varones y un bajo índice en dieta saludable se asocian a un mayor nivel de aductos “bulky”
Merlo DF y otros, 2014 ⁹³	Asociaciones entre micronúcleos en linfocitos de sangre umbilical y biomarcadores de exposición a carinógenos y factores activos hormonalmente	La exposición a sustancias con efecto androgénico, estrogénico y <i>dioxin-like</i> se asoció a mayor frecuencia de micronúcleos en linfocitos mononucleados
Vande Loock K y otros, 2014 ⁹⁴	Efecto de las frecuencias dietéticas en la formación de micronúcleos en mujeres embarazadas	Mayor consumo de ácidos omega 6-PUFA y 3-PUFA se relacionaron con menor frecuencia de micronúcleos
Papadopoulou E y otros, 2014 ⁹⁵	Exposición prenatal a substancias <i>dioxin-like</i> a través de dieta materna y eventos reproductivos	Un índice de dieta con más substancias <i>dioxin-like</i> se asociaron a menor peso al nacer

Tabla 1 - Resumen de las colaboraciones en otras publicaciones dentro de la cohorte NewGeneris.

4. Resultados

4.1. Dioxinas y distancia ano-genital

Características de la población

Se incluyeron un total de 237 bebés recién nacidos y 462 niños pequeños en el estudio, pertenecientes a las cohortes de Grecia y España. De los bebés, 121 (51%) procedían de la cohorte griega en comparación a los 116 (49%) provenientes de la cohorte española. En cuanto a los niños pequeños (no recién nacidos), todos ellos provenían de la cohorte griega ya que forman parte de la cohorte RHEA.

La edad media de las madres fue de $29,8 \pm 5,4$ años para las madres de los bebés y de $30,1 \pm 4,7$ años para las madres de los niños pequeños, con una mediana de índice de masa corporal (IMC) de 23,4 kg/m² (rango intercuartílico 5,3) y de 23,4 kg/m² (rango intercuartílico 5,1) respectivamente. El 73,7% de bebés fueron alumbrados mediante parto vaginal en contraste con el 50,8% de los niños pequeños, probablemente en relación a que los niños pequeños son todos procedentes de la cohorte griega, donde existe una tasa de cesáreas de alrededor del 50% en la actualidad. El peso medio al nacer fue de $3227 \pm 429,2$ g para los bebés y de $3167 \pm 441,6$ g en los niños pequeños. La etnia mayoritaria era la blanca-europea (75% de los bebés y 100% de los niños pequeños), y el porcentaje de niños y niñas fue similar para los dos grupos de edad (50,2% niños versus 49,8% niñas para el grupo de bebés; 51,7% niños versus 48,3% niñas para el grupo de más edad), como se observa en la Tabla 2.

Característica	Recien nacidos		Niños pequeños	
	<i>n</i>	Valor	<i>n</i>	Valor
Características maternas				
<u>País de residencia (%)</u>				
Grecia	121	49,0	456	100,0
España	116	51,0	0	0
<u>Edad materna [años (media \pm DE)]</u>	237	$29,8 \pm 5,4$	456	$30,1 \pm 4,7$
Pérdidas			6	
<u>IMC pregestacional, kg/cm² [mediana (RIQ)]</u>	224	23,4 (5,3)	456	23,4 (5,1)
Pérdidas	13		6	
<u>Etnia materna (%)</u>				
Europeas no blancas	59	25	0	0
Europeas blancas	177	75	462	100
Pérdidas	1			
<u>Paridad (%)</u>				
Primíparas	95	42,0	155	34,7

Múltiparas	131	58,0	292	65,3
Pérdidas	11		15	
<u>Residencia (%)</u>				
Urbana	201	87,0	335	80,7
Rural	30	13,0	80	19,3
Pérdidas	6		47	
<u>Educación materna (%)</u>				
Baja	67	28,8	89	19,6
Media	100	42,9	223	49,0
Alta	66	28,3	143	31,4
Pérdidas	4		7	
<u>Tipo de hospital (%)</u>				
Privado	52	21,9	175	38,1
Público	185	78,1	284	61,9
Pérdidas			3	
<u>Fumadoras durante el embarazo (%)</u>				
No	154	66,7	358	78,5
Sí	77	33,3	98	21,5
Pérdidas	6		6	
<u>Tipo de parto (%)</u>				
Parto vaginal	174	73,7	232	50,8
Cesárea	62	26,3	225	49,2
Pérdidas	1		5	
Características de los niños y bebés				
<u>Sexo (%)</u>				
Varones	119	50,2	239	51,7
Mujeres	118	49,8	223	48,3
<u>Peso al nacer [g (media ± DE)]</u>	237	3.277 ± 429,2	454	3.167 ± 441,6
Pérdidas			8	
<u>Longitud al nacer, cm [mediana (RIQ)]</u>	234	50,0 (2,0)	447	50,0 (3,0)
Pérdidas	3		15	
<u>Edad gestacional, semanas [mediana (RIQ)]</u>	237	39,0 (2,0)	449	38,0 (1,0)
Pérdidas			13	
<u>Peso en el momento del examen, [g (mean ± SD)]</u>	236	3.229 ± 446,7	456	11.224 ± 2.066,3
Pérdidas	1		6	
<u>Longitud en el momento del examen, cm [mediana (RIQ)]</u>	236	50,0 (2,0)	457	82,5 (11,0)
Pérdidas	1		5	
<u>Edad en el momento del examen, meses [mediana (RIQ)]</u>			462	16,0 (11)
<u>Perímetro cefálico en el momento del examen, cm [mediana (RIQ)]</u>	236	34,5 (1,8)	462	47,5 (3,0)
Pérdidas	1			
<u>Lactancia materna (%)</u>				
No			64	143

Sí			384	85,7
Pérdidas			14	
^a Edad mediana 16 meses; rango 1-31 meses				

Tabla 2 – Características maternas y de los recién nacidos (n= 237) y niños pequeños (n= 462)

Dioxinas y distancia ano-genital

La distancia anogenital (media \pm desviación estándar) en bebés fue más larga en niños (DAG = 48,8 \pm 5,1mm, DAE = 25,5 \pm 4,8mm) que en niñas (DAC = 35,0 \pm 3,3mm, DAF = 14,3 \pm 3,0mm). De forma similar, en los niños pequeños también las distancias en niños (DAG = 80,7 \pm 7,3mm, DAE = 39,9 \pm 6,9mm) fueron más largas que en niñas (DAC = 49,1 \pm 6,0mm, DAF = 21,7 \pm 3,9mm). La media de anchura peneana fue de 10,7 \pm 1,1mm para los recién nacidos y de 14,0 \pm 1,7mm para los niños pequeños.

La media de detección de dioxinas fue de 52,3 \pm 20,7 pg CALUX[®]-TEQ/g lípido en sangre materna de los recién nacidos y de 49,7 \pm 26,7 pg CALUX[®]-TEQ/g lípido en sangre materna de niños pequeños.

El peso medio de los recién nacidos de ambos sexos fue menor en los bebés hijos de madres con niveles de CALUX[®]-TEQs por encima de la mediana (> 53,6 pg CALUX[®]-TEQ/g lípido) comparado con el resto, aunque las diferencias fueron pequeñas y estadísticamente no significativas (3305 \pm 441,6 versus 3282 \pm 386,9g; p=0,887 para recién nacidos varones) y pesos similares en recién nacidas niñas (3140 \pm 46,7 versus 3190 \pm 506,0g; p=0,615). En el caso de niños pequeños varones, se objetivó un peso menor en hijos de madres con niveles de CALUX[®]-TEQs por encima de la mediana (> 50,3 pg CALUX[®]-TEQ/g lípido) estadísticamente significativa (11843 \pm 1967 versus 11239 \pm 2128g; p=0,048 para niños pequeños varones; 10984 \pm 1810 versus 10763 \pm 2175g; p=0,645 para niñas pequeñas mujeres, tal y como se puede ver en la Tabla 3).

	pg CALUX [®] -TEQ/g lípid ^{a,b}				
	n	Bajo	n	Alto	p-Value ^c
Recien nacidos					
Hombres					
Edad gestacional (semanas)	62	38,8 \pm 1,7	57	38,7 \pm 1,4	0,374
Peso en el momento del examen (g)	61	3.305 \pm 441,6	57	3.282 \pm 386,9	0,887
AGD (mm)	62	49,1 \pm 5,3	57	48,4 \pm 4,9	0,617

ASD (mm)	62	25,3 ± 5,3	57	25,7 ± 4,2	0,374
Anchura peneana (mm)	62	10,6 ± 1,1	55	10,9 ± 1,0	0,163
Mujeres					
Edad gestacional (semanas)	52	38,8 ± 1,3	61	38,5 ± 1,8	0,338
Peso en el momento del examen (g)	57	3.190 ± 506,0	61	3.140 ± 469,7	0,615
ACD (mm)	57	35,1 ± 3,8	61	34,9 ± 2,8	0,592
AFD (mm)	57	14,4 ± 3,1	61	14,1 ± 2,6	0,892
Niños pequeños					
Varones					
Peso en el momento del examen (g)	108	11.239 ± 2.128,8	126	11.843 ± 1.967,0	0,048*
Edad en el momento del examen (meses)	110	17,2 ± 7,2	129	18,5 ± 5,7	0,207
AGD (mm)	110	80,0 ± 7,8	127	81,2 ± 6,9	0,142
ASD (mm)	110	39,6 ± 7,1	129	40,2 ± 6,7	0,471
Anchura peneana (mm)	110	14,0 ± 1,7	125	13,9 ± 1,7	0,914
Mujeres					
Peso en el momento del examen (g)	120	10.763 ± 2175,6	102	10.984 ± 1.810,9	0,645
Edad en el momento del examen (meses)	121	16,9 ± 7,3	102	18,2 ± 6,3	0,162
ACD (mm)	121	48,7 ± 6,1	102	49,5 ± 6,0	0,460
AFD (mm)	121	21,8 ± 3,8	102	21,6 ± 4,0	0,760
<p>^a Los niveles medianos de compuestos <i>dioxin-like</i> en los bebés en los grupos de nivel bajo versus alto fueron de 42,5 (RIQ = 21,2; rango 6-53,6) versus 66,1 (RIQ = 12,5; rango, 53,7-106,3) pg CALUX®-TEQ/g lípido, respectivamente.</p> <p>Los niveles medianos de compuestos <i>dioxin-like</i> en los niños pequeños en los grupos de nivel bajo versus alto fueron de 34,7 (RIQ = 22,0; rango 6-6-50,2) versus 63,5 (RIQ = 14,4; rango, 50,4-225,7) pg CALUX®-TEQ/g lípido, respectivamente.</p> <p>^b El nivel mediano de compuestos <i>dioxin-like</i> en el grupo de los bebés fue de 53,6 pg CALUX®-TEQ/g de lípido versus 50,3 pg CALUX®-TEQ/g de lípido en el grupo de los niños pequeños. Los valores bajo la mediana fueron categorizados como altos, así como los valores por debajo de la media fueron categorizados como bajos en ambos grupos de edad.</p> <p>^c Test de Kruskal-Wallis</p> <p>* p < 0,05</p>					

Tabla 3 – Media (± DE) de las variables antropométricas de los bebés (n=231) y niños pequeños (n=462) categorizados según los niveles medianos de actividad *dioxin-like* en plasma materno expresado en pg CALUX®-TEQ/g de lípido.

La actividad *dioxin-like* fue asociada negativamente a la AGD en bebés varones, de forma que la estimación de cambio en mm de AGD en recién nacidos varones por cada aumento de 10pg CALUX®-TEQ/g lípido fue de 0,41mm (IC 95% -0,77, -0,06) aplicando el modelo de ajustamiento estadístico básico (ajustando por peso al nacer, edad gestacional y cohorte), con resultados similares para el ajustamiento estadístico completo (ajustando además por edad, etnia y educación maternas, tabaco durante la gestación, paridad, IMC pregestacional y tipo de residencia). En la misma línea, se

observaron asociaciones negativas aunque no significativas para el parámetro ASD en recién nacidos varones (-0,14mm; IC 95% -0,51, 0,23). También para los niños pequeños varones se hallaron asociaciones negativas en cuanto a AGD aunque de valor muy discreto y no estadísticamente significativas. En cuanto a las recién nacidas y niñas pequeñas de sexo femenino, los cambios fueron prácticamente nulos al comparar los parámetros antropométricos genitales con el aumento de actividad *dioxin-like*.

Tal y como se observa en la Figura 3 Figura 3 – GAMS, asociaciones ajustadas (95% IC) entre actividad dioxin-like y AGD en recién nacidos (A) y niños pequeños (B). (A) están ajustados por peso al nacer, cohorte, etnia materna y educación materna. (B) están ajustados por peso y edad en el momento del examen, examinador, hospital, educación materna, tabaquismo durante el embarazo y residencia. ++, observaciones., en los modelos aditivos generalizados (GAM) no se observaron asociaciones de linealidad significativas cuando se comparó AGD en milímetros con actividad *dioxin-like* medida en picogramos de CALUX®-TEQ/g lípido.

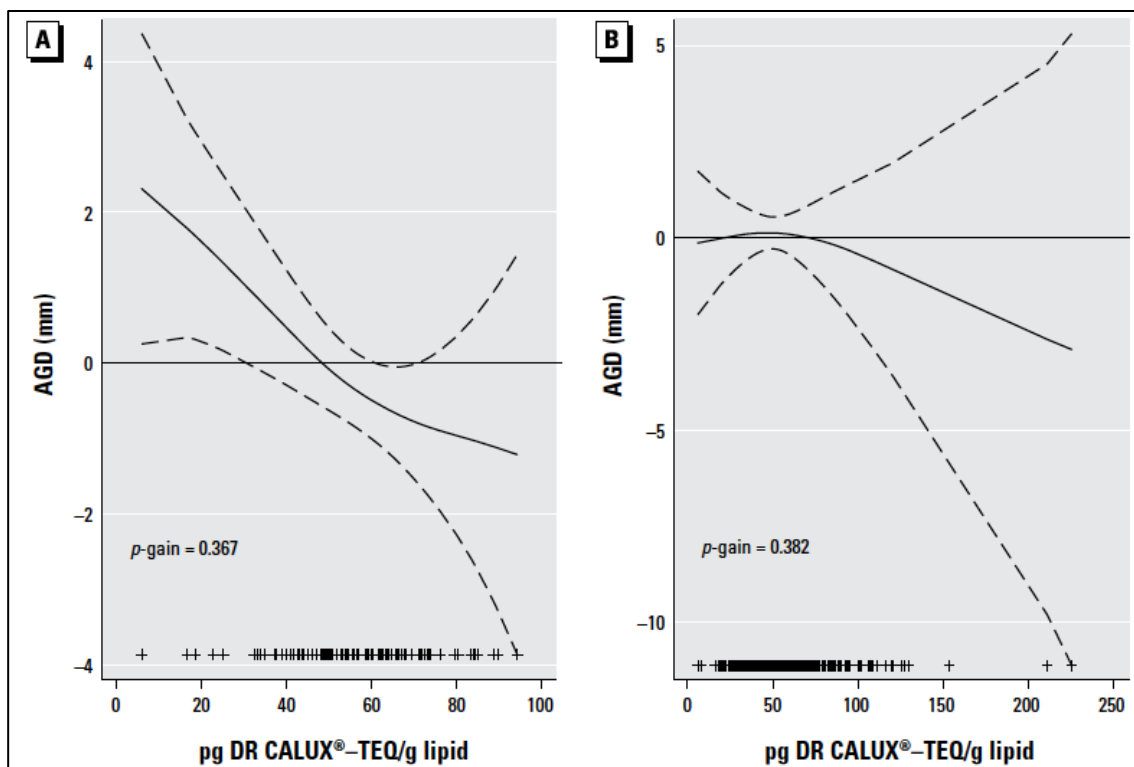


Figura 3 – GAMS, asociaciones ajustadas (95% IC) entre actividad dioxin-like y AGD en recién nacidos (A) y niños pequeños (B). (A) están ajustados por peso al nacer, cohorte, etnia materna y educación materna. (B) están ajustados por peso y edad en el momento del examen, examinador, hospital, educación materna, tabaquismo durante el embarazo y residencia. ++, observaciones.

4.2. Dioxinas y parámetros antropométricos en el nacimiento

Características de la población

Se incluyeron 967 pares de mujeres embarazadas-hijo de once maternidades entre 2006 y 2010, en el contexto del estudio NewGeneris. Todas las embarazadas tuvieron un solo hijo, y tenían al menos una medida de CALUX[®]. El 48% de los niños fueron varones, el 55% nacidos vía parto vaginal y la edad materna media fue de 31(±5) años. El 92% de las madres eran de origen caucásico, y el 67% eran primigestas. El índice de masa corporal (IMC) pre-gestacional medio fue de 23 kg/m², con un 33% de madres con sobrepeso u obesidad (con un IMC pre-gestacional por encima de 25 kg/m²). Un 24% de las madres tenían un nivel educativo bajo, y el 17% fumaron durante el embarazo (ver Tabla 4).

	Sujetos con muestra de DR CALUX[®] pg TEQ/g lípido en sangre umbilical						
Características	Rhea	Inma	MoBa Bramat	MoBa Bramilioe	BiB	Biobanco Danés'07	Biobanco Danés'09
Edad materna (años)	44(29,3±5,6)	35(31,5±4,1)	73(31,3±4,2)	8(31,0±2,6)	20(30,9±5,9)	46(33,2±4,2)	43(32,0±3,6)
Paridad							
Primíparas	5(11,6)	13(38,2)	29(39,7)	5(62,5)	5(26,3)	4(8,9)	26(60,5)
Múltiparas	38(88,4)	21(61,8)	44(60,3)	3(37,5)	14(73,7)	41(91,1)	17(39,5)
IMC pre-gestacional (kg/m²)	44(25,6±4,8)	28(24,6±4,7)	73(23,8±4,4)	8(22,4±4,0)	11(24,9±6,8)	46(24,2±4,3)	43(22,5±3,5),
Educación materna							
Alta	5(12,8)	0	21(30,9)	4(50,0)	5(35,7)	25(54,3)	27(62,8)
Media	28(71,8)	2(100,0)	23(33,8)	4(50,0)	3(21,4)	12(26,1)	11(25,6)
Baja	6(15,4)	0	24(35,3)	0	6(42,7)	9(19,6)	5(11,6)
Tabaquismo durante el embarazo							
No	22(50,0)	22(64,7)	67(95,4)	8(100,0)	17(89,5)	44(95,7)	41(95,3)
Sí	22(50,0)	12(35,3)	4(5,6)	0	2(10,5)	2(4,2)	2(4,7)
Etnia materna							
Caucásica	44(100,0)	23(69,7)	73(100,0)	8(100,0)	12(60,0)	43(93,5)	43(100,0)
No caucásica	0	10(30,3)	0	0	8(40,0)	3(6,5)	0
Tipo de parto							
Vaginal	17(38,6)	26(76,5)	64(87,7)	7(87,5)	1(5,0)	0	33(76,7)
Cesárea	27(61,4)	8(23,5)	9(12,3)	1(12,5)	19(95,0)	46(100,0)	10(23,3)
	Sujetos con muestra de DR CALUX[®] pg TEQ/g lípido en sangre materna						
Edad materna (años)	146(29,4±5,2)	157(30,0±5,4)	68(31,5±4,6)	116(31,5±4,0)	111(30,6±5,2)	91(33,2±4,4)	99(32,5±4,2)
Paridad							
Primíparas	38(27,5)	64(41,0)	31(45,6)	55(47,4)	10(9,5)	16(18,8)	54(55,7)

Múltiparas	100(72,5)	92(59,0)	37(54,4)	61(52,6)	95(90,5)	69(81,2)	43(44,3)
IMC pre-gestacional (kg/m²)	136(25,0±5,0)	140(24,1±4,9)	67(23,3±4,1)	116(22,7±3,4)	67(28,9±7,3)	88(23,5±4,3)	96(22,1±3,6)
Educación materna							
Alta	21(18,6)	31(25,6)	19(29,7)	52(44,8)	27(36,5)	45(51,1)	60(62,5)
Media	74(66,1)	47(38,8)	22(34,4)	46(39,7)	17(23,0)	20(22,7)	28(29,2)
Baja	17(15,2)	43(35,5)	23(35,9)	18(15,5)	30(40,5)	23(26,1)	8(8,3)
Tabaquismo durante el embarazo							
No	86(59,3)	113(73,4)	64(97,0)	108(95,6)	94(85,5)	84(94,4)	93(95,9)
Sí	59(40,7)	41(26,6)	2(3,0)	5(4,4)	16(14,5)	5(5,6)	4(4,1)
Etnia materna							
Caucásica	149(100,0)	82(53,2)	68(100,0)	116(100,0)	67(60,4)	86(95,6)	95(97,9)
No caucásica	0	72(46,8)	0	0	44(39,6)	4(4,4)	2(2,1)
Tipo de parto							
Vaginal	65(43,6)	136(87,7)	62(91,2)	108(93,1)	1(0,9)	0	81(81,8)
Cesárea	84(56,4)	19(12,3)	6(8,8)	8(6,9)	110(99,1)	91(100,0)	18(18,1)

Tabla 4 – Características de las participantes del estudio según los diferentes centros.

Niveles de actividad dioxin-like y eventos reproductivos

Los niveles de actividad *dioxin-like* en sangre de cordón y sangre materna difirieron entre países. Los niveles más altos de actividad *dioxin-like* en sangre de cordón se encontraron en Inglaterra (GM=59,7 pg CALUX®-TEQ/g lipid, 95% CI de 43,3 a 82,4) y los más bajos en España (GM=16,9 pg CALUX®-TEQ/g lipid, 95% CI de 13,3 a 21,4). Los niveles más altos de actividad *dioxin-like* en sangre materna se encontraron en España (GM=46,4 pg CALUX®-TEQ/g lipid, 95% CI=43,1 a 50,1) y los más bajos en Grecia (GM=15,5 pg CALUX®-TEQ/g lipid, 95% CI=13,3 a 18,1). Además, la actividad *dioxin-like* en sangre de cordón fue menor en los partos vaginales (GM=25,3 pg CALUX®-TEQ/g lipid, 95% CI=22,4 a 28,5) que en cesáreas (32,5 pg CALUX®-TEQ/g lipid 95% CI=28,5 a 37,1), en gran parte debido a la diferente distribución del tipo de parto según el país y la edad gestacional.

La actividad *dioxin-like* en sangre de cordón se correlacionó con la actividad en sangre materna, aunque la correlación fue débil (coeficiente Spearman = 0,18, valor p 0,007) y se observaron diferencias entre países (ver Figura 4). La actividad *dioxin-like* en plasma fue mayor en sangre materna respecto a sangre de cordón con una mediana de 38,3 (29,3) y 34,2 (28,9) pg CALUX®-TEQ/g de lípido, respectivamente.

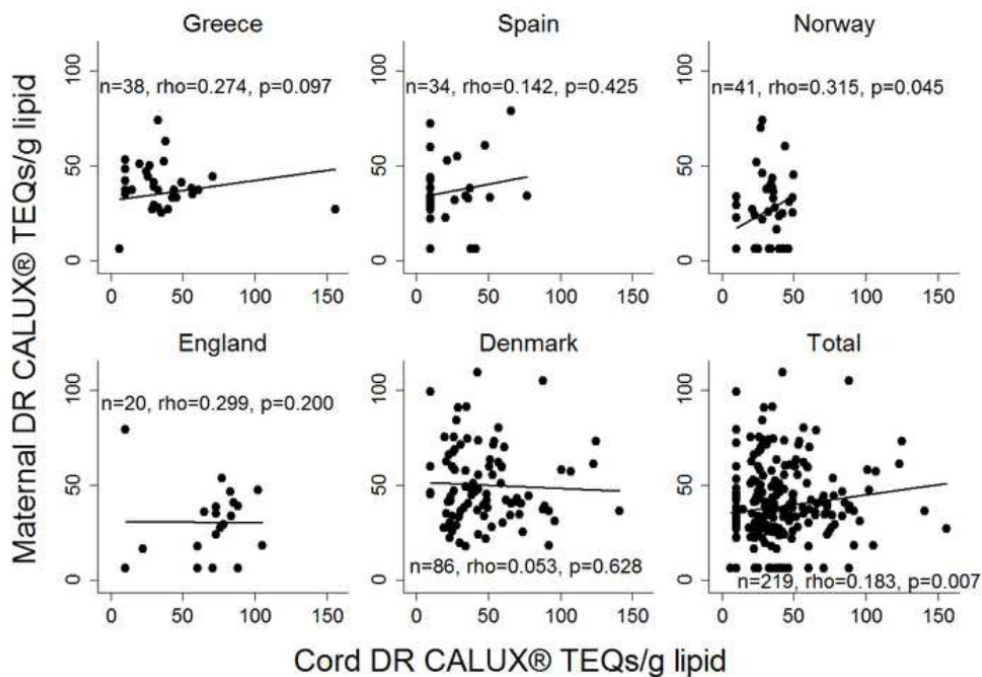


Figura 4 – DR CALUX® TEQs/g de lípido en sangre umbilical según la cohorte

La media de peso al nacer de la población de estudio con mediciones de actividad *dioxin-like* en sangre de cordón fue de 3476 (\pm 450) g, con una circunferencia cefálica media de 352 (\pm 15) mm y una edad gestacional media de 39 (\pm 1) semanas (ver Tabla 5). Paralelamente, la media de peso al nacer en bebés con medición de actividad *dioxin-like* en sangre materna fue de 3447 (\pm 456) g, la circunferencia cefálica media de 349 (\pm 2) mm y la edad gestacional media de 39 (\pm 1) semanas.

Características	Sujetos con muestra de sangre de cordón DR CALUX® pq TEQ/g lipid					Sujetos con muestra de sangre materna DR CALUX® pq TEQ/g lipid				
	n	Media \pm DE	Percentil			n	Media \pm DE	Percentil		
			25	50	75			25	50	75
Peso al nacer (g)	269	3476 \pm 450	3170	3452	3782	791	3447 \pm 456	3130	3430	3750
Perímetro cefálico al nacer (mm)	211	352 \pm 15	340	350	360	697	349 \pm 2	340	350	360
Edad gestacional (semanas)	269	39 \pm 1	38	39	40	791	39 \pm 1	38	39	40
			Percentil					Percentil		

<i>Actividad dioxin-like en plasma</i>	n	Mediana (IC 95%)	Media ± DE	25	50	75	n	Mediana (IC 95%)	Media ± DE	25	50	75
Pg TEQ/g lípido	269	29,6 (27,1 a 32,4)	38,0 ± 26,0	20,1	34,2	49	791	29,9 (28,2 a 31,7)	39,0 ± 22,7	24,26	38,3	53,5
Pg TEQ/ml plasma	819	0,1 (0,1 a 0,1)	0,2 ± 0,1	0,1	0,1	0,2	896	0,3 (0,2 a 0,3)	0,3 ± 0,2	0,2	0,3	0,4

Tabla 5 – Distribución de eventos reproductivos y niveles de actividad dioxin-like en plasma en la población de estudio con muestras de sangre de cordón y materna.

Asociación entre actividad dioxin-like y eventos reproductivos

Las gráficas GAM examinando la forma de la relación entre la actividad *dioxin-like* en sangre materna y de cordón y los eventos reproductivos mostró relaciones lineales para todos los eventos reproductivos (para los modelos de sangre de cordón: p-ganancia peso al nacer =0,648, p-ganancia perímetro cefálico=0,449, p-ganancia edad gestacional =0,417; para los modelos de sangre materna: p-ganancia peso al nacer =0,749, p-ganancia perímetro cefálico=0,741, p-ganancia edad gestacional =0,398; siendo significativa la linealidad a partir de 0,2).

En la Tabla 6 se pueden observar los resultados de la regresión ajustada y cruda para la asociación entre actividad *dioxin-like* y eventos reproductivos. Dado que los modelos fueron calculados con escala logarítmica decimal, un incremento de una unidad implicaría un aumento en 10 veces en la actividad *dioxin-like*.

	Cambio en peso al nacer (g)		Cambio en perímetro cefálico (mm)		Cambio en edad gestacional (semanas)	
	n = 247		n = 205		n = 260	
	Crudo ^a	Ajustado	Crudo ^a	Ajustado ^c	Crudo ^d	Ajustado ^e
DR CALUX® Cordón	β (IC 95%)	β (IC 95%)	β (IC 95%)	β (IC 95%)	β (IC 95%)	β (IC 95%)
Log ₁₀ pg TEQ/q lípido	-82 (-264 a 100)	-76 (-251 a 100)	-0,4 (-7 a 7)	-1 (7 a 6)	-0,8 (-1,4 a 0,2)	-0,5 (-1,0 a 0,04)
Bajo ⁱ	0	0	0	0	0	0
Medio	-58 (-182 a 66)	-58 (-176 a 62)	0,2 (-5 a 5)	0,2 (-4 a 5)	-0,2 (-0,6 a 0,2)	-0,1 (-0,5 a 0,3)
Alto	-80 (-219 a 59)	-82 (-216 a 53)	-2 (-7 a 4)	-2 (-7 a 3)	-0,6 (-1,1 a -0,2)	-0,4 (-0,8 a -0,1)
Test tendencia	0,250	0,225	0,510	0,410	0,007	0,029
DR CALUX® Materno	n = 701		n = 632		n = 763	
	Crudo ^a	Ajustado ^f	Crudo ^a	Ajustado ^g	Crudo ^d	Ajustado ^h

Log ₁₀ pg TEQ/q lípido	7 (-89 a 102)	5 (-88 a 97)	2 (-2 a 5)	1 (-2 a 5)	0,3 (-0,003 a 0,6)	0,2 (-0,04 a 0,5)
Bajo ⁱ	0	0	0	0	0	0
Medio	0,9 (-77 a 78)	-11 (87 a 65)	1 (-2 a 3)	-1 (-3 a 2)	0,2 (-0,1 a 0,4)	0,2 (-0,03 a 0,4)
Alto	7 (-76 a 89)	-2 (83 a 79)	1 (-2 a 4)	1 (-2 a 4)	0,3 (0,1 a 0,6)	0,2 (-0,1 a 0,4)
Test tendencia	0,875	0,971	0,641	0,641	0,019	0,121
^a Ajustado por: país, edad gestacional y edad gestacional al cuadrado						
^b Ajustado por: país, edad gestacional, edad gestacional al cuadrado, edad materna, paridad, IMC pre-gestacional, etnia materna, tipo de parto y sexo						
^c Ajustado por: país, edad gestacional, edad gestacional al cuadrado, paridad, IMC pre-gestacional, tipo de parto y sexo						
^d Ajustado por país						
^e Ajustado por país, tabaquismo, paridad y tipo de parto						
^f Ajustado por país, edad gestacional, edad gestacional al cuadrado, paridad, IMC pre-gestacional y sexo						
^g Ajustado por país, edad gestacional, edad gestacional al cuadrado, IMC pre-gestacional, tipo de parto y sexo						
^h Ajustado por país, paridad, tipo de parto y sexo						
ⁱ Categoría de referencia						
Tertiles DR CALUX® en sangre de cordón: Bajo (10-24 pg TEQ/g lípido), Medio (25-43,1 pg TEQ/g lípido), Alto (43,3-156 pg TEQ/g lípido).						

Tabla 6 – Asociación entre actividad dioxin-like en sangre de cordón y materna y eventos reproductivos

Niveles crecientes en la actividad *dioxin-like* en sangre de cordón se asociaron a un descenso en 76 gramos en el peso al nacer (IC 95% entre -251 y 100g) en el modelo ajustado. También se observó un menor peso al nacer en niños en los tertiles de actividad *dioxin-like* medio ($\beta = -58$ g, IC 95%: -176 a 62) y alto ($\beta = -82$ g, IC 95%: -216 a 53) en comparación al bajo. Asimismo también se observó una disminución de media semana en la edad gestacional cuando se compararon los tertiles de actividad *dioxin-like* alto versus bajo ($\beta: -0,4$ weeks, IC 95%: -0,8 a -0,1).

No se observaron asociaciones entre actividad *dioxin-like* en sangre de cordón y perímetro cefálico, ni tampoco entre actividad *dioxin-like* en sangre materna y eventos reproductivos.

El análisis limitado a los sujetos con actividad *dioxin-like* por debajo del límite de detección (LOD) mostró un patrón similar para ambos peso al nacer y edad gestacional

(tabla 7). Obtuvimos resultados muy similares cuando incluimos en cada modelo estadístico variables seleccionadas mediante el uso de diagramas causales (Figura 5, edad materna paridad, IMC pre-gestacional, nivel educativo de las madres, etnia materna). Cuando los modelos con sangre materna se ajustaron por actividad *dioxin-like* en sangre de cordón y viceversa restringiendo el análisis a la muestra que tenía información sobre ambos tipos de muestra (sangre de cordón y materna), no se observaron cambios en los resultados observados en la asociación entre actividad *dioxin-like* en muestras de cordón y eventos reproductivos.

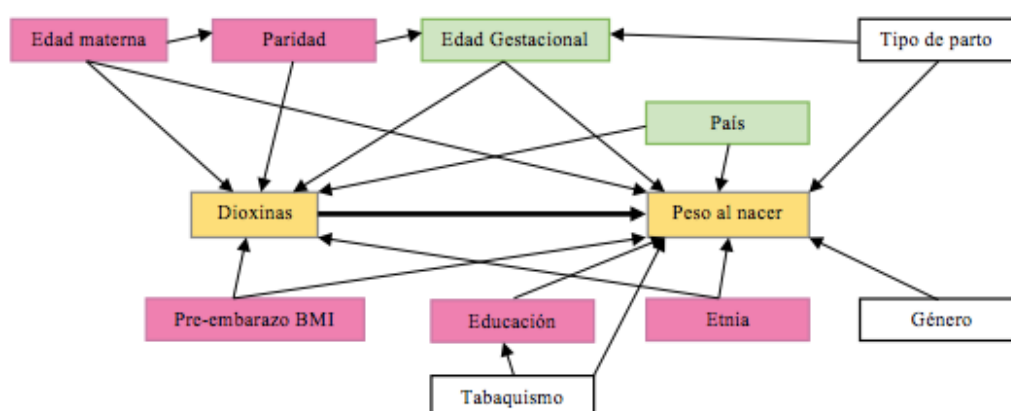


Figura 5 – Diagrama de las influencias potenciales en la relación entre el nivel de dioxinas y el peso al nacer. En verde aparecen las variables incluidas en el modelo básico, en blanco las variables consideradas pero descartadas finalmente, y en rosa las que se incluyeron en el modelo de ajuste completo.

Tipo de muestra disponible	Número de muestras	Número de muestras con medidas DR CALUX® por debajo del límite de detección (%)
Lípido cordón	269	207 (77)
Plasma cordón	819	459 (56)
Plasma y lípido cordón	255	128 (50,2)
Lípido materno	791	644 (81,4)
Plasma materno	896	771 (86)
Plasma y lípido materno	775	637 (82,2)
Lípido cordón y materno	219	156 (71,2)
Plasma cordón y materno	754	430 (57)
Cordón y materno, plasma	208	105 (50,5)

Tabla 7 – Distribución del total de 967 muestras analizadas con DR CALUX® según su procedencia, y número y porcentaje de muestras por debajo del límite de detección.

El análisis estratificado según IMC pre-gestacional (Normal $\geq 18,5$ -25 kg/m²; Sobrepeso/Obesidad ≥ 25 kg/m²) no cambió nuestros resultados (no mostrado). La actividad *dioxin-like* en sangre de cordón mostró una asociación negativa mayor con peso al nacer en niños varones ($\beta = -124$ g, 95% CI: -391 to 144) respecto a niñas ($\beta = -57$ g, 95% CI: -300 to 185), aunque no había claros indicios de modificación de efectos según sexo (p-interacción 0,221). No se observaron interacciones según sexo en el caso de edad gestacional (p =0,973). Se observaron asociaciones mayores entre actividad *dioxin-like* en sangre de cordón y peso al nacer en hijos/as de fumadoras comparado con hijos/as de no fumadoras pero tampoco esta vez fue una interacción significativa (p-interacción=0.804). Se observaron asociaciones negativas entre actividad *dioxin-like* en sangre de cordón y peso al nacer en 4 de 5 países (Grecia: n=43, $\beta = -189$ g, IC 95%: -585 a 208, España: n=24, $\beta = -57$ g, IC 95%: -756 a 641, Noruega: n=81, $\beta = 182$ g, IC 95%: -127 a 492, Inglaterra: n= 11, $\beta = -1002$ g, 95% CI: - 23323 a 21319, Dinamarca: n=88, $\beta = -83$ g, IC 95%: -440 a 275), así como una menor edad gestacional en todos los países (Grecia: n=43, $\beta = -0.4$ semanas, IC 95%: -1.7 to 0.8; España: n=32, $\beta = -0,3$ semanas, IC 95%: -2,6 a 2,1; Noruega: n=79, $\beta = -0,4$ semanas, IC 95%: -1,3 a 0,6; Inglaterra: n= 18, $\beta = -0,2$ semanas, IC 95%: -1,6 a 1,2; Dinamarca: n=88, $\beta = -0,5$ semanas, IC 95%: -1,3 a 0,3). Un meta-análisis país-específico mostró que un aumento en 10 veces la actividad *dioxin-like* en sangre de cordón se asociaba a un descenso en 2g (IC 95% -196 a 191) en el peso al nacer, y un descenso en 0.4 semanas (IC 95% -0,9 a 0,1) en la edad gestacional, con una heterogeneidad no significativa entre países (I²=0,0%, Q = 2,4 con 4 grados de libertad y p=0,656; e I²=0,0%, Q=0,2 con 4 grados de libertad y p=0,996; respectivamente para peso al nacer y edad gestacional).

Cuando expresamos la actividad *dioxin-like* en unidades volumétricas en lugar de gramos de grasa, la mediana (IQR) fue de 0,1 (0,2, n=819) pg CALUX®-TEQ/mL de plasma con un 44% por debajo del límite de detección (tabla 2).

Los resultados de los análisis basados en volumen (ml plasma) para todos los sujetos no mostraron un patrón consistente, mientras que aquellos basados en sujetos por debajo del límite de detección mostraron un patrón similar para peso al nacer y edad

gestacional, así como aquellos basados en gramos de lípido. Aun así, las estimaciones tienen intervalos de confianza muy amplios.

4.3. Óxido de etileno y eventos reproductivos

Resultados generales

Los aductos de óxido de etileno fueron analizados en 1108 parejas materno-fetales recogidas en el parto. La edad media de las madres era de 30,9 ($\pm 5,2$) años, de las que 383 (35,93%) eran nulíparas, 908 (82,92%) de raza blanca y origen europeo, 129 (11,92%) fumaban durante el embarazo y 620 (56,4%) tuvieron partos vaginales y una edad gestacional de 39,0 ($\pm 1,4$) semanas completas de embarazo, tal y como se muestra en la Tabla 8.

	Todos (n=1108)			No fumadoras (n=953)		
	n	%	media \pm sd	n	%	media \pm sd
País de nacimiento						
Grecia	246	22,20	-	184	19,31	-
España	225	20,31	-	185	19,41	-
Noruega	233	21,03	-	227	23,82	-
Reino Unido	187	16,88	-	154	16,16	-
Dinamarca	217	19,58	-	203	21,30	-
Tabaquismo al final del embarazo						
No	953	88,08	-	-	-	-
Sí	129	11,92	-	-	-	-
Tabaquismo secundario						
No	633	64,00	-	604	69,03	-
Sí	356	36,00	-	271	30,97	-
Etnia materna						
Europea blanca	908	82,92	-	773	81,20	-
No-Europea blanca	187	17,08	-	179	18,80	-
Edad materna (años)	1095	-	30,9 \pm 5,2	952	-	31,1 \pm 5,1
<25	129	11,64	-	101	10,60	-
25-35	763	68,86	-	667	69,99	-
>35	216	19,49	-	185	19,41	-
Paridad						

Nulíparas	383	35,93	-	347	37,27	-
Múltiparas	683	64,07	-	584	62,73	-
IMC pre-gestacional	975		24,11±4,77	864		24,02±4,60
<18,5	43	3,9		35	3,7	
18,5 - 25	620	56,0		560	58,8	
>25-30	202	18,2		178	18,7	
>30	243	21,9		180	18,9	
Suplementos vitamínicos						
No	124	13,6		109	13,4	
Sí	790	86,4		704	86,6	
Alcohol						
No	759	79,1		665	78,9	
Sí	201	21,0		178	21,1	
Educación materna						
Alta	349	36,2		334	38,8	
Media	373	38,6		328	38,1	
Baja	243	25,2		198	23,0	
Tipo de parto						
Vaginal	620	56,4		552	58,0	
Cesárea	479	43,6		399	41,2	
Estación de nacimiento						
Marzo-Mayo	324	29,3		279	29,3	
Junio-Agosto	192	17,4		154	16,2	
Septiembre-Noviembre	338	30,6		295	31,0	
Diciembre-Febrero	252	22,8		225	23,6	
Año de nacimiento						
2006	8	0,72		8	0,84	
2007	273	24,7		228	23,9	
2008	409	37,0		361	37,9	
2009	386	34,9		329	34,5	
2010	30	2,71		27	2,83	
Cohorte						
BIB	187	16,9		154	16,2	
Rhea	246	22,2		184	19,3	

Biobanco Danés 07	82	7,4		75	7,9	
Biobanco Danés 09	135	12,2		128	13,4	
INMA	225	20,3		185	19,4	
MOBA Bramat	122	11,0		121	12,7	
MOBA Bramiljio	111	12,2		106	11,1	
Sexo						
Niños	550	50,0		477	50,2	
Niñas	550	50,0		474	49,8	
Edad gestacional (semanas)			39±1,37			39,0±1,4
Parto pretérmino						
No	1059	96,4		919	96,5	
Sí	39	3,55		33	3,47	
Peso al nacer (g)			3414,7±461,7			3443,3±456,0
Peso bajo al nacer						
No: ≥ 2500g	1080	98,4		939	98,8	
Sí: < 2500g	18	1,64		11	1,16	
Peso al nacer categórico						
<2500g	18	1,62		11	1,15	
2500-3500	627	56,6		520	54,6	
>3500-4000	343	31,0		316	33,2	
>4000	120	10,8		106	11,1	
Pequeño para edad gestacional						
No	815	92,0		716	92,5	
Sí	71	8,01		58	7,50	
Perímetro cefálico (cm)			34,78±1,68			34,85±1,69
Longitud (cm)			50,77±2,07			50,84±2,08
Aductos de Hb de óxido de etileno						
Sangre de cordón			13,35±13,89			10,54±6,69
Sangre materna			32,05±60,51			15,84±10,02

Tabla 8 - Características de la población de estudio para el análisis óxido de etileno – eventos reproductivos.

La media de aductos de óxido de etileno fue de 13,35 ($\pm 13,89$) pmol/g (pmol de aducto/g de globina) en sangre de cordón y 32,05 ($\pm 60,51$) pmol/g en sangre materna, con una correlación positiva significativa entre ellas (correlación fuerte; 0,94).

Los niveles de aducto de hemoglobina de óxido de etileno fue superior en madres fumadoras respecto a no fumadoras (33,50 \pm 28,36 vs 10,54 \pm 6,69 pmol/g para sangre de cordón - $p < 0.001$; 123.58 \pm 120.60 vs 15.84 \pm 10.02 pmol/g en sangre materna).

Aductos de óxido de etileno y peso al nacer

Mayores niveles de aductos de óxido de etileno se asociaron a un descenso de peso al nacer. La media de peso al nacer disminuía en 37,73g (IC 95% -55,95; -19,52) por cada aumento de 10pmol/g en aducto de óxido de etileno en la población general, y de 45,63g (IC 95% -85,33 ; -5,93) en la población de no fumadoras.

La variable peso al nacer dibujó una asociación en U invertida con cuartiles crecientes de exposición (Tabla 10). La diferencia estimada en peso al nacer para niños en el mayor versus menor cuartil de exposición de niveles de aducto de Hb de óxido de etileno tras ajustar por edad gestacional fueron de -94,07g (IC 95% -164,68; -23,45) en la población general y -45,69g (IC 95% -126,14; 34,75) en el grupo de las no fumadoras.

Estas asociaciones se analizaron ajustando por múltiples covariables y sólo fumar tabaco al final del embarazo y paridad mostraron una modificación del efecto por encima del 10% (-51.2% y +17.8% respectivamente). La regresión con modelo de ajuste completo (teniendo en cuenta edad gestacional, edad materna, país, fumar tabaco al final del embarazo y paridad) siguió mostrando una asociación negativa significativa entre aductos de óxido de etileno y peso al nacer (-26,74 por cada aumento de 10pmol/g, IC 95% -48,84; -4,64) (Tabla 9 y 10). La linealidad se confirmó con análisis GAM para el modelo de ajuste completo, con una tendencia decremental. Los análisis se realizaron utilizando la población más restrictiva, con información sobre todas las variables incluidas en el modelo de ajuste completo.

PESO AL NACER	Asociación con aductos de Hb de óxido de etileno			
	Número de sujetos	Coefficiente β	DE	valor p

Todos los sujetos				
- ajuste básico (edad gestacional + país)	1049	-3.36	0.98	0.001
- ajuste completo (edad gestacional + país+ sexo + edad materna + paridad + tabaquismo)	1049	-2.67	1.12	0.018
No fumadoras				
- ajuste básico (edad gestacional + país)	926	-2.71	2.04	0.185
- ajuste completo (edad gestacional + país+ sexo + edad materna + paridad)	926	-3.08	2.00	0.124
- ajuste completo para expuestas a tabaquismo pasivo*	263	-3.05	344	0.377
- ajuste completo para no expuestas a tabaquismo pasivo*	589	-2.26	2.99	0.450

*Tabla 9 – Modelo de regresión lineal para peso al nacer en relación a niveles de aducto de Hb de óxido de etileno (por incremento en 1pmol/g de aducto de Hb) según diferentes niveles de ajuste en toda la población y en no fumadoras (*74 pérdidas para tabaquismo pasivo).*

Estos resultados fueron intensamente apoyados por el análisis de muestras de sangre de cordón procedentes de Grecia y Reino Unido, pero inconsistentes en los otros países. El meta-análisis de la correlación entre aductos de óxido de etileno y peso al nacer mostró heterogeneidad entre los países, aunque la asociación global es todavía negativa y significativa para ambos los modelos con ajuste básico y completo (Figura 6). El patrón fue más consistente entre las no fumadoras (Figura 7), aunque la asociación negativa general fue no estadísticamente significativa.

En cuanto al impacto del tabaquismo en el peso al nacer, probablemente produce su efecto vía exposición a óxido de etileno, aunque también por exposición a otros tóxicos presentes en el tabaco. Esta hipótesis se sustenta en el cambio en el modelo de regresión lineal con ajuste básico evaluando tabaquismo, que disminuye el peso al nacer en -0,20g (IC 95% entre -0,35 ; -0,05); en comparación al mismo modelo añadiendo aductos de óxido de etileno, que disminuye el peso al nacer en -0,14g (IC 95% -0,38 ; 0,1).

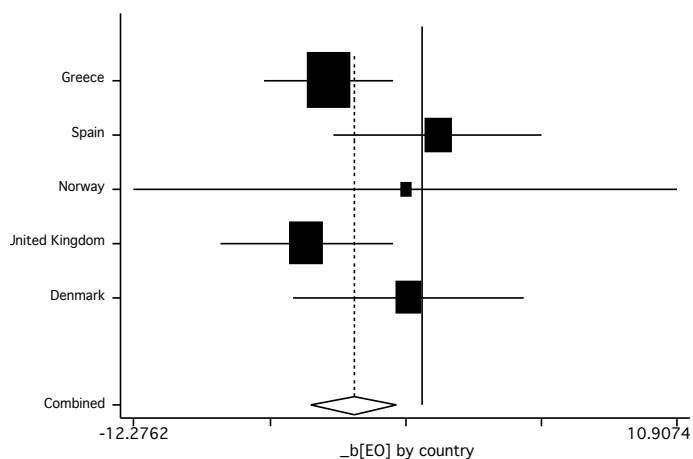


Figura 6 – Meta-análisis por país de regresión lineal para peso al nacer en relación a nivel de aductos de Hb de óxido de etileno – toda la población

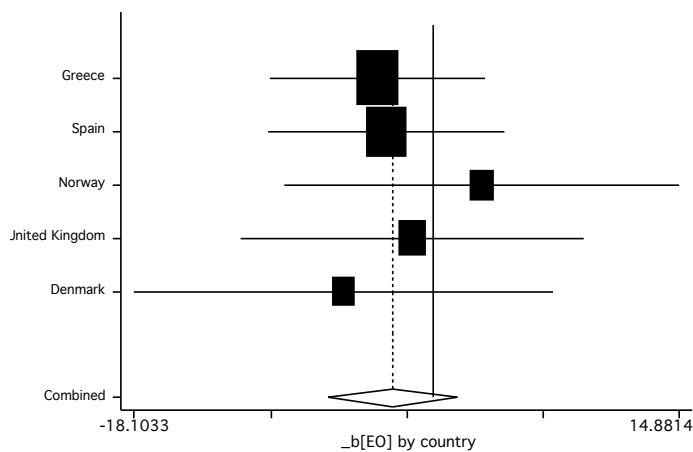


Figura 7 – Meta-análisis por país de regresión lineal para peso al nacer en relación a nivel de aductos de Hb de óxido de etileno – toda la población

	Aductos Hb óxido de etileno		
Variable	n	β (IC 95%)	p
Ajuste básico*			
<i>Todas</i>			
Cambio por 10pmol/g Hb	1094	-37.73 (-55.95, -19.52)	<0.001
Cuartil 1 (menor)	274	Ref: 3426.94 g	
Cuartil 2	277	38.19 (-32.10, 108.48)	0.287
Cuartil 3	271	-28.44 (-99.17, 42.29)	0.430
Cuartil 4 (mayor)	272	-94.07 (-164.68, -23.45)	0.009
<i>No fumadoras</i>			

Cambio por 10pmol/g Hb	948	-45.63 (-85.33, -5.93)	0.024
Cuartil 1 (menor)	263	Ref: 3432.17 g	
Cuartil 2	262	28.18 (-43.33, 99.69)	0.440
Cuartil 3	251	-16.29 (-88.67, 56.09)	0.659
Cuartil 4 (mayor)	172	-45.69 (-126.14, 34.75)	0.265
Ajuste completo**			
Todas			
Cambio por 10pmol/g Hb	1094	-20.67 (-48.83, -4.63)	0.018
Cuartil 1	274	Ref: 3426.94 g	
Cuartil 2	277	24.53 (-45.10, 94.16)	0.489
Cuartil 3	271	-43.52 (-114.88, 27.84)	0.232
Cuartil 4	272	-33.75 (-109.65, 42.15)	0.383
No fumadoras			
Cambio por 10pmol/g Hb	948	-30.81 (-70.03, 8.42)	0.124
Cuartil 1	263	Ref: 3432.17g	
Cuartil 2	262	16.93 (-53.18, 87.04)	0.636
Cuartil 3	251	-28.23 (-100.24, 43.77)	0.442
Cuartil 4	172	-20.77 (-99.98, 58.43)	0.607
*Ajuste básico hace referencia a: edad gestacional y sexo del niño.			
**Ajuste completo hace referencia a: país, tabaco, edad materna, edad gestacional, paridad y sexo del niño.			

Tabla 10 - Asociación entre peso al nacer y aductos de hemoglobina de óxido de etileno

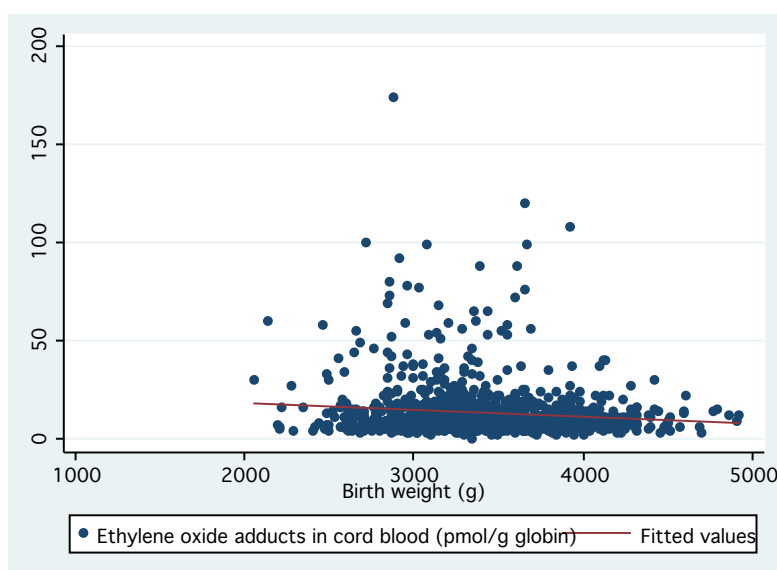


Figura 8 - Diagrama de puntos entre peso al nacer (g) y aductos de hemoglobina de óxido de etileno (pmol/g Hb)

Aductos de Hb de óxido de etileno y PEG

La proporción de PEG (Pequeño para Edad Gestacional, es decir, niños/as por debajo del percentil 10 acorde a la semana de embarazo y sexo fetal) aumentó por cada aumento de 10pmol/g Hb de aducto de Hb de óxido de etileno (coeficiente 0.001; IC 95% -0,01; 0,01; basado en 886 observaciones y 71 PEGs) e hijos de no fumadoras (coeficiente -0,02; IC 95% -0,04; 0.01; basado en 774 observaciones y 58 PEGs).

Aductos de Hb de óxido de etileno y perímetro cefálico al nacer

El perímetro cefálico medio al nacer fue de 34,78 (\pm 1,68) cm. Se objetivó una asociación negativa estadísticamente significativa entre perímetro cefálico al nacer y aductos de óxido de etileno con un descenso de -0.1cm (IC 95% -0.2; -0.02; por cada aumento de 10pmol/g de aducto de óxido de etileno ajustando por edad gestacional) para la población general; y de -0.20cm (IC 95% -0,36; -0,04; por cada aumento de 10pmol/g de aducto de óxido de etileno ajustando por edad gestacional)(Tabla 11). De forma similar a las asociaciones con peso al nacer, se observó una asociación en U invertida entre perímetro cefálico y cuartiles progresivos de exposición. Los niños en el mayor versus menor cuartil de nivel de aductos de Hb de óxido de etileno tuvieron un descenso de 0,11cm (IC 95% -0,18; -0,04) en la población general y un descenso de 0,20cm (IC 95% -0,48; 0,12) para no fumadoras con un patrón consistente tal y como se muestra en la Tabla 12.

El meta-análisis de regresión logística por países (Figura 9) muestra heterogeneidad aunque los países con más número de participantes y unos porcentajes altos de fumadoras (21.62% en Grecia, 15.54% en el caso de Gran Bretaña) presentan una clara asociación negativa. En el meta-análisis con la subcohorte de no fumadoras (Figura 10), el efecto del óxido de etileno en el perímetro cefálico es más homogéneo entre países, sugiriendo un efecto similar del óxido de etileno procedente de la vía endógena independiente del país de origen. Así, podemos sugerir que la exposición difiere entre individuos según la exposición procedente de forma principal de la vía exógena.

PERÍMETRO CEFÁLICO AL NACER	Asociación con aductos de Hb de óxido de etileno
------------------------------------	---

	Número de sujetos	Coefficiente β	DE	valor p
Todos los sujetos				
- ajuste básico (edad gestacional + país)	963	-0.01	0.004	0.064
- ajuste completo (edad gestacional + país+ sexo + edad materna + paridad + tabaquismo)	963	-0.007	0.005	0.138
No fumadoras				
- ajuste básico (edad gestacional + país)	850	-0.010	0.008	0.254
- ajuste completo (edad gestacional + país+ sexo + edad materna + paridad)	850	-0.010	0.008	0.165
- ajuste completo para expuestas a tabaquismo pasivo*	239	-0.01	0.01	0.367
- ajuste completo para no expuestas a tabaquismo pasivo*	545	-0.01	0.01	0.375

Tabla 11 – Modelo de regresión lineal para perímetro cefálico al nacer en relación a niveles de aducto de Hb de óxido de etileno (por incremento en 1pmol/g de aducto de Hb) según diferentes niveles de ajuste en toda la población y en no fumadoras (*66 pérdidas para la variable tabaquismo pasivo).

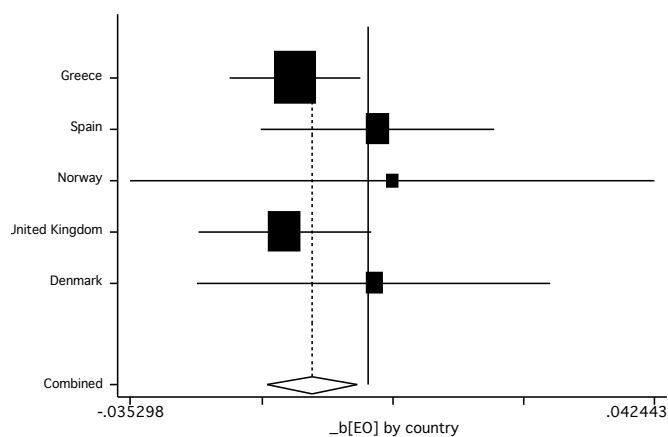


Figura 9 - Meta-análisis por país de regresión lineal para perímetro cefálico en relación a nivel de aductos de Hb de óxido de etileno – toda la población

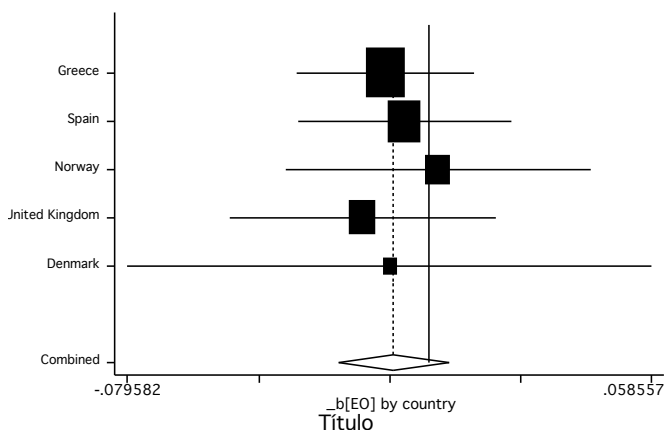


Figura 10 - Meta-análisis por país de regresión lineal para perímetro cefálico en relación a nivel de aductos de Hb de óxido de etileno – no fumadoras

Variable	n	Adductos Hb EtOH	
		β (IC 95%)	p
Ajuste básico*			
<i>Todas</i>			
Cambio por 10pmol/g Hb	999	-0.11 (-0.18, -0.04)	0.003
Cuartil 1 (menor)	236	Ref: 34.79cm	
Cuartil 2	265	0.19 (-0.09, 0.47)	0.188
Cuartil 3	251	-0.12 (-0.41, 0.16)	0.406
Cuartil 4 (mayor)	247	-0.28 (-0.56, 0.01)	0.057
<i>No fumadoras</i>			
Cambio por 10pmol/g Hb	869	-0.20 (-0.36, -0.04)	0.013
Cuartil 1 (menor)	228	Ref: 34.80cm	
Cuartil 2	251	0.21 (-0.08, 0.50)	0.157
Cuartil 3	235	-0.10 (-0.39, 0.20)	0.514
Cuartil 4 (mayor)	155	-0.18 (-0.51, 0.15)	0.287
Ajuste completo**			
<i>Todas</i>			
Cambio por 10pmol/g Hb	999	0.00 (-0.07, 0.08)	0.922
Cuartil 1	236	Ref 34.79cm	
Cuartil 2	265	0.16 (-0.08, 0.40)	0.202
Cuartil 3	251	0.00 (-0.25, 0.25)	0.990
Cuartil 4	247	0.10 (-0.17, 0.37)	0.463
<i>No fumadoras</i>			
Cambio por 10pmol/g Hb	869	-0.01 (-0.16, 0.12)	0.765
Cuartil 1	228	Ref: 34.80cm	
Cuartil 2	251	0.18 (-0.07, 0.43)	0.157
Cuartil 3	235	0.00 (-0.26, 0.26)	0.985
Cuartil 4	155	0.07 (-0.22, 0.36)	0.629

*Ajuste básico hace referencia a: edad gestacional y sexo del niño.
 **Ajuste completo hace referencia a: país, tabaco, edad materna, edad gestacional, paridad, peso y sexo del niño.

Tabla 12 - Asociación entre perímetro craneal y aductos de hemoglobina de óxido de etileno

Aductos de óxido de etileno y edad gestacional

La edad gestacional media fue de 39 (± 1) semanas completas para ambas la población general y las no fumadoras. No se objetivaron asociaciones clínica ni estadísticamente significativas entre el nivel de aductos de óxido de etileno y edad gestacional, con una disminución de 0,001 semanas (IC 95% -0,06; 0,06) por cada aumento de 10pmol/g Hb en aducto de Hb de óxido de etileno ajustando por peso al nacer en la población general, y un aumento de 0,09 semanas (IC 95% -0,03; 0,21) en las no fumadoras (Tabla 13, Tabla 14). Estos resultados fueron homogéneos en los países de toda la cohorte (Figura 11, Figura 12).

EDAD GESTACIONAL	Asociación con aductos de Hb de óxido de etileno			
	Número de sujetos	Coefficiente β	DE	valor p
Todos los sujetos				
- ajuste básico (edad gestacional + país)	1095	0.003 (-0.002, 0.009)	0.003	0.237
- ajuste completo (edad gestacional + país+ sex + edad materna + paridad + tabaquismo)	1048	0.005 (-0.001, 0.012)	0.003	0.113
No fumadoras				
- ajuste básico (edad gestacional + país)	949	0.013 (0.001, 0.025)	0.006	0.029
- ajuste completo (edad gestacional + país+ sex + edad materna + paridad)	925	0.013 (0.002, 0.257)	0.006	0.023
- ajuste completo para expuestas a tabaquismo pasivo*	262	0.011 (-0.010, 0.033)	0.011	0.303
- ajuste completo para no expuestas a tabaquismo pasivo*	588	0.019 (0.001, 0.036)	0.009	0.037

*Tabla 13 - Modelo de regresión logística lineal para edad gestacional en relación a aductos de Hb de óxido de etileno (por cada incremento de 1pmol/g Hb de aducto) según diferentes niveles de ajuste en la población general y en las no fumadoras (*75 pérdidas para la variable tabaquismo pasivo).*

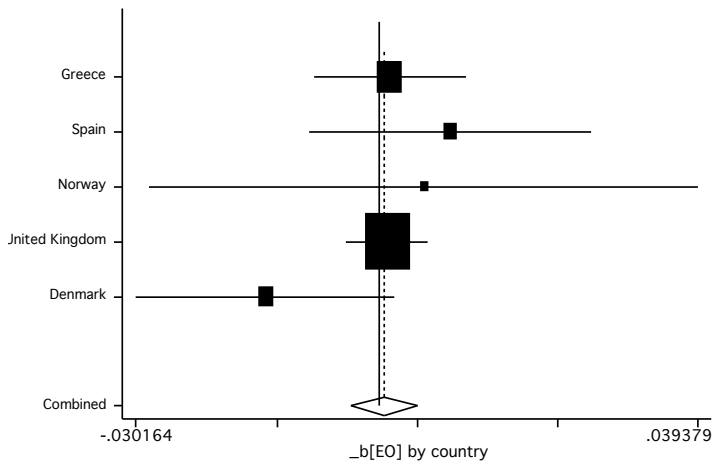


Figura 11 - Meta-análisis por país de regresión lineal para edad gestacional en relación a nivel de aductos de Hb de óxido de etileno – toda la población

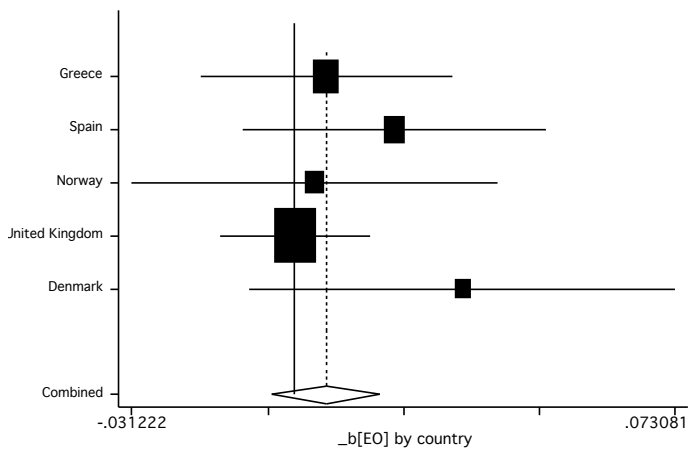


Figura 12 - Meta-análisis por país de regresión lineal para edad gestacional en relación a nivel de aductos de Hb de óxido de etileno – no fumadoras

Variable	n	Aductos Hb EtOH	
		β (IC 95%)	p
Ajuste básico*			
Todas			
Cambio por 10pmol/g Hb	1096	-0.001 (-0.06, 0.06)	0.985
Cuartil 1 (menor)	275	Ref 38.96 semanas	
Cuartil 2	277	0.03 (-0.18, 0.24)	0.772
Cuartil 3	271	0.06 (-0.16, 0.27)	0.591
Cuartil 4 (mayor)	273	0.10 (-0.11, 0.32)	0.343
No fumadoras			

Cambio por 10pmol/g Hb	950	0.09 (-0.03, 0.21)	0.140
Cuartil 1 (menor)	264	Ref 38.95 semanas	
Cuartil 2	262	0.08 (-0.14, 0.30)	0.483
Cuartil 3	251	0.07 (-0.15, 0.30)	0.509
Cuartil 4 (mayor)	173	0.23 (-0.02, 0.48)	0.066
Ajuste completo**			
Todas			
Cambio por 10pmol/g Hb	1096	0.05 (-0.01, 0.12)	0.113
Cuartil 1	275	Ref 38.97 semanas	
Cuartil 2	277	0.00 (-0.20, 0.21)	0.961
Cuartil 3	271	0.15 (-0.06, 0.36)	0.153
Cuartil 4	273	0.23 (0.01, 0.46)	0.041
No fumadoras			
Cambio por 10pmol/g Hb	950	0.14 (0.02, 0.26)	0.023
Cuartil 1	264	Ref 38.95 semanas	
Cuartil 2	262	0.01 (-0.20, 0.23)	0.904
Cuartil 3	251	0.13 (-0.09, 0.35)	0.250
Cuartil 4	173	0.28 (0.04, 0.00)	0.024
*Ajuste básico hace referencia a: peso al nacer.			
**Ajuste completo hace referencia a: país, tabaco, edad materna, paridad, peso y sexo del niño.			

Tabla 14 - Asociación entre edad gestacional y aductos de hemoglobina de óxido de etileno

4.4. Acrilamida y eventos reproductivos

Niveles de aductos de hemoglobina de acrilamida

Los niveles de aductos de hemoglobina de acrilamida y glicidamida en sangre de cordón fueron detectables para todos los niños (n=1101). La mediana de aducto de hemoglobina de acrilamida fue de 14,4 pmol/g de hemoglobina (rango entre 4,4 y 147,6) y para glicidamida de 10,8 pmol/g de hemoglobina (rango entre 2,0 y 117,6). Se observó una correlación estadísticamente significativa entre niveles de aductos de glicidamida y acrilamida en sangre de cordón (correlación de Pearson de $r=0.85$, $p<0.001$). La mediana de niveles de aducto de acrilamida fue mayor en sangre de cordón de madres fumadoras (n=129) que en los hijos de no fumadoras (n=972; 30.5 vs 13.8 pmol/g Hb, $p<0.001$). Los niveles correspondientes de aductos de glicidamida fueron de 20.7 versus 10.1 pmol/g Hb ($p<0.001$), y para aductos de óxido de etileno (como marcador de exposición de exposición a tabaco) fue de 24.5 versus 8.9 pmol/g Hb ($p<0.001$).

Los niveles medianos de aductos de hemoglobina fueron aproximadamente de la mitad en los correspondientes análisis en sangre materna (Figura 13). Los niveles de aducto de acrilamida en sangre de cordón se correlacionaron positivamente con los niveles en sangre materna ($r=0,95$, $p<0,001$, $n=171$) y con los niveles de glicidamida ($r=0,94$, $p<0,001$, $n=171$). De entre las no fumadoras, el nivel mediano de aductos de glicidamida fue detectado en bebés de la cohorte inglesa (23,6 pmol/g Hb) y los menores niveles de la cohorte danesa (12,0 pmol/g Hb).

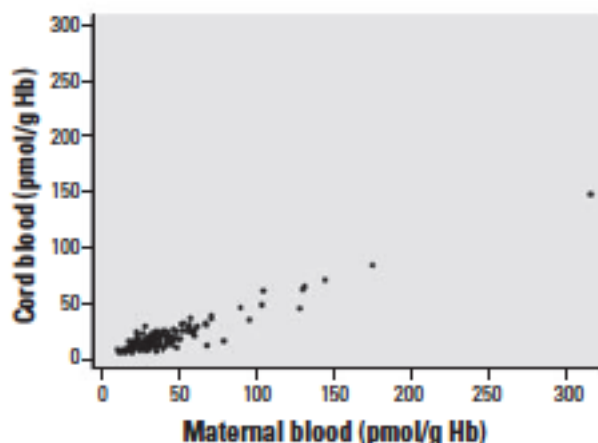


Figura 13 – Niveles de aducto de Hb de acrilamida en pmol/g Hb en pares madre-hijo ($n = 172$)

Factores asociados al peso al nacer

Las madres incluidas en el estudio fueron principalmente blancas, no fumadoras, de entre 20 y 30 años con IMC pre-gestacional entre 18.5 y 24.9kg/m² y no primíparas (Tabla 15). La prevalencia de fumadoras era menor en Noruega y Dinamarca (2.4% y 3.8%, respectivamente) y los mayores en Grecia (21%). El peso al nacer se asoció positivamente a edad materna, paridad (primípara vs nulípara), IMC pregestacional, hábito tabáquico, sexo masculino y edad gestacional. De media, los niños de países del norte de Europa tuvieron pesos superiores a los niños de Grecia y España ($p<0.001$).

Características	Todas (n=1101)	No fumadoras ^a (n =972)
País		
Grecia	236 (21)	186 (19)
España	220 (20)	185 (19)
Noruega	247 (22)	241 (25)
Inglaterra	186 (17)	156 (16)
Dinamarca	212 (19)	204 (21)
Etnia materna		

Blanca	912 (83)	792 (82)
No blanca	187 (17)	179 (18)
Pérdidas (n)	2	1
Edad materna	30.9 ± 5.2	31.1 ± 5.1
Educación materna		
Alta	357 (36)	342 (39)
Medio	371 (38)	329 (38)
Baja	251 (26)	207 (24)
Pérdidas (n)	122	94
Paridad		
Nulíparas	388 (36)	356 (37)
Múltiparas	688 (64)	594 (63)
Pérdidas (n)	25	22
IMC pre-gestacional (kg/m²)	24,1 ± 4.9	24,0 ± 4,8
Pérdidas (n)	110	89
Tabaquismo secundario		
No	652 (65)	622 (70)
Sí	354 (35)	272 (30)
Pérdidas (n)	95	78
Sexo		
Niños	550 (50)	489 (50)
Niñas	551 (50)	483 (50)
Edad gestacional (semanas completas)		
< 37	38 (3)	33 (3)
≥ 37	1.063 (97)	939 (97)
Peso al nacer (g)		
<2,500	18 (2)	11 (1)
≥ 2.500	1.083 (98)	961 (99)
PEG		
No	819 (92)	734 (92)
Sí	72 (8)	60 (8)
Pérdidas (n)	210	178
Perímetro cefálico (cm)	34,8 ± 1,5	34,8 ± 1,5
Pérdidas (n)	96	82
Acudtos de Hb de sangre de cordón (pmol/g Hb)		
Acrilamida	19,7 ± 16,5	16,8 ± 11,1
Glicidamida	13,6 ± 10,1	11,8 ± 6,6
Óxido de etileno	13,2 ± 13,6	10,5 ± 6,7
Pérdidas (n)	27	24
^a Mujeres que nunca fumaron o que dejaron de fumar 4 meses antes del embarazo		

Tabla 15 – Características de la población de estudio de aductos de Hb de acrilamida y eventos reproductivos (n=1.101) [n (%) or media ± DE]

Niveles de aducto de hemoglobina de acrilamida y peso al nacer

Los niveles de aductos de acrilamida y glicidamida en sangre de cordón se asociaron a un descenso significativo en el peso al nacer (tabla 3). La media de peso al nacer se reducía 35 gramos (IC del 95% entre -51 y -19g) para cada incremento de 10 pmol/g Hb en aducto de acrilamida tras ajustar por país de nacimiento y edad gestacional en la población general, y 20g (IC 95% entre -46 y 6g) en el grupo de 972 no fumadoras. Cada incremento de 10pmol/g de Hb se asoció a 60g de reducción en peso al nacer (IC 95% entre -87 y -34g) en la población general, y una reducción de 53g (IC 95% -95 a -10g) en mujeres no fumadoras. Los resultados fueron similares en el subgrupo de 889 mujeres nunca fumadoras, con una reducción media de peso al nacer de 26g (IC 95% entre -53 y 3g, $p=0.074$) por cada incremento de 10pmol/g de Hb en los aductos de acrilamida, ajustado por edad gestacional y país de nacimiento; con una reducción correspondiente a aductos de glicidamida de 65g (IC 95% entre -111 y -19g). El peso al nacer disminuyó de forma monótona con incrementos de cuartiles de exposición (tabla 3). La diferencia estimada en peso al nacer para niños en el mayor versus menor cuartil nivel de aducto de hemoglobina de acrilamida después de ajustar para edad gestacional y país fue de -132g (IC 95% entre -207 y -56g) en la población general y -107g (IC 95% entre -188 y -27g) en el estudio restringido para no fumadoras. La diferencia estimada en peso al nacer para niños en el mayor versus menor cuartil nivel de aducto de hemoglobina de glicidamida fue de -136g (IC 95% entre -212 y -60g) en la población general y de -103g (IC 95% entre -182 y -23g) en las no fumadoras (tabla 16). Entre los partos a término ($n=1063$), la diferencia en peso al nacer para niños en el mayor versus menor cuartil de niveles de aductos de hemoglobina de acrilamida fue de -137g (IC 95% entre -214 y -60g); una diferencia similar fue observada en 939 bebés de no fumadoras (-120g, IC 95% entre -201 y -38g).

Variable	Aductos de Hb de acrilamida			Aductos de Hb de glicidamida		
	n	β (IC 95%)	p	n	β (IC 95%)	p
Ajuste básico^a						
<u>Todas</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	1.101	-35 (-51, -19)	<0.001	1.100	-60 (-87, -34)	< 0.001
Cuartil 1 (menor)	288	Ref: 3.460 g		283	Ref: 3.492 g	
Cuartil 2	263	-65 (-136, 5)	0,066	269	-53 (-124, 18)	0,145

Cuartil 3	275	-110 (-180, -39)	0,002	276	-61 (-131, 11)	0,094
Cuartil 4 (mayor)	275	-132 (-207, -56)	0,001	272	-136 (-212, -60)	0,001
<u>No fumadoras</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	972	-20 (-46, 6)	0,187	972	-53 (-95, -10)	0,016
Cuartil 1 (menor)	247	Ref: 3.445 g		249	Ref: 3.503 g	
Cuartil 2	242	-26 (-99, 48)	0,50	239	-73 (-147,1)	0,053
Cuartil 3	241	-105 (-181, -31)	0,006	244	-76 (-150, -1)	0,046
Cuartil 4 (mayor)	242	-107 (-188, -27)	0,009	239	-103 (-182, -23)	0,012
Ajuste completo^b						
<u>Todas</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	747	-23 (-51, 5)	0,10	746	-22 (-67, 23)	0,33
Cuartil 1 (menor)	208	Ref: 3.509 g		214	Ref: 3.527 g	
Cuartil 2	194	-65 (-139, 19)	0,14	199	-80 (-159, -1)	0,046
Cuartil 3	205	-110 (-207, -48)	0,002	189	-50 (-131, -31)	0,022
Cuartil 4 (mayor)	140	-157 (-256, -58)	0,002	144	-110 (-207, -12)	0,028
<u>No fumadoras</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	675	-34 (-72, 4)	0,078	674	-52 (-112, 8)	0,088
Cuartil 1 (menor)	174	Ref: 3.445 g		186	Ref: 3.542 g	
Cuartil 2	183	-19 (-102, 64)	0,65	180	-67 (-150, 16)	0,12
Cuartil 3	190	-132 (-216, -49)	0,002	171	-89 (-173, -4)	0,035
Cuartil 4 (mayor)	128	-149 (-248, -50)	0,003	137	-97 (-193, -1)	0,05

^aAjustado para edad gestacional (semanas completas) y país. ^bAjustados adicionalmente por tabaquismo al final del embarazo (no, sí), tabaquismo pasivo (no, sí), sexo (niño, niña), IMC pre-gestacional (kg/m²), paridad (0, \geq 1), edad materna (años), etnia materna (blanca, no blanca), educación materna (bajo, medio, alto), consumo materno de vegetales y frutas, pescado y refrescos (bajo, alto).

Tabla 16 – Exposición prenatal a acrilamida y glicidamida medidas como aductos de Hb en sangre de cordón, y asociaciones con peso al nacer

Las asociaciones entre aductos de hemoglobina y peso al nacer ajustadas por país y edad gestacional no se modificaron substancialmente cuando se aplicaron más ajustes por otros factores de riesgo potenciales para peso al nacer reducido incluyendo sexo, IMC pregestacional, paridad, edad materna, etnia, educación, tabaquismo activo, tabaquismo pasivo, y variables dietéticas que se podrían relacionar con una dieta saludable (o no saludable) como ingesta de vegetales y frutas, pescado o refrescos (Tabla 17). La población en los modelos ajustados (n=747) es menor que en la población sólo ajustada por país y edad gestacional (n=1101). También estimamos asociaciones ajustadas por niveles de aductos de hemoglobina de óxido de etileno como biomarcador de tabaquismo activo/pasivo, además de otras covariables. La diferencia en peso al nacer de no fumadoras (n=656) es el mayor versus menor cuartil de nivel de

aducto de hemoglobina de acrilamida permaneció estadísticamente significativo tras ajustar por aductos de óxido de etileno (-142g, IC 95% entre -246 y -38g), mientras la correspondiente diferencia fue con tendencia a la significancia estadística para aductos de glicidamida (-82g, IC 95% entre -183 y 17g, p=0.11).

Características	Toda la población (n= 1101)			No fumadoras ^a (n = 972)		
	n	β (IC 95%)	valor p	n	β (IC 95%)	valor p
País						
Grecia	236	Ref: 3.205 g		186	Ref: 3.219 g	
España	220	78 (-1.157)	0,050	185	81 (-4, 185)	0,063
Noruega	247	197 (117, 277)	< 0,001	241	203 (119, 286)	< 0,001
Inglaterra	186	258 (178, 337)	< 0,001	156	228 (140, 316)	< 0,001
Dinamarca	212	256 (178, 337)	< 0,001	204	258 (175, 341)	< 0,001
Etnia (blanca vs no blanca)	1.099	11 (-69, 91)	0,79	972	-39 (-123, 46)	0,37
Edad materna (años)	1.101	6 (1, 11)	0,015	972	5 (0,10)	0,086
Educación materna						
Alta	357	Ref: 3.512 g		342	Ref: 3.523 g	
Media	371	-54 (-114, 7)	0,082	329	-58 (-122, 6)	0,074
Baja	251	-51 (-120, 17)	0,143	207	-39 (-111, 34)	0,30
Paridad (nulípara vs múltipara)	1.076	115 (61, 170)	< 0,001	950	110 (54, 166)	< 0,001
PreprIMC pre-gestacional (kg/m²)	991	12 (7, 18)	< 0,001	883	12 (6,18)	< 0,001
Tabaquismo (no vs sí)	1.101	-142 (-221, -63)	< 0,001			
Tabaquismo pasivo (no vs sí)	1.006	-39 (-101, 23)	0,22	894	7 (-60, 73)	0,85
Óxido de etileno (10 pmol/g Hb)	1.074	-31 (-50, -12)	0,001	948	-27 (-67, 13)	0,185
Sexo (niño vs niña)	1.101	-140 (-189, -91)	< 0,001	972	-141 (-193, -90)	< 0,001
Edad gestacional (semanas)	1.101	113 (93, 192)	< 0,001	972	110 (91, 130)	< 0,001
Ref, referencia. Coeficiente beta (β) corresponde a la diferencia en peso al nacer en gramos y se estima mediante modelos de regresión lineal ajustados por país y edad gestacional (semanas completas)						
^a Mujeres que nunca fumaron o que dejaron de fumar 4 meses antes del embarazo						

Tabla 17 – Diferencias en peso al nacer acorde a factores sociodemográficos, reproductivos y de estilo de vida

Se objetivaron asociaciones negativas entre los niveles de aducto de Hb entre acrilamida y glicidamida en sangre de cordón y el peso al nacer en todos los países (Figura 14). Un meta-análisis específico para país dio resultados similares a la información obtenida mediante la estimación ajustada por país, con un incremento en 10pmol/g Hb de aducto

de acrilamida asociado a un descenso de 36g (IC 95% entre -53 y -19g) en peso al nacer; y un incremento en 10pmol/g Hb de aducto de glicidamida asociada a un descenso de 63g (IC 95% entre -36 y -90g) en peso al nacer.

El patrón fue consistente en las madres no fumadoras (-26g, IC 95% entre -52 y 1g; y -63g, IC 95% entre -106 y -20g por cada 10pmol/g Hb de incremento en aductos de acrilamida y glicidamida respectivamente), con una heterogeneidad entre países no significativa ($p=0.51$ y $p=0.46$), aunque en Inglaterra la asociación con peso al nacer fue mínima (-2g, IC 95% entre -44 y 41g; y -18g, IC 95% entre -95 y 59g).

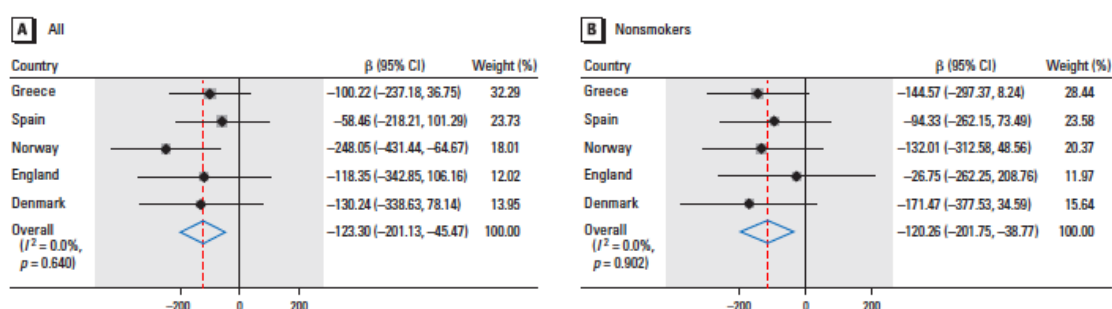


Figura 14 – Meta-análisis de la asociación entre aductos de Hb de acrilamida (cuartil mayor versus menor) y peso al nacer según país ajustado por edad gestacional (semanas completas) en la población total (A) y no fumadoras (B).

Niveles de aducto de Hb de acrilamida y PEG

La variable PEG (Pequeño para Edad Gestacional; con peso al nacer por debajo del percentil 10 de la cohorte correspondiente acorde a edad gestacional y sexo) incrementó en asociación a cada incremento de 10pmol/g Hb en aductos de acrilamida para la población general (RR=1.20; IC 95% entre 1.08 y 1.33; basado en 891 observaciones y 72 PEG) y para bebés de madres no fumadoras (RR=1.35; IC 95% entre 1.10 y 1.65, basado en 794 observaciones y 60 PEG). Las estimaciones correspondientes para glicidamida fueron RR=1.36 (IC 95% entre 1.13 y 1.64) para toda la población y RR=1.42 (IC 95% entre 1.00 y 2.02) para no fumadoras.

Niveles de aducto de Hb de acrilamida y perímetro cefálico

La comparación del nivel de aducto de Hb de acrilamida entre el cuartil mayor versus menor se asoció a una reducción estadísticamente significativa en perímetro cefálico de 0.33cm (IC 95% entre -0.61 y -0.06cm) en la población general y en las no fumadoras, con resultados similiares para glicidamida (tabla 18). De forma similar a las asociaciones con peso al nacer, se observó una reducción monótona en el perímetro cefálico con

incremento acorde a los cuartiles de exposición. El patrón también se observó tras ajustes en la población de estudio restringida a aquellos sujetos con información sobre los factores de riesgo potenciales. Aun así, las asociaciones no fueron estadísticamente significativas cuando se ajustó por los otros factores.

Variable	Aductos de Hb de acrilamida			Aductos de Hb de glicidamida		
	n	β (IC 95%)	p	n	β (IC 95%)	p
Ajuste básico^a						
<u>Todas</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	1.005	-0,06 (-0,12, 0,00)	0,034	1.004	-0,10 (-0,20, 0,00)	0,040
Cuartil 1 (menor)	272	Ref: 34,89 cm		268	Ref: 34,99 cm	
Cuartil 2	237	-0,10 (-0,35, 0,15)	0,44	251	-0,03(-0,29, 0,22)	0,79
Cuartil 3	251	-0,18 (-0,43, 0,08)	0,17	251	-0,14 (-0,40, 0,11)	0,27
Cuartil 4 (mayor)	245	-0,33 (-0,61, -0,06)	0,018	234	-0,38 (-0,65,-0,10)	0,007
<u>No fumadoras</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	890	-0,07 (-0,16, 0,03)	0,184	889	-0,16 (-0,33, 0,00)	0,049
Cuartil 1 (menor)	232	Ref: 34,86 cm		235	Ref: 35,05 cm	
Cuartil 2	220	-0,02 (-0,29, 0,25)	0,88	222	-0,15 (-0,42, 0,12)	0,27
Cuartil 3	222	-0,13 (-0,40, 0,14)	0,36	224	-0,20 (-0,47, 0,07)	0,14
Cuartil 4 (mayor)	216	-0,35 (-0,65, -0,05)	0,021	208	-0,34 (-0,63, -0,05)	0,023
Ajuste completo^b						
<u>Todas</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	713	0,02 (-0,08, 0,12)	0,71	712	-0,01 (-0,17, 0,16)	0,93
Cuartil 1 (menor)	201	Ref: 34,98 cm		208	Ref: 35,08 cm	
Cuartil 2	182	-0,08 (-0,37, 0,21)	0,57	192	-0,08 (-0,36, 0,21)	0,60
Cuartil 3	198	-0,08 (-0,37, 0,21)	0,60	177	-0,07 (-0,36, 0,23)	0,66
Cuartil 4 (mayor)	132	-0,22 (-0,59, 0,14)	0,23	135	-0,26 (-0,62, 0,09)	0,15
<u>No fumadoras</u>						
Cambio por 10 pmol/g Hb	645	-0,05 (-0,09, 0,19)	0,51	644	-0,05 (-0,27, 0,17)	0,64
Cuartil 1 (menor)	168	Ref: 34,95 cm		181	Ref: 35,14 cm	
Cuartil 2	173	0,01 (-0,30, 0,32)	0,96	173	-0,08 (-0,38, 0,22)	0,61
Cuartil 3	180	-0,10 (-0,41, 0,21)	0,52	160	-0,21 (-0,52, 0,10)	0,19
Cuartil 4 (mayor)	124	-0,21 (-0,57, 0,16)	0,27	130	-0,23 (-0,58, 0,12)	0,20
^a Ajustado para edad gestacional (semanas completas) y país. ^b Ajustados adicionalmente por tabaquismo al final del embarazo (no, sí), tabaquismo pasivo (no, sí), sexo (niño, niña), IMC pre-gestacional (kg/m ²), paridad (0, \geq 1), edad materna (años), etnia materna (blanca, no blanca), educación materna (bajo, medio, alto), consumo materno de vegetales y frutas, pescado y refrescos (bajo, alto).						

Tabla 18 - Exposición prenatal a acrilamida y glicidamida medidas como aductos de Hb en sangre de cordón, y asociaciones con perímetro cefálico al nacer

Dieta materna, niveles de aducto de Hb de acrilamida en sangre de cordón y peso al nacer

Un incremento en 1 unidad en la puntuación del índice de dieta rica en acrilamida se asoció a mayores niveles de aducto de Hb de acrilamida en sangre de cordón (figura 3) para acrilamida (0.68 pmol/g Hb; IC 95% entre 0.30 y 1.06) y glicidamida (0.39pmol/g Hb, IC 95% entre 0.15 y 0.63), basado en un índice de dieta diseñado como variable continua simple.

De forma similar a las asociaciones observadas entre aductos de Hb de acrilamida y peso al nacer, un aumento en 1 unidad en el índice de dieta rica en acrilamida se asoció a una disminución de 16g en peso al nacer (IC 95% entre -33 y 1, $p=0.066$) tras ajuste por país y edad gestacional. Los ajustes adicionales no cambiaron esta asociación (Tabla 16). Niveles mayores de índice de dieta se asociaron a una reducción estadísticamente no significativa de perímetro cefálico de -0.01cm (IC 95% entre -0.07 y 0.05cm; $p=0.72$) entre hijos de mujeres no fumadoras con información sobre el índice de dieta rica en acrilamida ($n=726$).

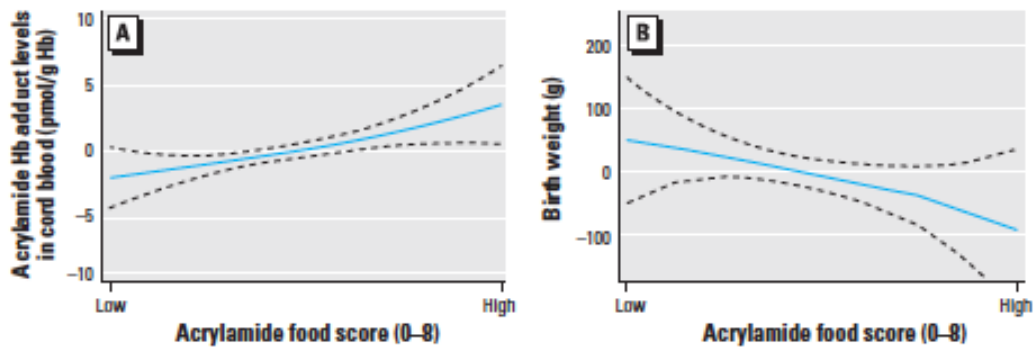


Figura 15 – Asociación entre exposición a acrilamida materna a través de la dieta en no fumadoras ($n=801$) estimada según score de dieta rica en acrilamida versus aductos de Hb de acrilamida en sangre de cordón (A) y versus peso al nacer(B)

5. Discusión

5.1. Dioxinas y distancia ano-genital

En el presente estudio, la exposición prenatal a compuestos con actividad *dioxin-like* fue asociada negativamente con AGD en recién nacidos varones en el contexto de niveles de exposición globalmente bajos en la población general. No obtuvimos evidencia de la relación de la exposición a dioxinas con AGD en niñas. Nuestros resultados son consistentes con los estudios experimentales realizados en animales por parte de la OMS, donde el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios objetivó que los efectos adversos más sensibles ocurren en los ratones de sexo masculino tras la exposición a TCDD⁹⁶.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que ha estimado el efecto del grupo de dioxinas en el desarrollo del aparato genital humano. Nuestros hallazgos son concordantes con varios estudios publicados previamente en los que se asocia exposición prenatal y lactacional a TCDD con reducción en AGD^{97,98,99,100,101}. En 2011, el grupo de Mocarelli¹⁰² observó que una menor cantidad de espermatozoides en hombres jóvenes expuestos prenatal o lactacionalmente a dioxinas en el accidente de Seveso (con sobreexposición aguda de las madres a TCDD). Aunque el efecto de las dioxinas en el desarrollo genital humano es mayoritariamente desconocido, se ha explorado el efecto de otros disruptores endocrinológicos. La exposición intra-útero a ftalatos se ha relacionado con una disminución en la AGD en dos estudios^{103,104}, aunque en un tercer estudio no se observaron diferencias significativas con el índice AGD/peso al nacer¹⁰⁵.

En dos estudios realizados en México estudiando el efecto de DDE^{106,107}, no se objetivaron disminuciones significativas en AGD, aunque se observó una disminución significativa del índice de posición anal, un parámetro no dependiente de edad relacionado con distancia ano-genital. Por último, un estudio ha relacionado exposición prenatal a bisfenol A con AGD disminuida.

Se ha sugerido que el hipospadias y la criptorquidia podrían estar asociados a una AGD disminuida como resultado de un mecanismo de disrupción hormonal¹⁰⁸. Apoyando esta teoría, se han publicado estudios en los que se ha asociado una menor AGD con peor

calidad seminal¹⁰⁹, así como una mayor AGD en hombres con hijos en comparación a hombres sin hijos previos en una clínica de esterilidad¹¹⁰.

Se ha observado que los hombres con niveles de testosterona hipogonádicos (<300ng/dL) tienen una AGD menor comparada con hombres con niveles de testosterona mayor¹¹¹.

En la cohorte griega Rhea la AGD neonatal predecía la medida correspondiente objetivada en la infancia temprana¹¹², por lo que AGD sería un marcador estable en el tiempo, aunque las diferentes medidas genitales (AGD, ASD) podrían corresponderse con exposiciones androgénicas en diferentes etapas de la vida. De este modo, en nuestro estudio se asoció significativamente una menor AGD con una mayor exposición a actividad de dioxinas en el mismo sentido que observó el grupo de Swan¹⁰⁴ en relación a la exposición ftalatos. Paralelamente, en el estudio publicado por Mendiola en 2011¹⁰⁹ se observaron asociaciones significativas entre parámetros del seminograma y ASD, pero no AGD.

En nuestro estudio no encontramos evidencia de la asociación entre exposición intra-uterina a dioxinas y AGD en niñas. En estudios publicados previamente, o bien no se observó asociación entre exposición prenatal a DDE y AGD en niñas¹¹³, o bien se observó sólo una asociación entre exposición a ftalatos y un menor AGI¹⁰⁵. Algunos estudios experimentales realizados en animales^{114,97,115,116} sugieren que el efecto de algunos tóxicos ambientales -incluyendo TCDD- podrían no ser detectados hasta la pubertad o incluso de forma más tardía. En humanos hay evidencia de que una alta exposición a dioxinas y químicos con efecto *dioxin-like* se asocian a un retraso en el desarrollo mamario^{117,118}. En este sentido, probablemente un seguimiento a largo plazo en las niñas de nuestro estudio podría evaluar de mejor manera los efectos de los tóxicos en su salud reproductiva.

Nuestros resultados aportan cierta evidencia del efecto adverso de las dioxinas en la AGD en niños pequeños, aunque los efectos fueron sutiles y no estadísticamente significativos. Los estudios epidemiológicos publicados previamente han relacionado la exposición prenatal a tóxicos con AGD medida en el periodo post-natal, excepto el de Swan¹⁰⁴, que exploró la exposición de ftalatos en relación a AGD de niños de entre 2 y 36 meses de edad. El tamaño del niño se asocia directamente a la AGD^{119,80,81,120,121}, por lo que una posible reducción debida a exposición prenatal podría estar enmascarada por otras exposiciones de la infancia temprana. La lactancia materna es la principal fuente de exposición a dioxinas en las primeras etapas de la vida, aunque en nuestro estudio la

duración de la lactancia fue relativamente corta (mediana de 2 meses) i no asociada a AGD. Aunque hubiera sido ideal realizar el seguimiento de todos los niños hasta la infancia, no fue posible debido a los diferentes diseños de las cohortes.

En este estudio, la exposición a dioxinas fue estimada mediante el ensayo DR CALUX®. Los métodos de cuantificación de exposición a dioxinas incluyen técnicas muy sensibles y específicas como espectrometría de masas y cromatografía gaseosa de alta resolución. Aun así, esos métodos son dificultosos, muy caros y requieren grandes volúmenes de muestra¹²². Aunque el ensayo DR CALUX® no cuantifica los diferentes compuestos, proporciona una medida de la potencia de la mezcla biológica que incluye los efectos de posibles interacciones y sinergias entre las diferentes sustancias¹²³.

Los niveles medios de actividad *dioxin-like* en nuestro estudio fueron similares a otros estudios publicados previamente en Europa^{124,125,126,127,128} (52.3 ± 20.7 y 49.7 ± 26.7 pg CALUX®-TEQ/g lípido en recién nacidos y niños pequeños, respectivamente), excepto por un estudio holandés¹²⁹ publicado en los años 90 (103.7 pg CALUX®-TEQ/g lípido).

5.2. Dioxinas y eventos reproductivos

Los hallazgos de este estudio muestran una asociación entre niveles bajos de actividad *dioxin-like* y edad gestacional. Los recién nacidos en el tercil máximo de exposición tenían una reducción de aproximadamente media semana en edad gestacional comparados con los del tercil mínimo de exposición. Esta asociación inversa entre actividad *dioxin-like* en sangre de cordón y edad gestacional fue observada en niños varones y fue el único efecto relacionado con el sexo fetal. Se observaron asociaciones más débiles para peso al nacer, y no se observó relación con perímetro cefálico ni entre la actividad *dioxin-like* en sangre materna y los eventos reproductivos.

Nuestros hallazgos son consistentes con un estudio realizado en Taiwan¹³⁰ que relacionó la exposición a dioxinas generadas a partir de una planta incineradora con un ligero acortamiento de la edad gestacional. Aun así, el grupo de Longnecker publicó un trabajo en el que no se objetivó relación entre los niveles maternos de PCBs en el embarazo y la edad gestacional. Nuestros resultados fueron más marcados en niños varones, lo que va en contra de los resultados del grupo de Hertz-Picciotto²⁷, que observó que la exposición a PCBs estaba asociada a gestaciones de menor duración sólo para las niñas. En cualquier caso, estos estudios examinaban los posibles efectos de mezclas de PCBs y no se centraban en los efectos de las sustancias *dioxin-like*.

Los estudios realizados sobre exposición accidental de mujeres embarazadas a altos niveles de PCDDs/DFs y PCBs con actividad *dioxin-like* sugieren que la exposición accidental durante el embarazo a dioxinas puede afectar el crecimiento fetal e incluso el desarrollo infantil^{21,22,23,131,132,133} pero existe controversia sobre cómo la exposición a un nivel bajo de estos compuestos se asocia a un descenso en el peso al nacer en humanos. Nuestros hallazgos están en la línea de los resultados de los estudios que han asociado exposición a niveles bajos de dioxinas y sustancias con actividad *dioxin-like* durante el embarazo y menor peso al nacer^{26,28,134}. Aun así hay algunos estudios^{29,30,135} que contradicen estos hallazgos, incluyendo un pequeño estudio en Dinamarca¹³⁵ utilizando el bioensayo DR Calux® que objetivó asociaciones con otros eventos reproductivos pero no peso al nacer.

Algunos estudios han observado una diferencia entre sexos en cuanto a los efectos de las dioxinas en el peso al nacer. Un estudio finlandés²⁶ objetivó una correlación negativa entre peso al nacer y niveles de dioxina en leche materna que era de mayor intensidad en varones, de forma similar a lo observado en un estudio japonés¹³⁴ investigando dioxinas en sangre materna. Estos hallazgos, junto con los observados en el la cohorte de mujeres altamente expuestas a dioxinas en el incidente de Yusho¹³⁶ (exposición accidental a aceite de ricino contaminado en Japón en 1968), sugieren que los niños varones serían más susceptibles que las niñas a las dioxinas. En nuestro estudio no se observaron estas diferencias probablemente debido a que la concentración de dioxinas era baja. Algunos estudios animales experimentales¹³⁷ aportan evidencia a favor de la tendencia sexo-específica del efecto de las dioxinas, así como efectos transgeneracionales específicos en el sistema reproductor. Aun así, los mecanismos a través de los cuales la exposición a dioxinas produciría una restricción de crecimiento más acusada en varones no están claros.

Una posible explicación para los hallazgos no consistentes en la literatura en cuanto a dioxinas y sustancias *dioxin-like* con eventos reproductivos puede estar relacionada con el hecho de que el asesoramiento de la exposición fue realizado de forma diferente en cada estudio. Estudios epidemiológicos previos han explorado indicadores subrogados de exposición a dioxinas como el consumo de pescado¹³⁸, la residencia en zonas cercanas a incineradoras de residuos³¹ o en áreas con alta consumición de pescado contaminado²⁴; midiendo bien PCBs, PCDDs o PCDFs en sangre o leche materna, o en algunos casos sangre de cordón.

El sesgo de clasificación según la exposición puede ser reducido midiendo la activación específica del receptor mediante bioensayos genéticos *in vitro*, ya que variaciones en la captación y afinidad de los receptores están integrados en las medidas de potencia tóxica. En el presente estudio, la exposición a dioxinas y a sustancias *dioxin-like* se han estimado en plasma sanguíneo con el bioensayo DR CALUX®. El uso de este biomarcador para medir exposición, tanto en plasma sanguíneo umbilical como materno es una fortaleza importante de este estudio. Los métodos de cuantificación de exposición a dioxinas incluyen técnicas sensibles y específicas como la cromatografía de gases y la espectrometría de masas que miden las concentraciones de componentes específicos. Sin embargo, estos métodos son muy caros, lentos y requieren un volumen de muestra grande¹²². Aunque el ensayo DR CALUX® no cuantifica sustancias específicas, ofrece una medida de la potencia o respuesta biológica de la mezcla de dioxinas que tiene en cuenta posibles interacciones (ya sean sinérgicas, aditivas o antagonistas) entre los congéneres¹³⁹. Nuestros resultados muestran que la actividad *dioxin-like* es superior en las muestras de plasma materno que en las fetales y que aunque la actividad *dioxin-like* fetal aumenta paralelamente a la actividad *dioxin-like* materna, la correlación es débil y heterogénea según el país. Bajos niveles de dioxinas y sustancias *dioxin-like* en sangre umbilical comparadas con las correspondientes en sangre materna han sido publicadas por muchos otros estudios^{19,25,125,140,141} pero el único estudio que ha utilizado DR CALUX® para estimar exposición y ha examinado la correlación entre la actividad *dioxin-like* materna y fetal muestra unos resultados similares a los nuestros (coeficiente de rango de Spearman 0,3; $p=0.003$)¹²⁵.

Diferentes poblaciones pueden diferir en la mezcla de dioxinas, furanos y PCBs a los que están expuestos, lo que podría explicar diferencias en las correlaciones según el país. Además, esta falta de correlación podría ser debido a las características del ensayo evaluando la exposición a través de la unión a AhR que podría ser diferente entre madre y recién nacido y podría ser secundario a la tasa de transferencia de dioxinas a través de la placenta. La placenta no sólo conecta el feto en desarrollo al suministro de sangre materna sino que también funciona como barrera materno-fetal frente a algunas moléculas. Modelos experimentales de perfusión placentaria *ex vivo* han observado un aumento de la actividad *dioxin-like* en el tejido de placenta perfundido después de perfusiones de TCDD *ex vivo*¹²⁵. Estos hallazgos sugieren que la acumulación en la placenta puede retrasar la transferencia de TCDD. Niveles elevados de dioxinas y sustancias *dioxin-like* han sido previamente detectados en placentas, comparado con las

correspondientes muestras de sangre fetal y materna^{142,143,144}. Además, información de tres laboratorios de perfusión placentaria ex vivo dentro del proyecto NewGeneris en el transporte placentario de trece agentes inmunotóxicos y genotóxicos fueron meta-analizados y los resultados mostraron que TCDD tenía la menor tasa de transferencia¹⁸. Además, observamos que la actividad *dioxin-like* materna en contraste con la fetal no se asoció a ninguno de los eventos reproductivos evaluados. Todo ello sugiere que los mecanismos por los cuales las dioxinas son transferidas de la madre al feto a través de la placenta son complejos y no del todo comprendidos.

En conclusión, nuestra información del proyecto NewGeneris aporta evidencia apoyando una asociación entre niveles bajos prenatales de actividad *dioxin-like* con menor edad gestacional, particularmente en varones, mientras se objetivaron asociaciones débiles con peso al nacer.

5.3. Óxido de etileno y eventos reproductivos

Este estudio muestra una asociación negativa estadísticamente significativa entre la exposición a óxido de etileno medida a través de los aductos de hemoglobina y el peso y el perímetro cefálico al nacer. Nuestros hallazgos son consistentes con algunos estudios previamente publicados en el que población altamente expuesta a óxido de etileno como auxiliares odontológicas¹⁴⁵ y enfermeras³⁹ tenían mayor riesgo de abortos espontáneos y parto prematuro.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que correlaciona exposición a óxido de etileno con eventos del desarrollo humano. Además, los resultados están reforzados por el hecho de que todas las muestras han sido procesadas mediante un protocolo estandarizado en un laboratorio con mucha experiencia. La razón por la cual hemos utilizado aductos de hemoglobina para medir la exposición es porque son una medida fiable de exposición a óxido de etileno no dependiente de la dosis (ensayos de citogenética han objetivado niveles mayores de aberraciones cromosómicas, así como intercambios entre cromátidas hermanas y micronúcleos de linfocitos periféricos se han utilizado para medir niveles tras exposición aguda a altos niveles de óxido de etileno)¹⁴⁶ ni la reparación del ADN¹⁴⁷. Este hecho podría explicar porque los niveles de aductos de hemoglobina aumentan más y con un patrón diferente a los aductos de ADN, un mecanismo conocido como “la paradoja del óxido de etileno”¹⁴⁸.

La limitación principal es que los resultados no fueron homogéneos entre los países. Esto podría ser explicado por las diferencias en el hábito tabáquico, ya que la heterogeneidad disminuye en el meta-análisis reducido a no fumadoras. Además es importante considerar que el metabolismo del óxido de etileno tiene diferencias interindividuales significativas, lo que implica a la ruta endógena de exposición a óxido de etileno. Estas diferencias podrían ser debidas a polimorfismos genéticos en el gen de la glutathion transferasa 1 (GSTT1), que podría resultar en susceptibilidades distintas a una misma exposición a óxido de etileno¹⁴⁹. Así, podemos sugerir que la exposición difiere entre individuos según la exposición procedente de forma principal de la vía exógena.

En cuanto a la plausibilidad biológica del efecto; primero, el óxido de etileno se ha estudiado extensamente como un potencial carcinógeno. Se han descrito efectos en la alteración de la reactividad del ADN, por lo que sería factible pensar que estas alteraciones en un estadio de desarrollo intrauterino –donde cada paso es crítico- podría producir efectos deletéreos sutiles aunque clínicamente significativos en el recién nacido. Segundo, fumar tabaco, la fuente principal de exposición exógena, se ha asociado históricamente a menor peso al nacer. Aun así, los mecanismos exactos por los que el óxido de etileno produciría una restricción del crecimiento intrauterino no son del todo comprendidos todavía.

El impacto potencial de nuestros hallazgos en una disminución del peso y perímetro cefálico al nacer es crucial. Una reducción en el perímetro cefálico se ha relacionado con retraso en el desarrollo psicomotor¹⁵⁰ y la reducción en el peso al nacer se ha asociado a un aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y osteoporosis¹⁵¹.

Se deberían discutir cambios en las políticas de sanidad pública para proteger a poblaciones susceptibles como los bebés y las mujeres embarazadas de la exposición a óxido de etileno.

5.4 Acrilamida y eventos reproductivos

Este estudio aporta fuerte evidencia de que una alta exposición prenatal a acrilamida a través de la dieta materna durante el embarazo se asocia a una reducción en el peso al nacer y el perímetro cefálico. La exposición prenatal a acrilamida se evaluó utilizando aductos de Hb, que son biomarcadores bien establecidos para medir la exposición a acrilamida¹⁵². El peso al nacer disminuyó monótonamente con el aumento del nivel de aducto de Hb acrilamida y glicidamida en sangre de cordón. Estos hallazgos fueron consistentes entre países y se observaron en la población general así como en las no fumadoras. El consumo materno de comida con alto contenido de acrilamida se asoció a altos niveles de aductos de Hb de acrilamida y glicidamida en sangre de cordón y a menor peso al nacer.

El asesoramiento de la exposición prenatal utilizando biomarcadores es una fortaleza clave del estudio. La medida de aductos de Hb en sangre de cordón permitieron una estimación más fiable de la exposición prenatal a acrilamida comparada con estimaciones basadas solamente en cuestionarios de dieta o niveles de aducto de Hb en sangre materna. Midiendo los niveles de aducto de Hb en sangre de cordón se tienen en cuenta las variaciones relacionadas con exposición transplacentaria, consumo y metabolismo en el organismo fetal. En la misma línea que nuestras observaciones de niveles de aducto de Hb de acrilamida mayores en niños de la cohorte inglesa en comparación a otros países, también se ha publicado un estudio en el que los adultos no fumadores británicos presentaban mayores niveles comparado con adultos no fumadores procedentes de otros países europeos¹⁵³. Además, nuestra población de estudio es grande, y con información detallada sobre características maternas incluyendo hábito tabáquico y dieta durante el embarazo, recogido todo ello de una forma que nos ha permitido evaluar fuentes potenciales de exposición contribuyendo a la formación intra-útero de aductos de Hb y reducir potenciales sesgos ajustando co-factores en una gran parte de la población de estudio.

Adicionalmente a la ingesta de acrilamida a través de la dieta^{54,154}, es posible que los aductos de Hb de acrilamida actúen como marcadores subrogados de otra exposición dietética o una mezcla de exposiciones que serían responsables de las asociaciones observadas, como otros productos de la reacción Maillard que, como la acrilamida, se forman durante el procesamiento de comida a altas temperaturas^{155, 156}. Alternativamente, los aductos de acrilamida pueden estar actuando como marcador de

dieta menos saludable en general, siendo la acrilamida uno de los contribuyentes a las asociaciones observadas. Ajustando por los indicadores de hábitos dietéticos saludables y no saludables (como frutas, vegetales, pescado y refrescos), IMC pregestacional e indicadores de factores socioeconómicos, no se alteraron las asociaciones en el subgrupo de población con información disponible. Además, algunos alimentos típicamente considerados como saludables como pan tostado y algunos cereales para desayunar pueden contener altas concentraciones de acrilamida ⁴⁴.

Finalmente, los aductos de acrilamida y glicidamida también podrían reflejar la exposición a humo de tabaco ⁵¹. Las asociaciones dosis-respuesta monótonas de niveles de aducto de Hb con eventos reproductivos se observaron en mujeres no fumadoras durante el embarazo, así como en nunca-fumadoras, incluso después de ajustar por tabaquismo pasivo basado bien en información aportada por la propia paciente, o bien en aductos de óxido de etileno como marcadores de exposición a humo de tabaco. No podemos descartar factores de confusión no controlados, ni la posibilidad de que los niveles de aducto de Hb de acrilamida sean un marcador subrogado de otro factor causal. Aun así, dada la consistencia de nuestros hallazgos en diferentes subgrupo de población y tras ajustar por múltiples factores confusores potenciales, parece improbable que la exposición prenatal a humo de tabaco u otros componentes de la dieta pudieran explicar por completo las asociaciones observadas entre acrilamida y peso al nacer.

Una limitación del asesoramiento de la exposición basada en información sobre la dieta es la dificultad para evaluar la exposición a agentes tóxicos, como la acrilamida, para los cuales las concentraciones pueden variar substancialmente entre comidas similares dependiendo de los métodos de procesamiento ^{44,45,46,156}. La estimación cuantitativa de la ingesta dietética es particularmente compleja en los estudios internacionales. Sin embargo, la ingesta de ciertos tipos de comida se han relacionado con la predicción de un nivel superior de aducto de Hb de acrilamida en otras poblaciones de estudio ^{154,152} así como en el presente estudio.

Descensos en peso al nacer en recién nacidos tras la exposición materna a acrilamida durante la gestación se han observado de forma consistente en ratas y ratones ^{47,48}. Un panel evaluatorio del programa nacional de toxicología de Estados Unidos concluyó que la acrilamida causa disminución en peso al nacer en roedores, aunque los mecanismos subyacentes no son del todo comprendidos ⁴⁶.

La acrilamida está clasificada como probable carcinógeno para humanos basado en estudios animales y genotoxicidad tal y como consta por parte de la IARC de 1994, y su genotoxicidad se cree que es atribuible ampliamente a una conversión metabólica del epóxido glicidamida⁴⁹. Los niveles de aducto de Hb de acrilamida se asociaron con una disminución en los niveles séricos de insulina y disminución de la resistencia a la insulina¹⁵⁷. Adicionalmente, se observó estrés oxidativo causando la producción de radicales libres de oxígeno e inflamación en 14 voluntarios sanos tras la ingesta de 160g de patatas fritas cada día durante 4 semanas, que corresponde a una exposición diaria a acrilamida que es aproximadamente tres veces superior a la ingesta calculada de aproximadamente 50 µg/día en la dieta occidental¹⁵⁸. La habilidad de la acrilamida para reaccionar con residuos sulfhidril y amino de las proteínas incluyendo enzimas, receptores, proteínas citoesqueléticas pueden afectar a múltiples procesos celulares y se ha sugerido que puede formar algunos de los efectos tóxicos de acrilamida (IARC 1994) y puede contribuir a las asociaciones con eventos reproductivos observadas en nuestra población de estudio.

Las implicaciones potenciales para la salud pública son substanciales. Los incrementos en el perímetro cefálico son un indicador importante de crecimiento cerebral continuo, y el perímetro cefálico reducido se ha relacionado con retraso psicomotor¹⁵⁰. La reducción en peso al nacer es un factor de riesgo para múltiples efectos adversos en la salud a corto y largo plazo, tales como aumento de riesgo cardiovascular, diabetes tipo 2 y osteoporosis¹⁵¹. La diferencia estimada en la media de peso al nacer en niños en el cuartil de máxima exposición a acrilamida comparado con la media de niños en el cuartil de mínima exposición fue de alrededor de 100g, consistente con la reducción en peso al nacer observada para niños expuestos intra-útero a tabaquismo materno¹⁵⁹. Muchos alimentos comúnmente consumidas como patatas fritas, pan tostado y café contienen altas concentraciones de acrilamida. La cantidad de acrilamida en alimentos específicos varía ampliamente dependiendo de los niveles precursores y el procesamiento y, crucialmente, es sensible a las intervenciones realizadas en la preparación de los alimentos.

En resumen, este estudio basado en una gran población aporta la primera evidencia epidemiológica de una asociación significativa entre exposición prenatal a acrilamida y peso y perímetro cefálico al nacer. Si se confirma en subsiguientes estudios, estos hallazgos podrían aportar la evidencia suficiente para apoyar la necesidad de cambios en la producción de alimentos y aportar consejos claros de salud pública para mujeres

embarazadas para disminuir su ingesta diaria de alimentos que contengan altas concentraciones de acrilamida.

6. Conclusiones

La **conclusión principal** de la tesis es que la exposición intra-útero a compuestos con efecto disruptor endocrinológico se asocia a disminución en la distancia anogenital en varones, menor peso al nacer, menor perímetro cefálico y menor edad gestacional; incluso en un contexto de baja exposición general. Nuestros hallazgos son consistentes con la evidencia hallada en estudios animales experimentales utilizados para las recomendaciones de límites de exposición elaboradas por la OMS.

1. En el caso del estudio de exposición a dioxinas y AGD, se objetivó una asociación entre niveles de sustancias con efecto *dioxin-like* medidas a partir del bioensayo DR CALUX® con una disminución en la AGD.

2. En cuanto al estudio de exposición a dioxinas y eventos reproductivos, se objetivó una reducción en la edad gestacional (estadísticamente significativa) así como menores peso al nacer y perímetro cefálico (ambos estadísticamente no significativos), en relación a la exposición a dioxinas medida a partir del bioensayo DR CALUX®.

3. En cuanto al estudio de exposición a óxido de etileno y eventos reproductivos, se objetivaron menores peso al nacer y perímetro cefálico (ambos estadísticamente significativos), así como una reducción en la edad gestacional (no significativa) en relación a la exposición a dioxinas medida a partir de la medida de aductos de hemoglobina mediante el procedimiento FIRE.

4. En cuanto al estudio de exposición a acrilamida y eventos reproductivos, se objetivaron menores peso al nacer y perímetro cefálico (ambos estadísticamente significativos), así como una reducción en la edad gestacional (no significativa) en relación a la exposición a dioxinas medida a partir de la medida de aductos de hemoglobina mediante el procedimiento FIRE.

A la luz de estos hallazgos, pensamos que se deberían discutir cambios en las políticas de salud pública para proteger a poblaciones susceptibles como los bebés y las mujeres embarazadas de la exposición a dioxinas, óxido de etileno y acrilamida, todas ellas ampliamente presentes a dosis bajas en la población general.

7. Bibliografía

- ¹ Olea N, Olea-Serrano F, Larderilli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A: Inadvertent exposure to xenostrogens in children. *Toxicol Ind Health*. 1999; 15:151-8.
- ² Liem AK, van Zorge JA. Dioxins and related compounds: status and regulatory aspects. *Environ Sci Pollut Res*. 1995; 2(1):46-56.
- ³ European Food Safety Authority. Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. *EFSA Journal*. 2010; 8(3):1385.
- ⁴ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1998. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Available at <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp104-c1-b.pdf> (accessed on 19th September 2014)
- ⁵ Birnbaum LS. Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett*. 1995; 82-83:743-50.
- ⁶ Marinković N, Pašalić D, Ferenčak G, Gršković B, Stavlenić Rukavina A: Dioxins and human toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010;61:445-53.
- ⁷ Okino ST, Whitlock JP. The aromatic hydrocarbon receptor, transcription, and endocrine aspects of dioxin action. *Vitam Horm*. 2000;59:241-64.
- ⁸ Halwachs S, Wassermann L, Lindner S, Zizzadoro C, Honscha W. Fungicide prochloraz and environmental pollutant dioxin induce the ABCG2 transporter in bovine mammary epithelial cells by the arylhydrocarbon receptor signaling pathway. *Toxicol Sci*. 2013 Feb;131(2):491-501. doi: 10.1093/toxsci/kfs304. Epub 2012 Oct 18.
- ⁹ Hung WT, Lambert GH, Huang PW, Patterson DG Jr, Guo YL. Genetic susceptibility to *dioxin-like* chemicals' induction of cytochrome P4501A2 in the human adult linked to specific AhRR polymorphism. *Chemosphere*. 2013 Mar;90(9):2358-64. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.026. Epub 2012 Nov 17.
- ¹⁰ Kobayashi S1, Sata F, Sasaki S, Ban S, Miyashita C, Okada E, Limpar M, Yoshioka E, Kajiwara J, Todaka T, Saijo Y, Kishi R. Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1) polymorphisms with dioxin blood concentrations among pregnant Japanese women. *Toxicol Lett*. 2013 Jun 7;219(3):269-78. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.03.013. Epub 2013 Mar 23.
- ¹¹ van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., et al. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and *dioxin-like* compounds. *Toxicol. Sci.* 93, 223–241.
- ¹² van den Berg M, Denison MS, Birnbaum LS, Devito MJ, Fiedler H, Falandysz J, Rose M, Schrenk D, Safe S, Tohyama C, Tritscher A, Tysklind M, Peterson RE. Polybrominated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls: inclusion in the toxicity equivalency factor concept for *dioxin-like* compounds. *Toxicol Sci*. 2013 Jun;133(2):197-208. doi: 10.1093/toxsci/kft070. Epub 2013 Mar 14.
- ¹³ Patterson DG, Hampton L, Lapeza C, Belser WT, Green V, Alexander L, Needham LL. High-resolution gas chromatographic/high-resolution mass spectrometric analysis of human serum on a whole-weight and lipid basis for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Anal Chem*. 1987;59:2000-5.
- ¹⁴ Brouwer A, Sonneveld E, Botschuijver S, Besselink H, Burg van der B. A low volumen method for the analysis of dioxins and *dioxin-like* compounds in serum and whole blood using BDS' DR CALUX® bioassay. *Organohalog Compd* 2004;66:687–90.

-
- ¹⁵ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon, France, 4-11 February 1997. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1997;69:1-631.
- ¹⁶ Kogevinas M, Kauppinen T, Winkelmann R, Becher H, Bertazzi PA, Bueno-de-Mesquita HB, Coggon D, Green L, Johnson E, Littorin M, Lynge E, Marlow DA, Mathews JD, Neuberger M, Benn T, Pannett B, Pearce N, Saracci R: Soft tissue sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins: Two nested case-control studies. *Epidemiology* 1995, 6:396-402.
- ¹⁷ Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*. 2003; 423:545-50.
- ¹⁸ Mose T, Mathiesen L, Karttunen V, Nielsen JK, Sieppi E, Kumm M, Morck TA, Myohanen K, Partanen H, Vahakangas K, Knudsen LE, Myllynen P. Meta-analysis of data from human ex vivo placental perfusion studies on genotoxic and immunotoxic agents within the integrated European project NewGeneris. *Placenta* 2012;33(5):433-9.
- ¹⁹ Nakano S, Noguchi T, Takekoshi H, Suzuki G, Nakano M. Maternal-fetal distribution and transfer of dioxins in pregnant women in Japan, and attempts to reduce maternal transfer with *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) supplements. *Chemosphere* 2005;61(9):1244-55.
- ²⁰ Parzefall W. Risk assessment of dioxin contamination in human food. *Food Chem Toxicol* 2002;40(8):1185-9.
- ²¹ Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG, Jr., Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 1996;348(9024):409.
- ²² Eskenazi B, Mocarelli P, Warner M, Chee WY, Gerthoux PM, Samuels S, Needham LL, Patterson DG, Jr. Maternal serum dioxin levels and birth outcomes in women of Seveso, Italy. *Environ Health Perspect* 2003;111(7):947-53.
- ²³ Ngo AD, Taylor R, Roberts CL, Nguyen TV. Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2006;35(5):1220-30.
- ²⁴ Fein GG, Jacobson JL, Jacobson SW, Schwartz PM, Dowler JK. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: effects on birth size and gestational age. *J Pediatr* .1984; 105(2):315-20.
- ²⁵ Patandin S, Koopman-Esseboom C, de Ridder MA, Weisglas-Kuperus N, Sauer PJ. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatr Res* 1998;44(4):538-45.
- ²⁶ Vartiainen T, Jaakkola JJ, Saarikoski S, Tuomisto J. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect* 1998;106(2):61-6.
- ²⁷ Hertz-Picciotto I, Charles MJ, James RA, Keller JA, Willman E, Teplin S. In utero polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiology* 2005;16(5):648-56.
- ²⁸ Tajimi M, Uehara R, Watanabe M, Oki I, Ojima T, Nakamura Y. Relationship of PCDD/F and Co-PCB concentrations in breast milk with infant birthweights in Tokyo, Japan. *Chemosphere* 2005;61(3):383-8.
- ²⁹ Sagiv SK, Tolbert PE, Altshul LM, Korrick SA. Organochlorine exposures during pregnancy and infant size at birth. *Epidemiology* 2007;18(1):120-9.
- ³⁰ Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H, Saito S. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;18(3):246-51.

-
- ³¹ Sonneborn D, Park HY, Petrik J, Kocan A, Palkovicova L, Trnovec T, Nguyen D, Hertz-Picciotto I. Prenatal polychlorinated biphenyl exposures in eastern Slovakia modify effects of social factors on birthweight. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;22(3):202-13.
- ³² Lynch DW, Lewis TR, Moorman WJ, Burg JR, Groth DH, Khan A et al: Carcinogenic and toxicologic effects of inhaled ethylene oxide and propylene oxide in F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984;76:69-84.
- ³³ Hogstedt C, Rohlén O, Berndtsson BS, Axelson O, Ehrenberg L: A cohort study of mortality and cancer incidence in ethylene oxide production workers. *British Journal of Industrial Medicine*. 1979;36:276-80.
- ³⁴ IARC. Vol 60: Some Industrial Chemicals. 1994. In: I. A. Cancer, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* (págs. 45-160). Lyon: IARC.
- ³⁵ Lieberman M, M. L. Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature*.1964;204:237-9.
- ³⁶ Clemens MR, E. H. Volatile hydrocarbons from hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation of erythrocytes and their cell compounds. *Biochem Pharmacol*. 1983; 32: 3877-8.
- ³⁷ Törnqvist M, G. B.-R. Unsaturated lipids and intestinal bacteria as sources of endogenous production of ethylene and ethylene oxide. *Carcinogenesis*. 1989;10:39-41.
- ³⁸ Van Sittert NJ, B. P. Formation of DNA adducts and induction of mutagenic effects in rats following 4 weeks inhalation exposure to ethylene oxide as a basis for cancer risk assessment. *Mutat Res*. 2000; 447:27-48.
- ³⁹ Gresie-Brusin DF, Kielkowski D, Baker A, Channa K and Rees D: Occupational exposure to ethylene oxide during pregnancy and association with adverse reproductive outcomes. *Int Arch Occup Environ Health*. 2007; 80:559-65.
- ⁴⁰ Osmond C1, Barker DJ: Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108 Suppl 3:545-53.
- ⁴¹ De Boo HA, Harding JE: The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2006 Feb;46(1):4 -14.
- ⁴² IARC (International Agency for Research on Cancer). 1994. Some industrial chemicals. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum* 60:1–560.
- ⁴³ Tareke et al Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M: Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 4998-5006.
- ⁴⁴ EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Results on Acrylamide Levels in Food from Monitoring Year 2008. Parma, Italy:EFSA.
- ⁴⁵ JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2011. Evaluation of certain contaminants in food. (Seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 960. Rome, Italy:JECFA.
- ⁴⁶ Manson J, Brabac MJ, Buelke-Sam J, Carlson GP, Chapin RE, Favor JB, et al. 2005. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of acrylamide. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 74:17–113.
- ⁴⁷ El Sayyad HI, Abou-Egla MH, El Sayyad FI, El-Ghawet HA, Gaur RL, Fernando A, et al. 2011. Effects of fried potato chip supplementation on mouse pregnancy and fetal development. *Nutrition*

27:343–350.

⁴⁸ Tyl RW, Friedman MA. 2003. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod Toxicol* 17:1–13.

⁴⁹ Rice JM. 2005. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat Res* 580:3–20.

⁵⁰ Törnqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P. 2002. Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778:279–308.

⁵¹ von Stedingk H, Vikström AC, Rydberg P, Pedersen M, Nielsen JKS, Segerbäck D et al. 2011. Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark. *Chem Res Toxicol* 24:1957–1965.

⁵² Schettgen T, Kutting B, Hornig M, Beckmann MW, Weiss T, Drexler H, et al. 2004. Trans-placental exposure of neonates to acrylamide—a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 77:213–216.

⁵³ Annola K, Keski-Rahkonen P, Vahakangas K, Lehtonen M. 2008. Simultaneous determination of acrylamide, its metabolite glycidamide and antipyrine in human placental perfusion fluid and placental tissue by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 876:191–197.

⁵⁴ Brantsaeter AL, Haugen M, Mul A, Bjellaas T, Becher G, Klaveren JV, et al. 2008. Exploration of different methods to assess dietary acrylamide exposure in pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Food Chem Toxicol* 46:2808–2814.

⁵⁵ Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ: Hypospadias trends in two American surveillance systems. *Pediatrics*. 1997; 100: 831-4.

⁵⁶ Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C et al: Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cel Endocrinol*. 2001;178:99-105.

⁵⁷ Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE: Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *Br Med J*. 1992;305:609-13.

⁵⁸ Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE: Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ Health Perspect*. 1995;103(suppl.7):137-9.

⁵⁹ Vidaeff AC, Sever LE: In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reproduct Toxicol* 2005;20:5-20.

⁶⁰ McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM: Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide *in utero*: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci*. 2001;62:230-249.

⁶¹ Wolf CJ, LeBlanc GA, Gray LE Jr: Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. *Toxicol Sci*. 2004;28:135-43.

⁶² Langman J: *Embriología médica*. 5ª Ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2000.

⁶³ Speroff L, Fritz MA: *Endocrinología clínica y esterilidad*. 2ª Ed. Madrid: Wolkers Kluwer; 2006.

⁶⁴ González-Merlo J: *Ginecología*. 6ª Ed. Barcelona: Masson-Salvat; 1993.

⁶⁵ Swan SH, Elkin EP, Fenster L: Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*. 1997;105:1228–32.

-
- ⁶⁶ Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P: Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*. 1995;332:281–5.
- ⁶⁷ Swan SH, Elkin EP, Fenster L: The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published. *Environ Health Perspect*. 2000;108:961-6.
- ⁶⁸ Paulozzi LJ: International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect*. 1999; 107:297-302.
- ⁶⁹ Canlorbe P, Toublanc JE, Roger M, Job JC: Endocrine function of the testis in 125 cases of cryptorchism. *Ann Med Interne*. 1974;125:365-9.
- ⁷⁰ Morrison AS: Cryptorchidism, hernia and cancer of the testis. *J Natl Cancer Inst*. 1976;56:731-3.
- ⁷¹ Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM: Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*. 2001;16:972-8.
- ⁷² Colborn T, Clement C, edit: Wingspread consensus statement. *Chemically Induced Alterations in Sexual, Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Publishing. 1992:1-8.
- ⁷³ Christian GD, Ternes T: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environ Health Perspect*. 1999;107:907-8.
- ⁷⁴ Parks LG, Otsby JS, Lambright CR, Abbot BD, Klinefelter GR, Barlow NJ et al: The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci*. 2000;58:339-349.
- ⁷⁵ Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR et al: Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol*. 2004; 18:241-264.
- ⁷⁶ Bartke A, Williams KIH, Dalterio S: Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro. *Biol Reprod*. 1977;17:645-9.
- ⁷⁷ Sharpe RM, Skakkeback NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993; 1:1392-5.
- ⁷⁸ Merlo DF, Wild CP, Kogevinas M, Kyrtopoulos S, Kleinjans J. NewGeneris: a European study on maternal diet during pregnancy and child health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(1):5-10.
- ⁷⁹ NewGeneris. NewGeneris Project: Newborns and Genotoxic exposure risks
<http://www.newgeneris.org/> Accessed on 20/02/2016, 2016.
- ⁸⁰ Romano-Riquer SP, Hernández-Avila M, Gladen BC, Cupul-Uicab LA, Longnecker MP: Reliability and determinants of anogenital distance and penis dimensions in male newborns from Chiapas, Mexico. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007 ;21:219-28.
- ⁸¹ Salazar-Martinez E, Romano-Piquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M: Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health*. 2004;3:8.
- ⁸² Murk AJ, Leonards PE, van Hattum B, Luit R, van der Waiden ME, Mit M. The CALUX® (Chemical Activated LUciferase eXpression) assay adapted and validated for measuring TCDD equivalents in blood plasma. *Environ Toxicol Chem*. 1997; 16:1583-9.
- ⁸³ von Stedingk H, Vikström AC, Rydberg P, Pedersen M, Nielsen JK, Segerbäck D, Knudsen LE, Törnqvist M: Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide, and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark. *Chem Res Toxicol*. 2011 Nov 21;24(11):1957-65. doi: 10.1021/tx200284u. Epub 2011 Sep 15.

-
- ⁸⁴ Chatzi L, Mendez M, Garcia R, Roumeliotaki T, Ibarluzea J, Tardón A, et al. 2012. Mediterranean diet adherence during pregnancy and fetal growth: INMA (Spain) and RHEA (Greece) mother-child cohort studies. *Br J Nutr* 107(1):135–145.
- ⁸⁵ Magnus P, Irgens LM, Haug K, Nystad W, Skjaerven R, Stoltenberg C; MoBa Study Group. 2006. Cohort profile: The Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Epidemiol* 35:1146–1150.
- ⁸⁶ Pedersen M, Wichmann J, Autrup H, Dang DA, Decordier I, Hvidberg M, et al. 2009. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res* 109:1012–1020.
- ⁸⁷ Raynor P, Born in Bradford Collaborative Group. 2008. Born in Bradford cohort study of babies born in Bradford, and their parents: protocol for the recruitment phase. *BMC Public Health* 8:327; doi:10.1186/1471-2458-8-327 [Online 23 September 2008].
- ⁸⁸ Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. 2003. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 348:2599–2608.
- ⁸⁹ Butte NF, King JC. 2005. Energy requirements during pregnancy and lactation. *Public Health Nutr* 8:1010–1027.
- ⁹⁰ Willett WC. 1998. *Nutritional Epidemiology*. New York:Oxford University Press.
- ⁹¹ Pedersen M, Schoket B, Godschalk RW, Wright J, von Stedingk H, Törnqvist M, Sunyer J et al: Bulky dna adducts in cord blood, maternal fruit-and-vegetable consumption, and birth weight in a European mother-child study (NewGeneris). *Environ Health Perspect*. 2013 Oct;121(10):1200-6. doi: 10.1289/ehp.1206333. Epub 2013 Jul 23.
- ⁹² Pedersen M, Mendez MA, Schoket B, Godschalk RW, Espinosa A, Landström A, Villanueva CM et al: Environmental, dietary, maternal, and fetal predictors of bulky DNA adducts in cord blood: a European mother-child study (NewGeneris). *Environ Health Perspect*. 2015 Apr;123(4):374-80. doi: 10.1289/ehp.1408613. Epub 2015 Jan 27. Erratum in: *Environ Health Perspect*. 2016 Jan 1;124(1):A12.
- ⁹³ Merlo DF, Agramunt S, Anna L, Besselink H, Botsivali M, Brady NJ, Ceppi M, NewGeneris Consortium et al: Micronuclei in cord blood lymphocytes and associations with biomarkers of exposure to carcinogens and hormonally active factors, gene polymorphisms, and gene expression: the NewGeneris cohort. *Environ Health Perspect*. 2014 Feb;122(2):193-200. doi: 10.1289/ehp.1206324.
- ⁹⁴ Vande Loock K, Botsivali M, Zangogianni M, Anderson D, Baumgartner A, Fthenou E, Chatzi L et al: The effect of dietary estimates calculated using food frequency questionnaires on micronuclei formation in European pregnant women: a NewGeneris study. *Mutagenesis*. 2014 Nov;29(6):393-400. doi: 10.1093/mutage/geu052. Epub 2014 Oct 8.
- ⁹⁵ Papadopoulou E, Kogevinas M, Botsivali M, Pedersen M, Besselink H, Mendez MA, Fleming S, et al: Maternal diet, prenatal exposure to dioxin-like compounds and birth outcomes in a European prospective mother-child study (NewGeneris). *Sci Total Environ*. 2014 Jun 15;484:121-8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.047. Epub 2014 Mar 30.
- ⁹⁶ FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2002. *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Fifty-seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Rome:FAO/WHO.
- ⁹⁷ Gray LE Jr, Ostby JS. 1995. In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 133:285–94.

-
- ⁹⁸ Jin MH, Hong CH, Lee HY, Kang HJ, Han SW. 2010. Toxic effects of lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on development of male reproductive system: involvement of antioxidants, oxidants, and p53 protein. *Environ Toxicol* 25:1–8.
- ⁹⁹ Jin MH, Ko HK, Hong CH, Han SW. 2008. In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the development of reproductive system in mouse. *Yonsei Med J* 49:843–50. *Toxicol Chem* 16:1583–1589.
- ¹⁰⁰ Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, et al. 2001. Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol Sci* 60:132–43.
- ¹⁰¹ Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Ishimura R, Kakeyama M, Izumi H, et al. 2002. Developmental stage-specific effects of perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on reproductive organs of male rat offspring. *Toxicol Sci* 66:283–92.
- ¹⁰² Mocarelli P, Gerthoux PM, Needham LL, Patterson DG Jr, Limonta G, Falbo R, et al. 2011. Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality. *Environ Health Perspect* 119:713–718.
- ¹⁰³ Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. 2011. Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Int J Androl* 35(3):236–244.
- ¹⁰⁴ Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 113:1056–1061.
- ¹⁰⁵ Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 35:14–20.
- ¹⁰⁶ Longnecker MP, Gladen BC, Cupul-Uicab LA, Romano-Riquer SP, Weber JP, Chapin RE, et al. 2007. In utero exposure to the antiandrogen 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) in relation to anogenital distance in male newborns from Chiapas, Mexico. *Am J Epidemiol* 165:1015–1022.
- ¹⁰⁷ Torres-Sanchez L, Zepeda M, Cebrian ME, Belkind-Gerson J, Garcia-Hernandez RM, Belkind-Valdovinos U, et al. 2008. Dichlorodiphenyldichloroethylene exposure during the first trimester of pregnancy alters the anal position in male infants. *Ann NY Acad Sci* 1140:155–162.
- ¹⁰⁸ Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. 2008. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. *Curr Urol Rep* 9:137–142.
- ¹⁰⁹ Mendiola J, Stahlhut RW, Jorgensen N, Liu F, Swan SH. 2011. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environ Health Perspect* 119:958–963.
- ¹¹⁰ Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI. 2011. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. *PLoS One* 6:e18973; doi:10.1371/journal.pone.0018973 [Online 11 May 2011].
- ¹¹¹ Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. 2012. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J Urol* 187:594–598.
- ¹¹² Papadopoulou E, Vafeiadi M, Agramunt S, Basagaña X, Mathianaki K, Karakosta P, et al. 2013. Anogenital distances in newborns and children from Spain and Greece: predictors, tracking and reliability. *Paediatr Perinat Epidemiol* 27(1):89–99.
- ¹¹³ Torres-Sanchez L, Zepeda M, Cebrian ME, Belkind-Gerson J, Garcia-Hernandez RM, Belkind-Valdovinos U, et al. 2008. Dichlorodiphenyldichloroethylene exposure during the first trimester of pregnancy alters the anal position in male infants. *Ann NY Acad Sci* 1140:155–162.

-
- ¹¹⁴ Birnbaum LS. 1994. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ Health Perspect* 102:676–679.
- ¹¹⁵ Heimler I, Trewin AL, Chaffin CL, Rawlins RG, Hutz RJ. 1998. Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in Holtzman rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally. *Reprod Toxicol* 12:69–73.
- ¹¹⁶ Wolf CJ, Ostby JS, Gray LE Jr. 1999. Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol Sci* 51:259–64.
- ¹¹⁷ Den Hond E, Roels HA, Hoppenbrouwers K, Nawrot T, Thijs L, Vandermeulen C, et al. 2002. Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited. *Environ Health Perspect* 110:771–776.
- ¹¹⁸ Leijds MM, Koppe JG, Olie K, van Aalderen WM, Voogt P, Vulsma T, et al. 2008. Delayed initiation of breast development in girls with higher prenatal dioxin exposure; a longitudinal cohort study. *Chemosphere* 73:999–1004.
- ¹¹⁹ Ozkan B, Konak B, Cayir A, Konak M. 2011. Anogenital distance in Turkish newborns. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 3:122–125.
- ¹²⁰ Sathyanarayana S, Beard L, Zhou C, Grady R. 2010. Measurement and correlates of ano-genital distance in healthy, newborn infants. *Int J Androl* 33:317–323.
- ¹²¹ Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. 2009. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect* 117:1786–1790.
- ¹²² Warner M, Eskenazi B, Patterson DG, Clark G, Turner WE, Bonsignore L, et al. 2005. *Dioxin-Like* TEQ of women from the Seveso, Italy area by ID-HRGC/HRMS and CALUX. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 15:310–318.
- ¹²³ Long M, Deutch B, Bonefeld-Jorgensen EC. 2007. AhR transcriptional activity in serum of Inuits across Greenlandic districts. *Environ Health* 6:32; doi:10.1186/1476-069X-6-32 [Online 23 October 2007].
- ¹²⁴ Halldorsson TI, Thorsdottir I, Meltzer HM, Strom M, Olsen SF. 2009. *Dioxin-like* activity in plasma among Danish pregnant women: dietary predictors, birth weight and infant development. *Environ Res* 109:22–8.
- ¹²⁵ Pedersen M, Halldorsson TI, Mathiesen L, Mose T, Brouwer A, Hedegaard M, et al. 2010. *Dioxin-like* exposures and effects on estrogenic and androgenic exposures and micronuclei frequency in mother-newborn pairs. *Environ Int* 36:344–51.
- ¹²⁶ Pauwels A, Cenijs PH, Schepens PJ, Brouwer A. 2000. Comparison of chemical-activated luciferase gene expression bioassay and gas chromatography for PCB determination in human serum and follicular fluid. *Environ Health Perspect* 108:553–7.
- ¹²⁷ Koppen G, Covaci A, Van Cleuvenbergen R, Schepens P, Winneke G, Nelen V, et al. 2001. Comparison of CALUX-TEQ values with PCB and PCDD/F measurements in human serum of the Flanders environmental and health study (FLEHS). *Toxicol Lett* 123:59–67.
- ¹²⁸ Van Den Heuvel RL, Koppen G, Staessen JA, Hond ED, Verheyen G, Nawrot TS, et al. 2002. Immunologic biomarkers in relation to exposure markers of PCBs and dioxins in Flemish adolescents (Belgium). *Environ Health Perspect* 110:595–600.
- ¹²⁹ Koopman-Esseboom C, Huisman M, Weisglas-Kuperus N, Boersma ER, de Ridder MAJ, Van der Paauw CG, et al. 1994. Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in the

Netherlands. *Chemosphere* 29:2327–38.

¹³⁰ Lin CM, Li CY, Mao IF. Birth outcomes of infants born in areas with elevated ambient exposure to incinerator generated PCDD/Fs. *Environ Int* 2006;32(5):624-9.

¹³¹ Yamashita F, Hayashi M. Fetal PCB syndrome: clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism. *Environ Health Perspect* 1985;59:41-5.

¹³² Rogan WJ, Gladen BC, Hung KL, Koong SL, Shih LY, Taylor JS, Wu YC, Yang D, Ragan NB, Hsu CC. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* 1988;241(4863):334-6.

¹³³ Yen YY, Lan SJ, Yang CY, Wang HH, Chen CN, Hsieh CC. Follow-up study of intrauterine growth of transplacental Yu-Cheng babies in Taiwan. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994;53(5):633-41.

¹³⁴ Konishi K, Sasaki S, Kato S, Ban S, Washino N, Kajiwara J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Yasutake D, Kishi R. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and *dioxin-like* PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 2009;109(7):906-13.

¹³⁵ Halldorsson TI, Thorsdottir I, Meltzer HM, Strom M, Olsen SF. *Dioxin-like* activity in plasma among Danish pregnant women: dietary predictors, birth weight and infant development. *Environ Res* 2009;109(1):22-8.

¹³⁶ Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N, Furue M. Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. *Environ Int* 2012;38(1):79-86.

¹³⁷ Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Dioxin (TCDD) induces epigenetic transgenerational inheritance of adult onset disease and sperm epimutations. *PLoS One* 2012;7(9):e46249.

¹³⁸ Tawara K, Nishijo M, Honda R, Maruzeni S, Seto T, Kido T, Saito S, Nakagawa H. Effects of maternal dioxin exposure on newborn size at birth among Japanese mother-infant pairs. *Environ Health Prev Med* 2009;14(2):88-95.

¹³⁹ Long M, Deutch B, Bonefeld-Jorgensen EC. AhR transcriptional activity in serum of Inuits across Greenlandic districts. *Environ Health* 2007;6:32.

¹⁴⁰ Nakamura T, Nakai K, Matsumura T, Suzuki S, Saito Y, Satoh H. Determination of dioxins and polychlorinated biphenyls in breast milk, maternal blood and cord blood from residents of Tohoku, Japan. *Sci Total Environ* 2008;394(1):39-51.

¹⁴¹ Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Fukushima K, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Wake N, Furue M. Comparison of the concentrations of polychlorinated biphenyls and dioxins in mothers affected by the Yusho incident and their children. *Chemosphere* 2011;84(7):928-35.

¹⁴² Wang SL, Lin CY, Guo YL, Lin LY, Chou WL, Chang LW. Infant exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs) correlation between prenatal and postnatal exposure. *Chemosphere* 2004;54(10):1459-73.

¹⁴³ Suzuki G, Nakano M, Nakano S. Distribution of PCDDs/PCDFs and Co-PCBs in human maternal blood, cord blood, placenta, milk, and adipose tissue: dioxins showing high toxic equivalency factor accumulate in the placenta. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69(10):1836-47.

¹⁴⁴ Tsukimori K, Morokuma S, Hori T, Takahashi K, Hirata T, Otera Y, Fukushima K, Kawamoto T, Wake N. Characterization of placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in normal pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res* 2012.

-
- ¹⁴⁵ Rowland AS, Baird DD, Shore DL, Darden B, Wilcox AJ: Ethylene oxide exposure may increase the risk of spontaneous abortion, preterm birth, and postterm birth. *Epidemiology*. 1996 Jul;7(4):363-8.
- ¹⁴⁶ Preston RJ. Cytogenetic effects of ethylene oxide, with an emphasis on population monitoring. *Crit Rev Toxicol*. 1999;29:263-82.
- ¹⁴⁷ Walker VE, F. T. (1992). Molecular dosimetry of ethylene oxide: formation and persistence of 7-(2-hydroxyethyl)guanine in DNA following repeated exposures of rats and mice. *Cancer Res*. 1992; 52:4328-34.
- ¹⁴⁸ Bolt HM. Quantification of Endogenous Carcinogens: The Ethylene Oxide Paradox. *Biochem Pharmacol*. 1996; 52:1-5.
- ¹⁴⁹ Wiebel FA, Dommermuth A, Thier R: The hereditary transmission of the glutathione transferase hGSTT1-1 conjugator phenotype in a large family. *Pharmacogenetics*. 1999;9:251-6.
- ¹⁵⁰ Gale CR, O'Callaghan FJ, Bredow M, Martyn CN. 2006. The influence of head growth in fetal life, infancy, and childhood on intelligence at the ages of 4 and 8 years. *Pediatrics* 118:1486–1492.
- ¹⁵¹ Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 359:61–73.
- ¹⁵² Vikström AC, Abramsson-Zetterberg L, Naruszewicz M, Athanassiadis I, Granath FN, Törnqvist MA. 2011. In vivo doses of acrylamide and glycidamide in humans after intake of acrylamide-rich food. *Toxicol Sci* 119:41–49.
- ¹⁵³ Vesper HW, Slimani N, Hallmans G, Tjonneland A, Agudo A, Benetou V, et al. 2008. Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *J Agric Food Chem* 56:6046–6053.
- ¹⁵⁴ Tran NL, Barraj LM, Murphy MM, Bi X. 2010. Dietary acrylamide exposure and hemoglobin adducts—National Health and Nutrition Examination Survey (2003–04). *Food Chem Toxicol* 48:3098–3108.
- ¹⁵⁵ Chaundhry MQ, Cotterill J, Watkins R, Price N. 2006. The potential of molecular modeling for the prediction of toxicity of compounds generated during heat treatment of foods. In: *Acrylamide and Other Health Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods* (Skog K, Alexander J, eds). Cambridge, UK:Woodhead Publishing, 132–160.
- ¹⁵⁶ Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 50:4998–5006.
- ¹⁵⁷ Lin CY, Lin YC, Kuo HK, Hwang JJ, Lin JL, Chen PC, et al. 2009. Association among acrylamide, blood insulin, and insulin resistance in adults. *Diabetes Care* 32:2206–2211.
- ¹⁵⁸ Naruszewicz M, Zapolska-Downar D, Kosmider A, Norwicka G, Kozłowska-Wojciechowska M, Vikström AS, et al. 2009. Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *Am J Clin Nutr* 89:773–777.
- ¹⁵⁹ Li CQ, Windsor RA, Perkins L, Goldenberg RL, Lowe JB. 1993. The impact on infant birth weight and gestational age of cotinine-validated smoking reduction during pregnancy. *JAMA*. 269:1519–1524.