

Facultat de Biociències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Grup de Mutagènesi

**DAÑO GENÉTICO EN MADRES Y EN SUS RECIÉN
NACIDOS. FACTORES MODULADORES**

Tesis doctoral

Naouale El-Yamani

DAÑO GENÉTICO EN MADRES Y EN SUS RECIÉN NACIDOS. FACTORES MODULADORES

El presente trabajo se ha realizado en el *Grup de Mutagènesi* del *Departament de Genètica i de Microbiologia* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* bajo la dirección del Dr. Ricard Marcos y subvencionado por el Proyecto de Investigación *NewGeneris: Newborns and Genotoxic Exposure Risks (Food-CT-2005-016320)*.

Memoria presentada por Naouale El-Yamani para optar al grado de Doctora por la *Universitat Autònoma de Barcelona*

Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Noviembre de 2011.

VºBº

Director del trabajo de Tesis

Autora

Dr. Ricard Marcos Dauder

Catedrático de Genética

UAB

Naouale El-Yamani

*No existen más que dos reglas para escribir:
tener algo que decir y decirlo.*

Oscar Wilde (1854-1900)

A mi familia

Agradecimientos

Este trabajo de Tesis realizado en la Universitat Autònoma de Barcelona es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado.

En primer lugar, a mi director de Tesis, Dr. Ricard Marcos Dauder, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo en persona, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo. Cuya experiencia y educación han sido mi fuente de motivación y de curiosidad durante estos años

Al Prof. Andrew Collins, un especial agradecimiento primero por haberme recibido en su grupo de investigación en la Universidad de Oslo. Segundo, por sus consejos y su gran sabiduría y paciencia, apoyo y ánimo que me brindó durante mi estancia donde he podido tener la oportunidad de aprender y acabar una parte de este trabajo.

Mis agradecimientos a la colaboración del equipo involucrado en la toma, procesado de las muestras y el análisis de los CFA de este estudio de biomonitorio y que hicieron posible la realización de esta Tesis. Desde luego, mis agradecimientos a Glòria, Lourdes y Cristian por el espíritu de grupo, paciencia y por el incondicional apoyo durante estos años de trabajo. A Susana Pastor, por el apoyo y la coordinación y la buena gestión de toda la información necesaria.

Todos mis compañeros y amigos, estén donde estén, y sin excepción tanto del grup Mutas como los Fanconi, se merece muchas y buenas palabras, ya que con ellos he compartido despacho, laboratorio e incontables horas de trabajo y buenos ratos, lo cual no tiene precio. Por todo el tiempo que me han dado, por las conversaciones científicas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la amistad. Gracias

por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme. Siempre estuvieron ahí en lo bueno y en lo malo, en ocasiones con más confianza en el trabajo que yo misma. ¿Quién puede pedir más? Nos hemos dado ánimos por el camino, y eso siempre ayuda. A todos ellos, gracias.

Un especial agradecimiento a Jaouad, Ali, Med, Alba, Bere, Romain, Lorena y Ana, por estar siempre a mi lado.

No puedo olvidar en mis agradecimientos a la gente de fuera, Amaia, Yolanda y Marit, que me han recibido muy bien durante mi estancia y por haberme dado la oportunidad de convivir dentro y fuera.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional que me otorgaron y el cariño que me inspiraron mis padres, que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado para saber cómo iba mi proceso. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y mi agradecimiento.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud

Índice

ABREVIATURAS.....	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Riesgos de exposición medioambiental en niños	3
1.2. Riesgos de exposición medioambiental prenatal	5
1.3. Asociación entre exposición prenatal y enfermedades en la niñez.....	6
1.4. Períodos críticos y de vulnerabilidad durante el desarrollo fetal.....	9
1.5. Papel de la circulación transplacentaria.....	11
1.6. Modelos para el estudio del metabolismo y de la transferencia placentaria	14
1.7. Biomonitorización humana	17
1.8. Biomarcadores	19
1.8.1. Biomarcadores de exposición	21
1.8.2. Biomarcadores de efecto.....	21
1.8.3. Biomarcadores de susceptibilidad.....	22
1.9. Efectos genéticos de la exposición a los contaminantes ambientales.....	23
1.9.1 El estrés oxidativo.....	24
1.9.2. Mecanismos de reparación del daño genético	27
1.10. Ensayo del cometa como biomarcador del riesgo genotóxico.....	31
1.10.1. Ensayo del cometa en estudios de genotoxicidad.....	33
1.10.2. Ensayo del cometa en los estudios de reparación del DNA	33
1.11. Cuestiones éticas relacionadas con la biomonitorización humana	35
1.12. Nutrición y su papel modulador del daño genético	36
1.12.1. Exposición transplacentaria a contaminantes de la dieta	37
1.12.2. Factores que reducen el riesgo de la exposición prenatal.....	41
1.12.3. La dieta mediterránea como ejemplo de un patrón dietético saludable	43
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49

3.1. Población estudiada.....	49
3.2. Colección de las muestras de sangre.....	49
3.3. Aislamiento y congelación de los linfocitos.....	51
3.4. Descongelación de las muestras	53
3.5. Ensayo del cometa	53
3.5.1. Descripción del protocolo estándar	53
3.5.1.1. Preparación del micro-gel de agarosa	53
3.5.1.2. Lisis.....	55
3.5.1.3. Desnaturalización y electroforesis	56
3.5.1.4. Neutralización y fijación	56
3.5.1.5. Tinción y visualización	56
3.5.2. Ensayo del cometa para la detección de bases oxidadas	57
3.5.3. Ensayo del cometa para el estudio de la reparación	58
3.5.3.1. Preparación de los sustratos.....	60
3.5.3.2. Preparación de los extractos proteicos	61
3.5.3.3. Incubación del extracto proteico con el sustrato celular	62
3.5.3.4. Estimación de las proteínas totales en los extractos	64
3.6. Desarrollo, colección y análisis de los cuestionarios.....	66
3.6.1. Valoración y/o estimaciones de las ingestas dietéticas maternas.....	66
3.7. Análisis estadístico	67
3.7.1. Ensayo del cometa	67
3.7.2. Biomonitorización y análisis de los factores de confusión	68
4. RESULTADOS	71
4.1. Descriptiva de la población estudiada.....	71
4.2. Ingesta diaria de alimentos por las madres	75
4.3. Ingesta de contaminantes según el CFA	77
4.4. Ensayo del cometa	78
4.4.1. Daño genético basal en el DNA de las madres y sus recién nacidos.....	82
4.4.2. Daño oxidativo en el DNA de las madres y sus recién nacidos.....	84

4.4.3. Capacidad de reparación en las madres y sus recién nacidos	85
4.5. Control de los factores de confusión	88
4.5.1. Daño genético basal y distintas características de la población	88
4.5.1.1. Edad de las madres	88
4.5.1.2. Índice de masa corporal (<i>pre</i> -IMC)	90
4.5.1.3. Etnia de las madres	91
4.5.1.4. Exposición al tabaco	92
4.5.1.5. Otros factores de confusión	93
4.5.2. Daño oxidativo y distintas características de la población	96
4.5.2.1. Edad de las madres	96
4.5.2.2. Índice de masa corporal (<i>pre</i> -IMC)	97
4.5.2.3. Exposición al tabaco	98
4.5.2.4. Otros factores de confusión	100
4.5.3. Capacidad de reparación y distintas características de la población	103
4.6. Modelos generales de regresión lineal múltiple	104
4.7. Asociaciones entre características de las madres y los contaminantes ingeridos a través de la dieta	109
5. DISCUSIÓN	123
5.1. El ensayo del cometa: biomarcador de exposición transplacentaria	123
5.2. Factores de confusión	127
5.2.1. La edad	128
5.2.2. El índice de masa corporal	129
5.2.3. Exposición al tabaco	131
5.2.4. El alcohol	133
5.2.5. Características del recién nacido	134
5.3. Los patrones dietéticos en la investigación epidemiológica	138
5.4. Asociaciones entre daño y exposición a contaminantes a través de la dieta	142
5.5. La dieta y su papel modulador del daño genético	145
6. CONCLUSIONES	149

7. BIBLIOGRAFÍA.....	151
8. ANEXOS.....	187

Anexo 1: Cuestionario general

Anexo 2: Cuestionario de Frecuencia Alimentaria CFA

Anexo 3: Protocolo para la extracción de muestras de sangre de cordón umbilical y sangre materna

ABREVIATURAS

ALL	<i>Acute lymphoblastic leukemia</i> , Leucemia linfoblastoide aguda
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i> , Leucemia mieloide aguda
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> , Hidrocarburos aromáticos policíclicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
HPRT	<i>Hypoxanthineguanine phosphoribosyltransferase</i> , Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
BPN	Bajo peso al nacer
RCIU	Retraso del crecimiento intrauterino
PP	Parto prematuro
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i> , Fondo de Naciones Unidas para la Infancia
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i> , Gonadotropina coriónica humana
HPL	<i>Human placental lactogen</i> , Lactógeno placentario humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
EROs	Especies reactivas de oxígeno
BER	<i>Base excision repair</i> , Reparación por escisión de bases
MMR	<i>Mismatch repair</i> , Reparación de falsos apareamientos
HR	<i>Homologous repair</i> , Reparación homóloga
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> , Reparación por escisión de nucleótidos
TLS	<i>Translesion synthesis</i> , Síntesis translesión
NHEJ	<i>Non- Homologous end joining repair</i> , Recombinación no homóloga
FPG	Formamidopirimidina glicosilasa
ENDOIII	Endonucleasa III
CCAH	Comité Científico de Alimentación Humana
SCE	<i>Sister chromatid exchange</i> , Intercambio entre cromátidas hermanas
DON	Deoxinivalenol
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> , Acido docosahexaenoico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Cromatografía líquida de alta eficacia
IC	Intervalo de confianza
NMA	<i>Normal melting agarose</i> , Agarosa de punto de fusión normal
LMA	<i>Low melting agarose</i> , Agarosa de bajo punto de fusión
PEG	Pequeño para la edad gestacional

Rs	Coeficiente de correlación de Spearman
NEWGENERIS	<i>Newborns and Genotoxic Exposure risk</i>
IMC	Índice de masa corporal
VD	<i>Vaginal delivery</i> , Parto natural
CS	<i>Cesarean section</i> , Cesárea
ETS	<i>Environmental tobacco smoke</i> , Exposición ambiental al tabaco
CREAL	Centre de Recerca en Epidemiologia Ambiental
INMA	Infancia y Medio Ambiente
CFA	Cuestionario de frecuencia alimentaria
CYPs	Citocromo P450
ECV	Enfermedades cardiovasculares
GTS	<i>Glutathione S- transferase</i> , Glutathion S-transferasas
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i> , Fondo Mundial de Investigación del Cáncer
AA	Acrilamida
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> , Polimorfismo de un único nucleótido
HCs	Heterocyclic amines, Aminas heterocíclicas
GC-MS	<i>Gas chromatography – Mass spectrometry</i> , Espectrometría de masas- Cromatografía de gases

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Es indudable que actualmente, y a escala mundial, la gente vive más y tiene un estado de salud mejor que hace siglos o incluso decenios. Así, se ha conseguido lograr una mejora de la calidad de vida y una significativa reducción de la incidencia de enfermedades, al igual que la mortalidad asociada a agentes infecciosos. Sin embargo, el desarrollo socio-económico, especialmente en los países desarrollados, con avances espectaculares en la mejora de la calidad de vida, se ha llevado a cabo a partir de un sistema industrial productivo donde resulta inevitable la producción masiva y la utilización de sustancias que pueden suponer un riesgo potencial para la salud del hombre y la integridad del medio ambiente.

De esta forma, el ser humano está continuamente expuesto a una multitud de contaminantes tóxicos como pueden ser los metales pesados, el arsénico, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y las dioxinas, entre otros. Tales exposiciones ocurren en general cuando estos compuestos están presentes en el aire, agua o alimentos ingeridos, así como en una multitud de productos que entran en contacto con el hombre cada día. Por lo tanto, el estilo de vida para muchos individuos se ha convertido en la principal causa de algunos de sus desórdenes crónicos, aunque para algunos de estos desórdenes sus causas concretas aún no están completamente determinadas.

Con el objetivo de comprobar y valorar los efectos de los contaminantes ambientales sobre la salud se han diseñado muchos sistemas experimentales *in vivo* o *in vitro*, para demostrar si determinados contaminantes poseen propiedades mutagénicas y/o cancerígenas, interactuando peligrosamente con moléculas vitales para la integridad del material genético. Estos agentes con potencialidad genotóxica contribuyen de manera significativa a la causalidad de una tasa importante de enfermedades y quizás a la mayoría de cánceres humanos.

Según la propuesta del marco de causalidad, cada vez hay más pruebas demostrando que ciertos contaminantes ambientales intervienen en la ocurrencia de estas enfermedades de base genética (Montesano y Hall, 2001; Bhatnagar y Deutsch, 2006).

Como ejemplos probados del riesgo que puede suponer la exposición a los contaminantes ambientales presentes en el aire, se estima que a nivel mundial entre el 20 y el 30% de las enfermedades respiratorias parecen ser causadas por la contaminación del aire con materia particulada (PM) (Díaz-Sánchez *et al.*, 1997). Asimismo, el consumo de aguas contaminadas con arsénico pone en riesgo a millones de personas en el mundo por el hecho de que la exposición crónica al mismo se ha relacionado con muchos cánceres y desórdenes cardiovasculares (Tapio y Groshe, 2006).

Además de este tipo de contaminantes, hay que destacar que la presión para conseguir una mayor producción de alimentos, debido al incremento de población, puede suponer la contaminación de los productos alimentarios, ya sea en origen o durante el proceso de manipulación y manufacturación. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que la dieta es la principal fuente de exposición a agentes ambientales y que el 35% de los tumores están relacionados con la alimentación (Doll y Peto, 1981; Popkin, 2007). Así, se considera que la dieta es la segunda causa prevenible de cáncer, después del tabaco.

El establecer asociaciones entre exposición a los agentes ambientales y la presencia de enfermedades y sus etiologías supone grandes desafíos, tanto para los epidemiólogos como para los toxicólogos. Esto es particularmente evidente en los casos de interacciones complejas y cuando hay largos períodos de latencia entre la exposición y la enfermedad.

Históricamente, los estudios de riesgo sobre exposiciones a contaminantes se han desarrollado en relación con la salud de aquellos trabajadores que llevan a cabo su labor en condiciones que implican exposiciones a agentes físicos o químicos potencialmente nocivos. Sin duda, estos estudios han permitido mejorar las condiciones laborales y reducir el riesgo de las exposiciones ocupacionales. Sin embargo, esta preocupación sobre los riesgos presentes en el marco laboral se ha trasladado al estudio del papel de los contaminantes presentes en el medio ambiente. Para ello, se han llevado a cabo un gran número de estudios dirigidos a mejorar el conocimiento actual sobre los niveles de exposición a los contaminantes ambientales y sus efectos sobre la salud humana.

A pesar de que los niveles ambientales de los contaminantes son generalmente mucho más bajos que los que se encuentran en determinados ambientes, como por ejemplo en el medio laboral, su impacto en la salud, puede ser muy relevante desde una perspectiva de salud pública, ya que la exposición puede afectar a la población general durante largos periodos de tiempo (Aragonés *et al.*, 2008). Es por esto, que las normas de salud ambiental suelen ser mucho más estrictas que las de salud laboral, ya que la comunidad general comprende grupos mucho más sensible y vulnerables como pueden ser los niños pequeños y las mujeres embarazadas. Estos grupos especialmente vulnerables están suponiendo cambios en el marco de trabajo conceptual ya que se requiere recolectar nueva información que permita la caracterización de los riesgos que puedan suponer para el organismo la exposición durante el desarrollo (desde la concepción hasta la maduración de los órganos).

Este tipo de estudios son muy importantes, para casos como la exposición a nuevos medicamentos y ha supuesto la aparición de medidas de prevención de aquellos riesgos que pueden afectar a los niños y al resultado del embarazo.

Las nuevas herramientas de las que nos hemos dotado para la detección de las exposiciones ambientales y el análisis del papel de los factores genéticos sobre el riesgo de las exposiciones ambientales ofrecen nuevos enfoques para explicar la etiología de muchos fallos en la reproducción humana. Los resultados epidemiológicos sobre la relación entre el crecimiento prenatal y el riesgo de tipos específicos de cáncer y enfermedades metabólicas y cardiovasculares sugieren que el ambiente durante la etapa temprana de la vida es un componente causal de la etiología de estas enfermedades.

1.1. Riesgos de exposición medioambiental en niños

Durante los últimos años, ha habido un aumento en el número de nacimientos portadores de anomalías congénitas, así como con desórdenes del comportamiento y del desarrollo, que pueden afectar las capacidades cognitivas del niño. Así, por ejemplo, en los Estados Unidos, aproximadamente unos 3250 niños menores de 20 años se diagnostican cada año como portadores de leucemia linfoblástoide aguda (ALL) (Jensen *et al.*, 2004). Consecuentemente, es necesario

dotarnos de herramientas para llevar a cabo análisis sistemáticos sobre la susceptibilidad de los niños en las evaluaciones de riesgo.

Se conoce que las exposiciones en la fase temprana de la vida son un determinante importante en el riesgo a padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares y es evidente que las exposiciones durante el período prenatal tienen implicaciones importantes sobre el resultado del embarazo, así como sobre la salud del recién nacido y la mortalidad perinatal, incidiendo en lo que ocurra más adelante en su vida a nivel de ciertas enfermedades como asma, alergias, retraso en el desarrollo neurológico, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer, etc.

Los niños son más vulnerables a los riesgos asociados con los contaminantes ambientales, dado que son organismos en desarrollo. Así, la exposición a tóxicos ambientales puede causar efectos irreversibles, que no siempre ocurren en adultos ya que son organismos maduros, más resistentes, capaces de identificar y eliminar tóxicos de sus cuerpos.

Los recién nacidos (prematuros y a término) durante sus primeros meses de vida se consideran como un grupo de individuos diferentes del grupo de los adultos (Daston *et al.*, 2004; Perera, 2011). Esta diferencia puede ser debida a la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica que se observa en la edad temprana, lo que lleva a mayores concentraciones de compuestos en el sistema nervioso central de los niños y un menor contenido de lípidos, lo que causaría una menor capacidad de almacenamiento y retención de los productos lipofílicos y una menor unión a proteínas plasmáticas, que podría acentuar su toxicidad debido a un mayor porcentaje de compuestos libres en la circulación, tal como se ha comprobado para algunos fármacos, como la lidocaína y el cisplatino, entre otros (Kakiuchi *et al.*, 1999).

Según Ginsberg *et al.* (2002), tanto los datos *in vitro* (sobre niveles de enzimas y su función) como los datos *in vivo* (sobre estudios de farmacocinética) muestran que los niños, sobre todo en los primeros 2 meses de vida, son inmaduros con respecto a la depuración metabólica y renal. Esto parece ser un hallazgo consistente en una serie de vías metabólicas, medidas por enzimas como

diversas CYPs (tales como CYP1A2 y CYP2E1, que son especialmente importantes en la activación de sustancias xenobióticas), las involucradas en la glucuronización, así como las esterasas del suero y las epóxido hidrolasas, y quizás también las GSTs. Esto se confirma porque existen formas fetales de algunas enzimas (por ejemplo, CYP3A7, GST-pi), que parecen tener un rango diferente de especificidad respecto a las formas adultas.

1.2. Riesgos de exposición medioambiental prenatal

Partiendo del postulado de que los niños nacen en un mundo químicamente contaminado, éstos están también expuestos durante el estado prenatal donde son aún más inmaduros y sensibles. Según los datos existentes, el niño en estado prenatal no está completamente protegido por la placenta, dado que la mayoría de los productos químicos pueden atravesarla, aunque las tasas pueden variar dependiendo del tamaño molecular, lipofilicidad y unión a proteínas séricas (Ginsberg *et al.*, 2002).

Por otra parte, el transporte placentario de los productos químicos de la madre al feto, y la partición de los productos químicos de la sangre materna a la leche materna son dos fenómenos adicionales a las exposiciones que pueden ocurrir durante los primeros años de vida.

Aunque existe una profunda preocupación sobre los posibles riesgos genéticos en los recién nacidos, debido a la exposición de las madres a agentes mutagénicos durante el embarazo, los estudios existentes en este campo son escasos. Si bien el metabolismo materno y la protección de la placenta pueden conducir a concentraciones más bajas en el feto, en comparación con las que ocurren en la madre, el riesgo de la exposición fetal debe ser considerado cuando se produce exposición materna.

Por lo tanto, la evaluación del riesgo de una exposición tiene que ser evaluada con la perspectiva del ciclo de vida, empezando desde el período prenatal y, si es posible, desde la época de la concepción, y seguirse hasta el nacimiento y más adelante, llegando incluso hasta la vida adulta (Polanska *et al.*, 2009).

En general, y como sucede en adultos, parece que algunos recién nacidos pueden ser más susceptibles que otros y, por tanto, un enfoque individualizado podría identificar a estos subgrupos susceptibles. Aunque hay pocos estudios que hayan examinado por ejemplo los efectos genotóxicos del tabaquismo materno sobre el feto y sus implicaciones sobre la salud futura, la existencia de nuevas metodologías y nuevas herramientas especialmente los métodos genómicos y la creación de biobancos, ofrecen esperanzas de obtener respuestas adecuadas sobre estos riesgos.

1.3. Asociación entre exposición prenatal y enfermedades en la niñez

Los resultados de diversos estudios han demostrado que tanto en animales como en recién nacidos humanos las exposiciones maternas no tan sólo pueden generar defectos de nacimiento, sino que pueden generar problemas de salud y de conducta en etapas de desarrollo posteriores (Crinnion, 2009).

En la revisión de Godschalk y Kleinjans, (2008), se concluye que los niveles de cotinina en el plasma y la frecuencia de mutación en el gen de la hipoxantina fosforibosil transferasa (*HPRT*) se incrementan en la sangre del cordón umbilical de los niños nacidos de madres expuestas al tabaco. La exposición prenatal al humo del tabaco se ha asociado con distintas patologías como una disminución del crecimiento fetal y del funcionamiento cognitivo (Sexton *et al.*, 1990; Windham *et al.*, 1999; Rauh *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006) así como con una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos de la sangre del cordón umbilical (Orjuela *et al.*, 2010).

Estos estudios confirman que existe una relación entre la exposición transplacentaria a los PAHs y el daño genético, lo que puede potencialmente incrementar el riesgo de cáncer. Sin embargo, no se ha demostrado si existe un grupo de neonatos más susceptibles a los efectos adversos del tabaquismo.

Distintos estudios han tratado de encontrar asociaciones entre exposiciones maternas y riesgos neurológicos en sus hijos. En Europa Central y en los Estados Unidos se ha observado que la exposición transplacentaria a los PAHs está asociada con los resultados adversos del nacimiento (Barbieri *et al.*, 1986; Perera

et al., 1998; 2005; Dejmek *et al.*, 2000). En el estudio de Perera *et al.* (2006) se evaluaron los efectos de la exposición prenatal a los PAHs sobre el desarrollo del sistema nervioso y el desarrollo mental y psicomotor de los niños hasta los 36 meses de edad, confirmando que los niveles de PAHs encontrados en condiciones normales pueden afectar negativamente el desarrollo cognitivo de los niños. En otros estudios específicos, se ha determinado que la exposición al tabaco puede jugar un papel relevante en el tamaño del recién nacido, así como en la existencia de partos prematuros (Guldner *et al.*, 2007).

Este tipo de asociaciones también se han observado entre la exposición prenatal al pesticida clorpirifos y efectos sobre el desarrollo neurológico (Aldridge *et al.*, 2005); asimismo, el plomo y el mercurio han mostrado ser tóxicos para el desarrollo del feto (Grandjean, 1997; Canfield *et al.*, 2003). Por su parte, el alcohol, reconocido como el teratógeno más común en la fase fetal, se ha vinculado con la aparición de muchos cánceres durante la etapa adulta (faringe, laringe, esófago, hígado y testículo y, de forma menos consistente, con el cáncer de mama y el de colon-recto (Vardavas *et al.*, 2010).

El síndrome de alcoholismo fetal es un ejemplo de un desarrollo defectuoso de los niños expuestos en el útero al alcohol. Éste incluye un grupo de defectos congénitos físicos (dismorfología facial), mentales y neuro-comportamentales irreversibles incluyendo retardo mental, deficiencias en el crecimiento, trastornos de atención, daño al sistema nervioso y al corazón y otros problemas médicos de por vida (Jones y Smith, 1975; Kyllerman *et al.*, 1985; Sood *et al.*, 2001). Por lo tanto, el alcohol se considera como el teratógeno neuro-comportamental más común que se descompone mucho más lentamente en el cuerpo del niño que en un adulto; esto significa que el nivel de alcohol en la sangre del feto permanecerá elevado por más tiempo que en la madre, y podría actuar como un co-carcinógeno, no directamente sino a través de su metabolito el acetaldehído.

Otras evidencias epidemiológicas también sugieren que la exposición materna a las partículas en suspensión de dióxido de sulfuro y de óxidos de nitrógeno se correlacionan con varios resultados perinatales adversos (Bobak, 2000; Dejmek *et al.* 2000; Chen *et al.*, 2002; Salam *et al.*, 2005).

Estudios sobre las vías mecanicistas y los resultados perinatales adversos deberían considerar la posibilidad de que la respuesta biológica y los resultados adversos del embarazo, como bajo peso al nacer (BPN), retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) y parto prematuro (PP) pueden resultar tanto de exposiciones directas o indirectas (por ejemplo, la nutrición). El bajo peso al nacer afecta a 20 millones de niños en todo el mundo (*United Nations Children's Fund 2006 UNICEF*). Éste es el resultante de dos causas superpuestas: parto prematuro y retraso del crecimiento intrauterino. El bajo peso al nacer, el RCIU y el PP están asociados significativamente con la mortalidad infantil y con una serie de parámetros de morbilidad infantil que van desde alteraciones pulmonares a defectos neurológicos (Martin *et al.*, 2011). Estas asociaciones constituyen la base para el "origen fetal" o la hipótesis de Barker, que postula que "el retraso en el crecimiento fetal, como consecuencia de la desnutrición, tiene efectos estructurales y fisiológicos a largo plazo que predisponen a un individuo a enfermedades crónicas en la edad adulta (Barker y Clarck, 1997).

Hay que señalar que los efectos de las exposiciones endógenas/exógenas a agentes genotóxicos, pueden verse modulados por la nutrición durante la fase de embarazo. Así, una nutrición óptima facilita el establecimiento de un epigenotipo, que se expresa como un fenotipo saludable, mientras que todo tipo de restricción nutricional puede dar lugar a una regulación epigenética de genes asociados con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y síndromes metabólicos (Burdge *et al.*, 2009). La nutrición influye sobre las vías biológicas y puede modificar el impacto de la exposición sobre los efectos perinatales (Kannan *et al.*, 2006; 2007). Como se muestra en la Figura 1, se propone que la nutrición materna podría agravar o reprimir la asociación entre los resultados del nacimiento y la exposición.

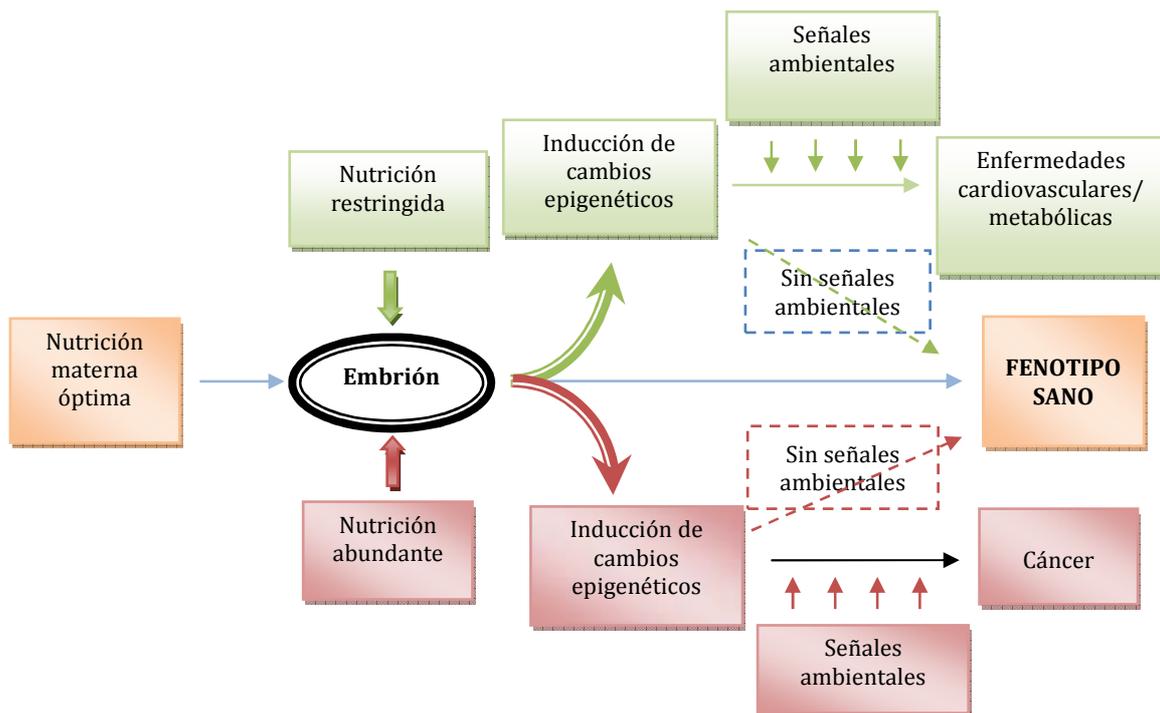


Figura 1. Un modelo sobre la inducción de un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas o cáncer en niños por diferentes exposiciones que actúan sobre el mismo genoma durante el desarrollo (Burdge *et al.*, 2009).

1.4. Períodos críticos y de vulnerabilidad durante el desarrollo fetal

Existen evidencias de que el tiempo que va desde el momento de la concepción al nacimiento es uno de los períodos más vulnerable de nuestra vida, durante el cual el ambiente tiene un inmediato y duradero efecto sobre la salud (Grandjean y Heindel, 2008). Como resulta lógico, cuanto más inmaduro es el resultado de la concepción, más sensible resulta a los posibles agentes nocivos.

Los mecanismos inductores de lesiones embrio-fetal son múltiples, produciendo modificaciones sobre el material hereditario, y alterando el crecimiento de los tejidos, y/o la morfogénesis normal. Por su parte, la expresión del potencial teratogénico de una exposición puede depender de factores como: la dosis recibida, el período del embarazo durante la exposición, así como la interacción con otros factores ambientales y la susceptibilidad individual de la madre y del feto. Durante el desarrollo embrionario, las células de éste se multiplican y comienzan a ocuparse de sus funciones específicas conduciendo a los

diversos tipos de células que conforman un ser humano (como las células sanguíneas, renales y nerviosas).

Es durante este proceso crítico de diferenciación donde las principales características externas del niño comienzan a tomar forma (la mayor parte del primer trimestre) y es éste el periodo más susceptible a los daños.

Como ejemplo de los factores que pueden interferir con su desarrollo normal, cabe destacar el alcohol, así como ciertos medicamentos y estimulantes que causan anomalías congénitas, ciertos contaminantes medioambientales que atraviesan la placenta, ciertas infecciones como las que causan la rubéola, así como deficiencias nutricionales y radiografías o radioterapia. En la Figura 2, se resumen las principales ventanas de vulnerabilidad del feto.

En los años 50, el uso de la talidomida para el tratamiento del mieloma múltiple y como un sedante ha dado lugar a numerosos niños sin extremidades. Una década más tarde, las jóvenes mujeres que nacieron de madres que habían tomado dietilestilbestrol (DES) durante el embarazo, desarrollaron un carcinoma de vagina (Crinnion, 2009). Mientras la talidomida causa defectos en el nacimiento, el DES llevó a problemas de salud en la edad adulta de las niñas, lo que confirma que la exposición a productos químicos durante la etapa fetal puede afectar dramáticamente la salud y la calidad de vida de los niños resultantes.

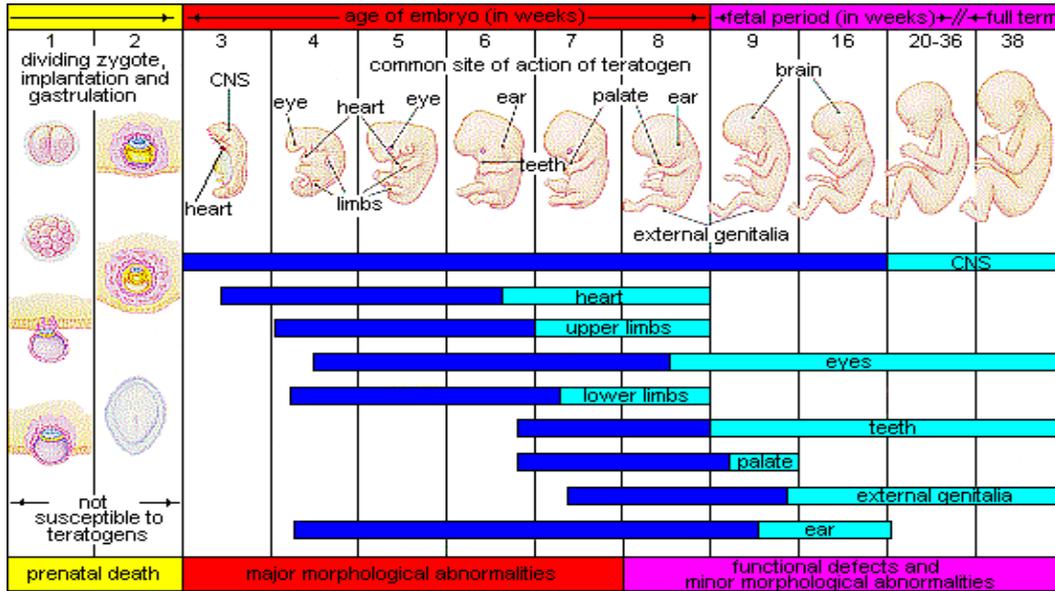


Figura 2. Ventanas de vulnerabilidad durante el desarrollo fetal humano. La barra oscura indica las etapas de mayor sensibilidad (Moore y Persaud, 2007).

1.5. Papel de la circulación transplacentaria

Durante mucho tiempo se pensó que las circulaciones sanguíneas del feto y de la madre estaban en comunicación. Sin embargo, los fisiólogos han demostrado que existe una independencia absoluta entre las dos circulaciones y han definido el papel de la placenta como el de un filtro especializado situado entre la madre y el feto (Figura 3). La placenta es el órgano que se desarrolla durante el embarazo y que sirve para “conectar” a la madre con el futuro bebé, atendiendo a las necesidades de respiración, nutrición y excreción del feto durante su desarrollo.

La placenta humana se compone de 10 a 40 cotiledones. El intercambio entre las circulaciones de la madre y del feto se desarrolla en la vellosidad coriónica, que es la unidad funcional de la placenta humana. Las vellosidades consisten en un capilar central del feto, estroma y una capa externa del trofoblasto. Las células trofoblásticas están presentes como células mononucleares llamadas citrofoblastos y células multinucleadas llamadas sincitiotrofoblastos (Enders y Blankenship, 1999). En contraste con lo que sucede en la mayoría de otros tejidos, el endotelio de los vasos placentarios fetales no contiene fenestraciones (Enders y

Blankenship, 1999). Al final del embarazo, la distancia mínima de difusión materno-fetal es de aproximadamente unas 4 μm (Kaufmann, 1985).

Aunque la placenta se comporta como un excelente filtro que impide el paso de sustancias nocivas, parásitos, virus y bacterias que pudiesen afectar al feto, eso no implica una protección completa, ya que algunas sustancias y/o patógenos pueden atravesarla y causar daños significativos al feto. Este órgano permite, además, la alimentación ininterrumpida del feto durante todo su desarrollo. Así, cuando las circulaciones materna y fetal se encuentran (separadas por la placenta), el feto extrae de la sangre materna todos los elementos que le son necesarios para su existencia: oxígeno, aminoácidos, ácidos grasos y glucosa. Asimismo, el feto transfiere a su madre los productos de desecho que se producen por su metabolismo y que no puede eliminar por sí sólo, dado que sus órganos son inmaduros y se encuentra en un claustro aislado del mundo exterior. De esta manera, se podría decir que la placenta permite al feto purificar su sangre utilizando los órganos maternos.

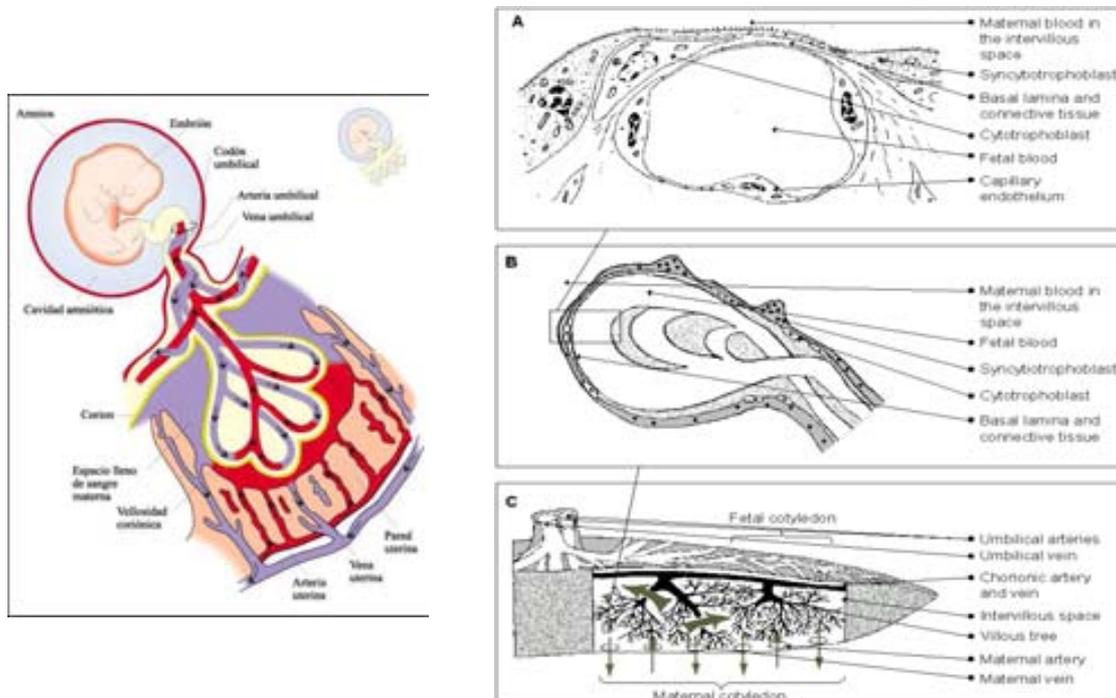


Figura 3. Embrión humano unido a la placenta por el cordón umbilical. (A) Presentación esquemática de las capas celulares que separan las circulaciones materna y fetal. (B) Estructura de las vellosidades terminales. (C) Representación esquemática del flujo sanguíneo en un cotiledón placentario humano. Las flechas indican el flujo de sangre materna (Ala-Kokko *et al.*, 2000).

Los intercambios que se realizan en la placenta afectan sobre todo al oxígeno, al dióxido de carbono, al agua, las sales minerales y a los alimentos. Estos intercambios, que no siempre operan en ambos sentidos, son selectivos. Por ejemplo, los iones (hierro, zinc, magnesio, cobre y yodo) y algunas vitaminas (vitamina B, vitamina C) atraviesan con facilidad la placenta; mientras que otras vitaminas (A, D, E, K) y los lípidos o grasas sólo pasan en pequeñas cantidades.

En lo que a funciones endocrinas se refiere, la placenta elabora dos tipos de hormonas, las hormonas polipeptídicas y las hormonas esteroides. Las hormonas polipeptídicas más importantes son la gonadotropina coriónica humana (hCG), que es una glicoproteína secretada por el sincitiotrofoblasto desde la formación del corion (a partir del día 5 ó 6 después de la fecundación) alcanzando su concentración máxima en el segundo mes (12^a semana) y que la madre elimina por la orina; y la lactógeno placentaria humana, que aparece en el plasma sanguíneo de la madre desde la tercera semana y cuyos efectos son los que permiten la permanencia del embarazo, modificando el metabolismo y las funciones fisiológicas maternas para la subsistencia del feto en crecimiento.

Entre las hormonas esteroides, cabe destacar la progesterona, que al principio es secretada por el cuerpo amarillo y a partir del segundo mes por la placenta, y cuya producción aumenta durante todo el embarazo; y los estrógenos, cuya producción también aumenta durante el embarazo. Es importante destacar la acción conjunta de las hormonas hipofisarias, ováricas y placentarias para el correcto desarrollo del embarazo. La placenta mantiene la homeostasis del feto mediante la realización de una amplia gama de funciones fisiológicas, que después del nacimiento se llevan a cabo por el riñón, el tracto gastrointestinal, los pulmones y las glándulas endocrinas del recién nacido (Jansson y Powell, 2007).

Al igual que el embrión, la placenta se encuentra en un estado constante de crecimiento y diferenciación durante toda la gestación, mostrando un aumento de 40 veces la proporción de peso del feto / placenta a las 6 semanas (Benirschke, 1990; Myatt, 2006), existiendo una clara relación entre la nutrición materna y el tamaño de la placenta. Así, por ejemplo, una dieta pobre en carbohidratos en los primeros meses del embarazo se ha mostrado que incrementa el peso de la

placenta, en particular si esta dieta se combina con una ingesta elevada de proteínas. Este ejemplo indica que las alteraciones en la nutrición pueden producir cambios en la fisiología y en el epigenotipo de la descendencia (Lillycrop *et al.*, 2005). Esto es debido a que, aunque el feto se nutre en parte de las sustancias nutritivas que contiene el líquido amniótico, su fuente principal de alimentos son aquellos elementos que transporta la sangre de la madre y que llegan por el cordón umbilical a través de la placenta.

La presencia de agentes xenobióticos en la madre hace que estos puedan atravesar la membrana y pasar al feto. El paso a través de la placenta de estos agente puede ser por difusión pasiva (Audus, 1999), aunque también se pueden dar otros mecanismos como la difusión facilitada, la difusión activa, la pinocitosis y la filtración (Reynolds y Knott, 1989; Pacifici y Nottoli, 1995).

1.6. Modelos para el estudio del metabolismo y de la transferencia placentaria

Dada la importancia que tiene la placenta para modular los niveles de exposición del feto, son muchos los estudios que han tratado de estudiar su permeabilidad y su fisiología, para poder estimar el riesgo que una exposición materna puede suponer para el feto. Existen distintas aproximaciones metodológicas para estudiar la transferencia placentaria de distintos tipos de agentes, entre ellas vamos a fijarnos en tres tipos de metodologías.

Estas metodologías suponen experimentaciones *ex vivo*, modelos *in vitro* con tejido de la placenta aisladas, así como células y fracciones subcelulares que pueden proporcionar información acerca de la toxicocinética y la transferencia a través de la placenta. Por lo tanto, las informaciones relevantes se refieren a la acumulación en la placenta, la captación celular, el metabolismo, el mecanismo del transporte, los reguladores y los factores que influyen en la transferencia placentaria de una exposición específica.

a. Métodos *in vitro* con tejidos de placenta humana

Los modelos *in vitro* para el estudio de la transferencia placentaria y el metabolismo incluyen cultivos de cortes de tejido, cultivos del tejido sincitiotrofoblasto, cultivos de células derivadas del trofoblasto, vesículas con

microvellosidades de la membrana, transportadores y receptores aislados y microsomas. Los microsomas de la placenta se preparan de manera y forma similar a los microsomas de otros tejidos y se han utilizado para estudiar el metabolismo de compuestos exógenos (Bourget *et al.*, 1995). Las células de trofoblastos aislados expresan múltiples transportadores, que permiten estudiar el metabolismo y el transporte de varias sustancias, así como las interacciones entre los xenobióticos y distintas sustancias naturales (Sastry, 1999; St-Pierre *et al.*, 2002). Sin embargo, en estas metodologías *in vitro* las células se extraen de su contexto normal y esto puede hacer que se altere su estructura y función (Ringler y Strauss, 1990).

Durante los últimos años, también se han podido clonar y expresar los distintos transportadores individuales a fin de estudiar la transferencia placentaria. De tal manera que factores tales como la especificidad de los substratos, la inhibición de la sensibilidad, la cinética de transporte y la regulación de las proteínas transportadoras pueden ser estudiadas por estos procedimientos. Sin embargo, hay que remarcar que todos estos modelos experimentales son artificiales y reflejan parcialmente la dinámica *in vivo* del equilibrio madre-placenta-feto.

b. Métodos *ex vivo*: perfusión placentaria

Los primeros experimentos de perfusión placentaria se hicieron a principios del siglo XX (Schmitt, 1922) y la técnica ha ido mejorando a lo largo del tiempo (Pienimäki, 1995a; 1997). El sistema de perfusión placentaria se ha utilizado ampliamente para estudiar el paso transplacentario de compuestos, tanto de origen endógeno como exógeno (Omarini *et al.*, 1992; Bourget *et al.*, 1995; Pienimäki *et al.*, 1995b; Ala-Kokko *et al.*, 2000). Hoy en día, existen algunas variaciones del sistema de perfusión de la placenta humana de un sólo cotiledón, separando las circulaciones materna y fetal (Mathiesen *et al.*, 2010).

La perfusión placentaria en humanos, se estableció mediante un sistema de recirculación, con la perfusión de ambas circulaciones materna y fetal de un sólo cotiledón aislado. Es una de las técnicas más útiles para estudiar la transferencia placentaria *ex vivo*, ya que imita las situaciones *in vivo* mejorando los modelos *in*

vitro, debido a que la estructura del tejido está intacta. Además de la transferencia, la perfusión placentaria permite al mismo tiempo la evaluación de una amplia gama de otras funciones (por ejemplo, el metabolismo de la placenta, la producción y la liberación de hormonas y enzimas, el transporte de nutrientes y los productos de desecho (Slikker y Miller, 1994).

La perfusión de la placenta humana ha permitido detectar que ésta es capaz de producir hormonas, tales como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y el lactógeno placentario humano (HPL) (Heikkilä *et al.*, 2002). Se han utilizado varias sustancias de referencia, como la antipirina, para probar la viabilidad y para normalizar los datos entre cada perfusión (Pienimäki, 1996; Ala-Kokko *et al.*, 2000). Sin embargo, las condiciones fisiológicas no son del todo posibles en un sistema de perfusión de órganos aislados, y la viabilidad del tejido es limitada. Además, la perfusión se realiza utilizando las placentas tras el parto por lo que es difícil la extrapolación de lo que sucede en períodos anteriores (Bourget *et al.*, 1995; Sastry, 1999).

La perfusión placentaria puede utilizarse para examinar la transferencia de sustancias tóxicas, sin preocupaciones éticas sobre la seguridad materna y fetal ya que ésta se recoge después del nacimiento. La placenta humana es relativamente accesible y las consideraciones éticas para los estudios *ex vivo* e *in vitro*, se limitan al consentimiento de la donación de tejidos. De otro modo su uso queda descartado.

c. Estudios clínicos y epidemiológicos

Los estudios clínicos de transferencia de sustancias químicas al feto son difíciles de llevar a cabo, tanto por razones éticas como técnicas, por lo que no se han podido llevar a cabo ensayos clínicos en mujeres embarazadas (Addis *et al.*, 2000).

Naturalmente, también es imposible estudiar el paso transplacentaria de agentes nocivos e incluso potencialmente dañinos *in vivo* para los seres humanos. La farmacocinética de los fármacos utilizados durante el embarazo puede estudiarse a partir de muestras de sangre materna y de sangre venosa umbilical

tomada después del nacimiento (Pacifci y Nottoli, 1995). Sin embargo, la información sobre los niveles del fármaco en la sangre umbilical y materna al nacer se obtiene a partir de mediciones de un solo punto, por lo que estos estudios clínicos no indican, por ejemplo ¿cuánto tiempo se necesita para lograr el equilibrio total entre la madre y el feto? Aunque se podría obtener información indirecta mediante la comparación de varios pacientes con diferentes intervalos entre el consumo de fármacos por la madre y el parto, estos estudios son escasos hasta la fecha.

La toma de muestras de suero fetal, así como de tejidos y también del fluido celómico y amniótico se ha utilizado para estudiar la transferencia de algunos fármacos durante la interrupción del embarazo legal (Shannon, 1998; Jauniaux y Gulbis, 2000). Aunque técnicamente es posible tomar muestras de la vena y de la arteria del cordón bajo control de ultrasonido durante el embarazo (Forestier *et al.*, 1984; Pons, 1991; Kramer *et al.*, 1995), tal muestreo ha de estar clínicamente indicado.

1.7. Biomonitorización humana

El mayor beneficio de la biomonitorización, comparando con el simple muestreo, con la estimación y la predicción, es que el biomonitoreo informa sobre que cantidad de un determinado agente químico ha entrado efectivamente, que proporción se mantiene en el cuerpo, y que efectos produce. Aunque la determinación de los agentes ambientales presentes en el aire o la cantidad de los mismos que se detecta en la piel puede ser informativa, tan sólo representan una aproximación de la cantidad real que pueden haber sido absorbida. En muchos casos, debido a la baja biodisponibilidad del compuesto, tal y como sucede con las dioxinas, es muy difícil predecir la cantidad que se puede absorber por vía dérmica o por ingestión, teniendo en cuenta también la variación en la biodisponibilidad de los agentes (Shu *et al.*, 1988).

La biomonitorización no es una herramienta nueva, ya que la determinación de sustancias químicas en fluidos corporales humanos se ha realizado durante décadas con el objetivo de asegurar una protección saludable a los trabajadores expuestos laboralmente. Estas mediciones se han llevado a cabo en una amplia

variedad de lugares de trabajo para proporcionar información sobre las exposiciones de los trabajadores a los productos químicos (DeCaprio, 1997). Así, ya a principios de 1800, se empezaron a determinar los metabolitos del ácido salicílico (salicilato sódico y ácido salicílico) en la orina de pacientes con fiebre reumática (Sexton *et al.*, 2004). Ulteriormente, como por ejemplo en 1890, ya se sometía a los trabajadores de una fábrica de plomo a mediciones de los niveles de plomo en sangre y orina, con el objeto de asegurar una protección saludable a los trabajadores expuestos laboralmente al plomo y prevenir los efectos generados por los niveles tóxicos (Tompsett *et al.*, 1935).

La medición de los niveles de plomo en sangre y de mercurio en orina de los trabajadores durante los años 1920 a 1940 alertó a los profesionales de la salud sobre los problemas particulares que existían en los distintos lugares de trabajo lo que, sin duda, salvó muchas vidas. Asimismo, en 1920 ya se medía como rutina el nivel de glóbulos blancos en los trabajadores expuestos a benceno (Yant *et al.*, 1936). De esta manera, a partir de los años 60, la realización de análisis de sangre y de orina de los trabajadores expuestos ha sido una práctica bien establecida, aunque sólo unos pocos de los miles de compuestos químicos frecuentemente encontrados en los lugares de trabajo se han evaluado, debido a la falta de técnicas analíticas adecuadas. Sin embargo, actualmente, con los avances en las metodologías de análisis químico, se han ido detectando múltiples agentes peligrosos para la salud de los trabajadores.

El desarrollo más reciente de los estudios de biomonitorización ha supuesto evaluar los niveles de exposición en la población general, debido a la existencia de contaminantes en el medio ambiente. Entre los estudios sobre exposición general, ha ido cobrando interés el entender y caracterizar la ingesta de docenas y docenas de diferentes compuestos que ingerimos diariamente en la dieta.

Los resultados de los diferentes estudios de biomonitoreo son de tanto en tanto incorporados en las denominadas Monografías sobre la Evaluación de los Riesgos Carcinogénicos en Humanos que son publicadas por la IARC en 2004 (International Agency for Research in Cancer). Estos estudios, iniciados en 1971,

constituyen una buena guía para las agencias reguladoras encargadas de velar por la salud pública en la toma de decisiones.

Así, los estudios de biomonitorización humana se están convirtiendo en una de las principales prioridades en temas de salud pública subrayándose la importancia de prestar especial atención a los niveles de contaminación y sus efectos en las poblaciones susceptibles, y más concretamente en las mujeres embarazadas y sus hijos. Con el uso de las metodologías clásicas y las nuevas herramientas de cuantificación, se están obteniendo resultados cada vez más relevantes en las estimas de riesgo genotóxico (Srám y Binková, 2000).

1.8. Biomarcadores

Los estudios de biomonitorización humana implican la utilización de técnicas moleculares, celulares o bioquímicas indicadoras y cuantificables de alteraciones en eventos fisiológicos, celulares, subcelulares y moleculares, que generalmente están involucrados en el desarrollo de una enfermedad específica (Albertini *et al.*, 1996). En general, estas medidas se conocen como biomarcadores que también se definen como cambios fisiológicos (en la actividad enzimática o en la presencia de un compuesto endógeno específico) y/o alteraciones y reordenaciones en el DNA, que pueden ser inducidas por una amplia variedad de factores (Wang *et al.*, 2001).

En sentido amplio, un biomarcador se podría definir, como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra (generalmente sangre u orina). También, hace referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico (Walker, 1998), más que la presencia de éste o de algún metabolito en el organismo. Sin embargo, es indudable que la medida del xenobiótico en un sistema biológico o muestra es un indicador biológico de exposición y, por tanto, debería ser considerado bajo este concepto. Silbergeld y Davis en 1994 hablan de biomarcadores para referirse a las señales fisiológicas inducidas por un xenobiótico que reflejan una exposición, una

respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas.

Si bien el uso de los biomarcadores fue evidenciado durante la década de los 80, en los últimos años éstos han retomado mayor interés, en relación al desarrollo de los análisis de riesgo ambiental. Su principal valor radica en evidenciar los efectos tempranos de una sustancia tóxica. Así, tras cincuenta años de estudios epidemiológicos, existe una larga serie de carcinógenos conocidos o sospechosos, así como otros cuyo papel es mucho más discutido, como ciertos factores dietéticos o la radiación no ionizante.

En la Figura 4 se muestra un modelo de clasificación de los distintos tipos de biomarcadores (Vineis y Perera, 2007).

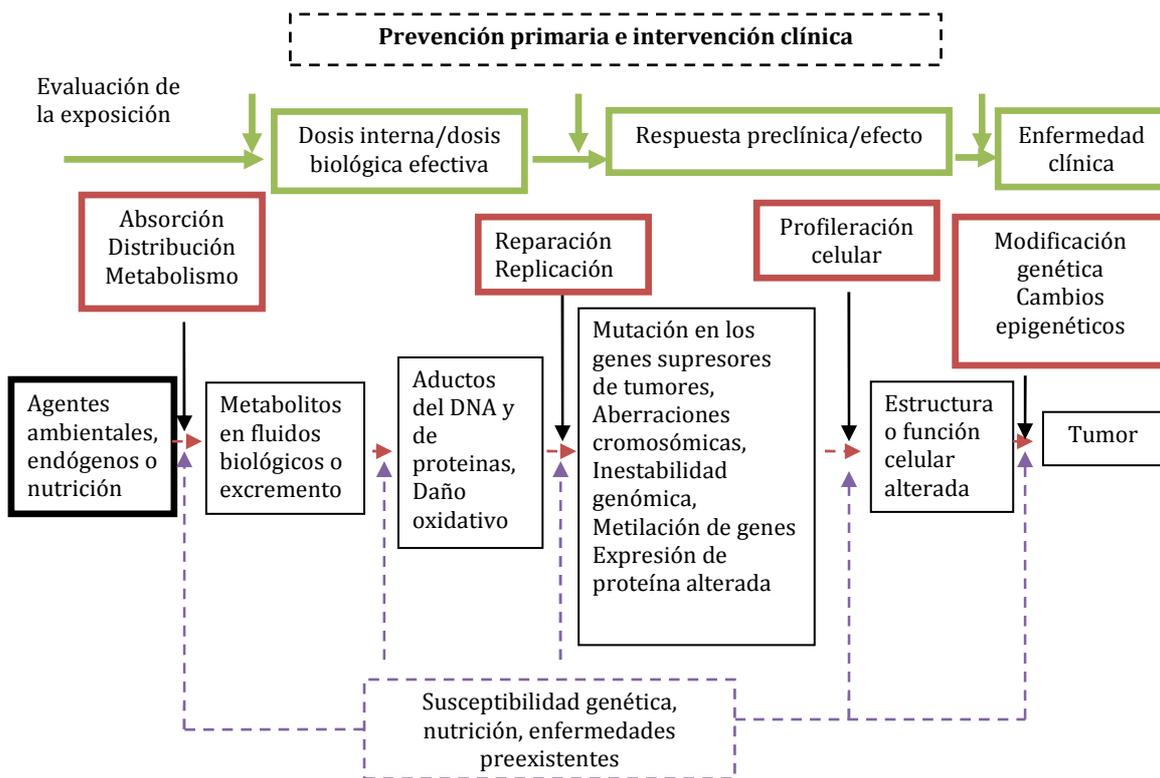


Figura 4. Modelo de clasificación de los biomarcadores (Vineis y Perera, 2007).

1.8.1. Biomarcadores de exposición

Estos suponen medir la presencia del agente en el medio, o bien medir la dosis interna o lo que generalmente es más difícil, medir la dosis biológicamente efectiva. Detectan si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo a diferentes niveles.

Si el compuesto ha penetrado y ha interactuado con el material genético (mutágenos/carcinógenos electrofílicos), se puede detectar por la aparición de aductos en proteínas y en DNA, así como por la formación de intercambios entre cromátidas hermanas, reflejando una exposición primaria. Frecuentemente, estas pruebas analíticas se realizan para medir el nivel de "plausibilidad biológica" para establecer relaciones entre una exposición determinada y la aparición de una patología. Ejemplos de ensayos analíticos para medir biomarcadores de exposición suponen la determinación de los niveles de plomo en el suero o del ácido mucónico en la orina para la exposición a benceno (Yu y Weisel, 1996), o muestras del aire exhalado para detectar el cloroformo (Weisel *et al.*, 1992). Los investigadores también a menudo tratan de relacionar la exposición ambiental externa con las dosis internas experimentadas por un individuo o por una población de interés.

Al variar la magnitud de la exposición, se puede tratar de obtener relaciones dosis-respuesta para el agente estudiado, lo que permite determinar evidencias de una relación causal. Un resultado positivo a este nivel no indica necesariamente consecuencias adversas, ya que parte del daño genotóxico primario puede ser reversible.

1.8.2. Biomarcadores de efecto

Los efectos pueden ser tanto tempranos (reversibles) como fijados (irreversibles). Los biomarcadores de respuesta temprana, reflejarían las primeras reacciones bioquímicas o modificaciones que preceden al daño estructural o funcional. Ejemplos de este tipo de biomarcadores de efectos tempranos incluyen los aductos en el DNA, la expresión alterada del RNA o la modificación de los niveles de proteínas transcritas (Vanden Heuvel *et al.*, 1993; Whyatt y Perera, 1995; Hemstreet *et al.*, 2000; Terasaka *et al.*, 2004; Keshava *et al.*, 2005).

El objetivo de estos estudios es que, mediante la identificación de estos biomarcadores característicos de efectos iniciales, uno puede evitar las manifestaciones tardías de la exposición, tales como ceguera en el caso de la toxicidad por el metanol (Sanaei-Zadeh *et al.*, 2011), o el daño hepático asociado con la exposición al tetracloruro de carbono. Aunque en algunos casos se puede sospechar que los biomarcadores de efecto están vinculados a un proceso de enfermedad en particular, su verdadero valor se basa en la fuerza de la evidencia de que están definitivamente asociados con la enfermedad y su progresión. Tradicionalmente, los biomarcadores de efecto han sido los más utilizados en los estudios de biomonitorización humana especialmente en el campo de la exposición ocupacional. Se han utilizado distintos biomarcadores de efecto tales como las aberraciones cromosómicas en poblaciones expuestas al arsénico (Mahata *et al.*, 2004), los micronúcleos (Hughes, 2006), las mutaciones puntuales en el gen *HPRT* (Harrington-Brock *et al.*, 1999), y las roturas en el DNA detectados con el ensayo del cometa (Mahata *et al.*, 2004), entre otros.

1.8.3. Biomarcadores de susceptibilidad

Estos biomarcadores persiguen explicar la diversidad de respuestas entre individuos igualmente expuestos. Estos se describen como los factores genéticos y constitucionales que pueden dar lugar a un mayor riesgo individual después de la exposición.

La determinación de la susceptibilidad supone el análisis genético directo, que asocia a polimorfismos genéticos específicos una mayor incidencia de la enfermedad en una población expuesta.

La existencia de un determinado polimorfismo genético puede modificar la cantidad y/o calidad de las enzimas involucradas en distintas funciones como la reparación del DNA o la detoxificación para ciertas clases de productos químicos. Estos estudios son muy útiles para caracterizar a las poblaciones de alto riesgo, ya sea por la exposición o por sus estados biológicos (mujeres embarazadas, diabéticos, inmunodeprimidos, así como ciertos grupos étnicos) (Einarsdóttir *et al.*, 2005).

En nuestro caso, los biomarcadores de efecto genotóxico, incluyen medidas sobre los daños en el DNA, tales como roturas del DNA y bases alteradas. Para ello, se ha utilizado como material biológico estándar los linfocitos de sangre periférica. Otros marcadores específicos lo constituyen los metabolitos de los agentes que dañan al DNA (o los productos de los daños del DNA en sí mismos) en la orina, las alteraciones cromosómicas, (incluyendo translocaciones, micronúcleos e intercambios entre cromátidas hermanas), así como, las mutaciones en genes marcadores, la reparación del DNA y la expresión diferencial de una variedad de enzimas, que participan tanto en la activación y detoxificación de los carcinógenos como en la reparación del DNA.

Por ejemplo, varios estudios han mostrado correlaciones entre los niveles de aductos del DNA o aductos en la hemoglobina y la exposición ambiental a agentes cancerígenos, como PAHs (Hemminki *et al.*, 1997), acrilamida (Hagmar *et al.*, 2005), estireno o 1,3-butadieno (Vodicka *et al.*, 2003), con una variación interindividual significativa en los niveles de aductos (Perera, 2000). Otros estudios confirman la capacidad de ciertos aductos del DNA (Tang *et al.*, 2006; Veglia *et al.*, 2008) y aberraciones cromosómicas (Bonassi *et al.*, 2004) para predecir el cáncer, mientras que otros han estudiado el papel de determinadas variantes genéticas (polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en la modulación del riesgo de cáncer, sobre todo en los sujetos expuestos a agentes cancerígenos (Vineis, 2004).

Así pues, en general, los diferentes tipos de biomarcadores son herramientas muy valiosas, que pueden formar parte de los estudios de epidemiología molecular para la caracterización de la relación entre la exposición ambiental y los efectos adversos sobre la salud.

1.9. Efectos genéticos de la exposición a los contaminantes ambientales

La exposición a diversos contaminantes ambientales ya sea por ingestión o por inhalación, se ha asociado con una amplia variedad de efectos adversos para la salud humana, existiendo muchas evidencias sobre la relación entre la exposición y la aparición de enfermedades vasculares y cáncer, entre otras. La genotoxicidad y carcinogenicidad de diferentes contaminantes clasificados por la IARC están

ampliamente descritos en la literatura; así, entre los mecanismos involucrados en los efectos genotóxicos y carcinogénicos, se incluye la capacidad de alterar procesos de señalización y reparación celular, producir cambios en el ciclo celular así como apoptosis y anomalías cromosómicas, destacando de manera específica el daño oxidativo. Éste tiene una relevancia particular en salud humana ya que juega un papel importante en la carcinogénesis y se ha asociado con la aparición de diversos cánceres y varias enfermedades crónicas (Evans *et al.*, 2004); además, son muchas las investigaciones que han utilizado el daño oxidativo en el DNA como biomarcador de efecto genotóxico.

1.9.1 El estrés oxidativo

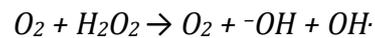
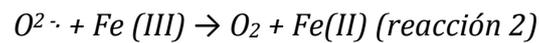
El estrés oxidativo es un tipo de estrés químico inducido por la presencia en un organismo vivo, de elevadas cantidades de compuestos peligrosos llamados radicales libres. Una perturbación entre la producción de radicales libres (prooxidantes) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (antioxidantes), con un desplazamiento a favor de los primeros, da lugar a cambios en las biomoléculas y, consecuentemente, a modificaciones funcionales en los lugares donde las mismas se encuentren en un momento dado. Dicha lesión oxidativa, se atribuye a los radicales libres, que se están produciendo constantemente en nuestras células y que además de causar daño oxidativo en el DNA, lo pueden hacer sobre otras moléculas como lípidos, proteínas y otros componentes celulares.

El daño oxidativo está implicado en los mecanismos patogénicos de muchas enfermedades, como la arterioesclerosis, la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer y también es importante en el proceso de envejecimiento. Se estima que en el hombre, la tasa total de formación de daño oxidativo en el DNA es del orden de unos pocos miles de eventos por célula y por día (Saul y Ames 1986; Loft y Polsen, 1996).

Las especies reactivas de oxígeno producidas en las células, en gran parte como subproductos de procesos metabólicos, amenazan constantemente la integridad y el correcto funcionamiento del DNA (Lindahl, 1993). Éstas pueden formarse de manera endógena como resultado del metabolismo de los

xenobióticos por el citocromo P450, por el ciclo redox de los metabolitos o por exposición a diversos factores ambientales (humo del tabaco, radiaciones ionizante, luz ultravioleta, dietas desequilibradas o pobres, dietas hipercalóricas e hipergrasas, ejercicio o trabajo extenuante (Hayes y Mclellan, 1999).

Entre las distintas especies reactivas de oxígeno (EROs), el radical $\cdot\text{OH}$ es la especie más reactiva. Su producción deriva sobre todo de la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por los iones férricos Fe^{2+} durante la reacción de Fenton, reacción que también se alimenta con la generación de iones ferrosos vía el ciclo de Haber-Weiss en presencia de hierro.



Estas especies (H_2O_2 u $\text{O}_2^{\cdot-}$) interactúan diferentemente con el DNA, dada su baja reactividad. Los radicales libres $\text{OH}\cdot$, los más reactivos, son capaces de oxidar las bases pero también de arrancar átomos del hidrógeno de los residuos osídicos, lo que genera roturas de las cadenas del DNA (Cadet *et al.*, 1997). Los mecanismos por los cuales se induce daño en el DNA después de una exposición a EROs han sido objeto de amplias revisiones; así, se han identificado más de 20 tipos de bases dañadas y algunas de ellas se muestran en la Figura 5.

Aunque el daño oxidativo se está generando continuamente, hay determinadas exposiciones y estados funcionales que supone incrementos en la génesis de daño oxidativo. Durante el estado de embarazo la producción de EROs aumenta de manera significativa, probablemente debido a un aumento del metabolismo celular y a la gran demanda de oxígeno (Walsh, 1994). Esto se ha confirmado en el estudio de Wasowicz *et al.* (2000) quienes detectaron niveles elevados de distintos marcadores de estrés oxidativo en mujeres embarazadas. Además, el periodo del parto puede ser un momento muy crítico para el recién

nacido que está sometido a un ataque considerablemente intenso de EROs producidos por la exposición brusca al oxígeno a presión atmosférica.

Sin embargo, otros autores proponen que la placenta y la madre puede proporcionar una protección suficiente, ya que encuentran que los biomarcadores de estrés oxidativo en el plasma del feto al nacer eran bajos, en comparación con los niveles registrados en sus madres en el momento del parto (Mihailović *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2008).

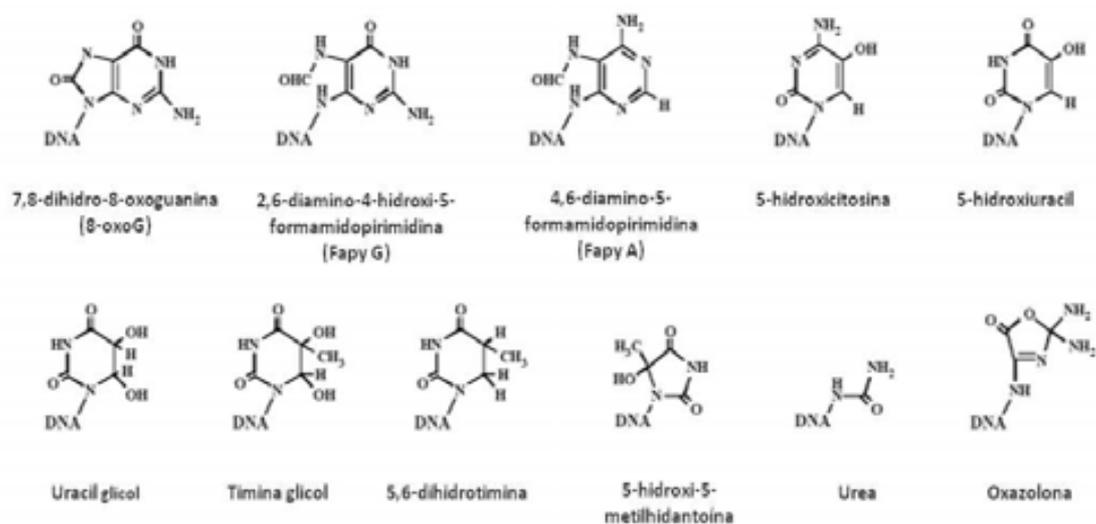


Figura 5. Bases del DNA con lesiones que actúan como sustrato para la formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG).

El daño más frecuente en las purinas es el 7,8-dihidro-8-oxoguanina, más comúnmente llamado 8-oxoguanina 8-oxoG, mientras que el daño más común en pirimidinas es la formación de glicol timina (Tg). En el caso de la 8-oxoG, el radical hidroxilo altamente reactivo reacciona primero con la guanina para formar C8-OH, a continuación la pérdida de un electrón (e^-) y un protón (H^+) genera la 8-oxoG. El C8-OH se puede reducir con la absorción de un electrón y un protón formando la 7-hidro-8-hidroxi-guanina que posteriormente se convierte en 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FaPy), que es el segundo principal producto de oxidación de la guanina (Figura 6). Por lo que respecta a la generación de

pirimidinas oxidadas, tal como el glicol de timina, también son el resultado de los ataques de los radicales libres. Así, en ausencia de oxígeno, la pérdida de un electrón seguida por la captación de agua y la pérdida de un protón genera el glicol de timina. También se generan análogos del uracilo a partir de la citosina después de una exposición a radiaciones o a EROs. Entre estos análogos se encuentran, el aloxan, el ácido isodialórico y el 5-hidroxiuracilo (5-OHU).

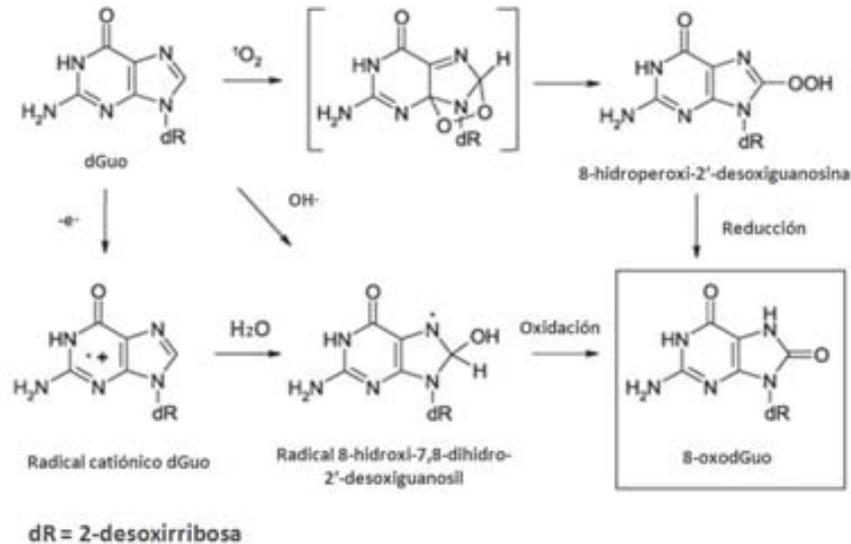


Figura 6. Reacciones de oxidación de la 2'-desoxiguanosina mediante el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), un electrón libre $-\text{e}^-$ y mediante el oxígeno singlete $^1\text{O}_2$, generando el principal producto de oxidación de bases con potencial mutagénico.

1.9.2. Mecanismos de reparación del daño genético

La capacidad de reparación del DNA es un importante determinante de la susceptibilidad al cáncer, ya que es un mecanismo de defensa que es esencial para mantener la integridad del genoma. Son diversos los estudios que han encontrado asociaciones entre una baja capacidad de reparación y el desarrollo del cáncer (McHugh *et al.*, 2001).

Dada la importancia de mantener la integridad del DNA, a lo largo del proceso evolutivo se ha ido generando un complejo sistema de reconocer alteraciones en la molécula de DNA y proceder a su reparación. Entre los distintos mecanismos de reparación del DNA, encontramos la reparación por escisión de

bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación de falsos apareamientos (MMR), la síntesis translesión (TLS), la reparación por recombinación homóloga (HR) y la reparación no homóloga por unión de extremos libres (NHEJ), como se indica en la Figura 7. Algunos de estos mecanismos de reparación son libres de error, mientras que otros son tendentes a introducir errores durante su proceso. Numerosos productos del daño oxidativo en las bases del DNA son citotóxicos y mutagénicos, sin embargo, las consecuencias biológicas de algunos de ellos están poco claras.

La evolución de muchas glicosilasas del DNA indica claramente la importancia de la eliminación de estas lesiones del DNA para el mantenimiento de la integridad genética.

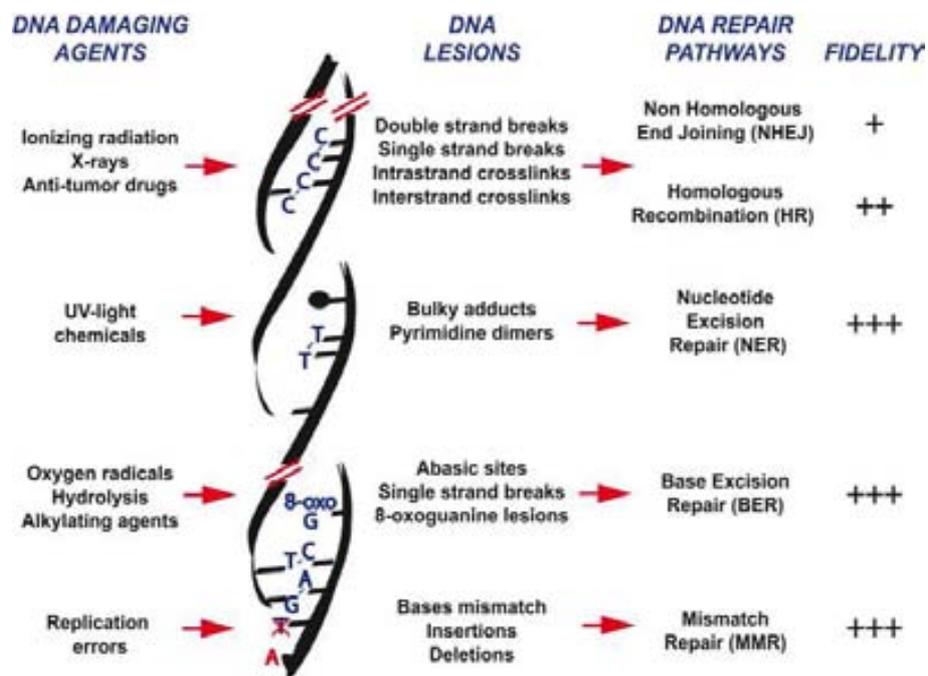


Figura 7. Principales vías de reparación del DNA en humanos (Blanpain *et al.*, 2011).

BER es la vía principal de reparación del daño oxidativo del DNA encontrándose una buena correlación entre la baja capacidad de reparar por este mecanismo y la oncogenesis (Bjelland y Seeberg, 2003; Caporaso, 2003). La reparación por escisión de bases supone la actuación de DNA glicosilasas en el

primer escalón del proceso de reparación. Estas enzimas eliminan las bases oxidadas del DNA por hidrólisis del puente glicosídico entre la base modificada y el resto del azúcar, generando un sitioapurínico / apirimidínico (AP) (Dizdaroglu, 2003). Las DNA N-glicosilasas monofuncionales utilizan la molécula de agua como nucleófilo para escindir el enlace N-glicosídico y generar un sitio abásico. Su única función es la creación del sitio abásico el cual será utilizado por otras enzimas complementarias. En las células de mamífero, una AP endonucleasa (apurínica, apirimidínica), APE 1 (también llamada HAP-1 o Ref-1) hidroliza entonces el enlace fosfodiéster en su extremo 5' del sitio abásico para crear un espacio vacío de un sólo nucleótido (Kubota *et al.*, 1996).

Las DNA N-glicosilasas bifuncionales / AP liasas, pueden generar un corte del esqueleto pentoso-fosfato después de la creación del sitio abásico. OGG1, Nth1 y Nei1 son, en los mamíferos, las únicas glicosilasas que disponen de una actividad AP liasas. La FPG, homóloga de la OGG1 en bacterias, se considera también como una glicosilasa bifuncional (Graves *et al.*, 1992). En la vía clásica del mecanismo BER, "reparación de remiendo corto", la polimerasa reintroduce el nucleótido que falta y la ligación se efectúa por la actividad de la ligasa III. La proteína XRCC1 (X Ray Cross Complementation Protein 1) se fija en el sitio dañado y potencializa sus diferentes actividades (Vidal *et al.*, 2001; Marsin *et al.*, 2003; Campalans *et al.*, 2005).

Entre las distintas DNA glicosilasas la 8-oxoG DNA glicosilasa (hOGG1) es una de las enzimas claves de reparación involucrada en la vía BER en humanos (Dizdaroglu, 2003; Smart *et al.*, 2006). Ésta es capaz de reconocer la 8-oxoG en el DNA nuclear y mitocondrial (Nakabeppu, 2001), que es uno de los más de 30 productos resultado del daño oxidativo en el DNA (Kassai, 1997). En la Tabla 1, se indica un listado de las glicosilasas existentes en los mamíferos.

La no reparación de la 8-oxodG, o su mala reparación puede causar mutaciones, y en especial transversiones del tipo G-T y A-C (Moriya, 1993). Asimismo, la pérdida del gen *hOGG1* se asocia con la acumulación de 8-oxodG y un aumento en el riesgo mutacional (Hansen y Kelley, 2000; El-Zein *et al.*, 2010). Dado que en bacterias la proteína FPG realiza funciones equivalentes a la hOGG1, ésta se

ha empleado en los estudios *in vitro* para la detección de daño oxidativo (Dusinská y Collins, 1996). Su nombre (formamidopirimidina DNA glicosilasa), se debe a su capacidad de reconocer anillos imidazol presentes en las purinas, o formamidopirimidinas (fapy A y fapy G). Sin embargo, su mayor y principal sustrato es la 8-oxoG (Boiteux, 1993). Aparte y junto a la proteína FPG de *E. coli*, la proteína Nth (Nth, endonucleasa III) ha sido una de las DNA glicosilasas más investigada desde su aislamiento. El gen Nth que codifica esta enzima se ha clonado y secuenciado, viéndose que está constituido por regiones con dos actividades N-glicosilasa y AP liasa, con 221 aminoácidos, un peso molecular de 24 kDa y un grupo 4Fe-4S.

Tabla 1. Principales glicosilasas del DNA en mamíferos (Slupphaug <i>et al.</i> , 2003)			
Nombre	Tamaño (aa)	Actividad liasa	Localización celular
hUNG1	304	No	Mitocondria
hUNG2	313	No	Núcleo
mUNG1	295	No	Mitocondria
mUNG2	306	No	Núcleo
hSMUG1	270	No	Núcleo
hTDG	410	No	-
hMRD4	580	No	-
hUDG2	327	No	-
hMPG	293	No	-
mOGG1 ^a	345	No	Núcleo (α)
hOGG2	424	Si	Mitocondria (β)
	345	Si	-
hNEIL1	391	Si	Núcleo
mNEIL1	-	Si	Núcleo
hNEIL2	333		Núcleo (+mitocondria?)
hMYH4 ^b	521		Mitocondria
	535	No	Núcleo
hNTH1	312 (304)	No	Núcleo (+mitocondria?)
mNTH1	300	Si	-
Nuevas putativas	606	Si	Núcleo
hNEIL3		No	Mitocondria
mTGG1			

h: humano, m: ratón, ^a trece alternativas demostradas para transcripciones de OGG1 y dos proteínas (α y β). ^b diez alternativas demostradas para transcripciones de hMYH.

En la revisión de Dizdaroglu (2003), se indica claramente la existencia de una amplia variabilidad en las especificidades del sustrato de numerosas DNA glicosilasas involucradas en BER, viéndose que la mayoría de los importante y

conocidos productos del daño oxidativo de las bases del DNA son sustratos de las DNA glicosilasas conocidas.

1.10. Ensayo del cometa como biomarcador del riesgo genotóxico

El ensayo del cometa fue descrito como un nuevo método para la detección del daño en el DNA a fines de los 80, aunque la detección del daño en el DNA en células embebidas en agarosa ya se había sido descrito tiempo atrás (Møller, 2005). El ensayo consiste en lisar las células previamente embebidas en un gel de agarosa, desnaturalizar el DNA a pH alto y hacerlo migrar mediante una electroforesis en estas mismas condiciones. Por último se realiza una tinción específica de DNA y el resultado se visualiza al microscopio de fluorescencia.

La base de este ensayo radica en que si el DNA contiene roturas, en las condiciones desnaturalizantes utilizadas en el ensayo, estas roturas van a traducirse en fragmentos o bucles de DNA relajados que van a migrar en un campo electroforético en función de su tamaño, y a una velocidad mayor que el resto del DNA genómico intacto. De esta forma, a partir de una célula que contiene roturas en su DNA, obtenemos una imagen similar a la de un cometa estelar, con una cabeza (DNA genómico intacto) y una cola (DNA fragmentado/relajado); de ahí el nombre del ensayo (Figura 8).

Hoy en día el ensayo del cometa se ha convertido en uno de los biomarcadores de efecto genotóxico más popular. Esto es debido a que es un método muy sensible, sencillo y rápido para examinar por microscopía de fluorescencia el daño inducido en el DNA así como la capacidad de reparación en células individuales. Esta técnica detecta varias formas de daño en el DNA, como roturas de hebra sencilla y doble, daño oxidativo en las bases y entrecruzamientos DNA-DNA y DNA-proteína y reparación en el DNA de cualquier célula eucariota.

El ensayo del cometa parece especialmente útil en los estudios de biomonitorización, permitiendo la caracterización del riesgo individual (Møller, 2006). Asimismo, puede ser útil para obtener información del efecto de la dieta, lo que permite su uso como biomarcador en estudios de nutrición (Collins, 1999).

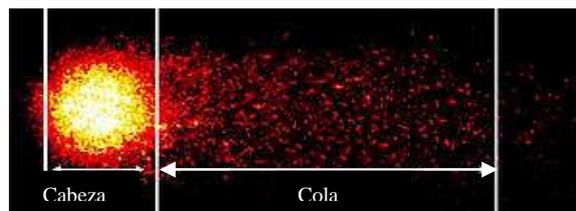


Figura 8. Imagen en la que se pueden diferenciar la cabeza y la cola de la célula tras realizar el ensayo del cometa, siendo la cola la parte representativa del daño.

El procedimiento fue descrito por primera vez por Östling y Johanson en 1984, quienes empleaban un pH de 10 o inferior y cuyos “cometas” tenían cierto parecido a los “halos” descritos anteriormente por Cook *et al.* (1976). Pocos años más tarde, y de forma independiente, dos grupos de investigadores, Singh *et al.* en 1988 y Olive *et al.* en 1990 incluyeron en los procedimientos los tratamientos a pH alto.

Singh *et al.* (1988) lisaban las células a un pH de 10 en NaCl 2,5 M, Triton X-100 y sarcosinato durante 1 hora, tras lo cual realizaban un tratamiento a pH alto (NaOH 0,3 M) y una electroforesis a pH superior a 13. Olive *et al.* (1990) simplemente lisaban las células en una solución ligeramente alcalina (NaOH 0,03 M) durante 1 hora antes de realizar la electroforesis. A partir de aquí llegaron a la conclusión de que la desnaturalización del DNA es esencial para poder detectar roturas; y se puso al ensayo del cometa en la misma categoría de los ensayos de desnaturalización alcalina, elución alcalina o sedimentación alcalina de azúcares. Sin embargo, algunos autores apuntan que el uso de las condiciones alcalinas hace que las colas de los cometas sean más pronunciadas, pero no aumentan la sensibilidad del ensayo (Collins, 2004).

La técnica se viene aplicando en distintas áreas de interés, como: toxicología genética, ensayos de reparación del DNA, ecotoxicología, nutrición y epidemiología, entre otros. Se han publicado múltiples trabajos en el campo de la toxicología genética en los que se observa que tanto el daño basal, como el inducido por distintos tipos de mutágenos, es significativamente mayor en individuos con algún tipo de neoplasia, como tumores de pulmón y vejiga, que en controles sanos,

confiriendo un mayor riesgo a desarrollar la neoplasia (Błasiak, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Schabath *et al.*, 2004; Gajecka *et al.*, 2005; Wynne *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008).

Detectar en la población general individuos que presenten una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer (debido a la presencia de alteraciones moleculares que les haga más sensibles a determinados carcinógenos o menos eficientes a la hora de reparar daños en su genoma o en el control del ciclo celular) es de vital importancia.

1.10.1. Ensayo del cometa en estudios de genotoxicidad

Aunque esencialmente es un método para detectar roturas en el DNA, el uso de endonucleasas específicas para diferentes tipos de lesiones, que convierta a éstas en roturas, hace que el ensayo sea más específico y más sensible. Así, tras la lisis, los nucleoides se digieren con enzimas que reconocen un tipo de daño y lo convierten en rotura.

Hasta el momento, se han llegado utilizar 4 endonucleasas capaces de detectar diferentes tipos de daño en el DNA: la endonucleasa III (Endo III) que reconoce bases pirimidinas oxidadas (Collins *et al.*, 1993), la formamidopirimidina glicosilasa (FPG), que reconoce el principal producto de la oxidación de las purinas, la 8-oxoguanina, así como otras bases purinas oxidadas (Dusinská y Collins, 1996), la enzima T4 endonucleasa V, que reconoce los dímeros de timina inducidos por la luz UV (Collins *et al.*, 1997) y por último, la enzima Alk A que reconoce las 3-metiladeninas (Collins *et al.*, 2001). Sin embargo, tan sólo EndoIII y FPG se utilizan de manera rutinaria. En la Figura 9, se puede ver como el ensayo del cometa se puede modificar para detectar daño específico en el DNA, particularmente daño oxidativo.

1.10.2. Ensayo del cometa en los estudios de reparación del DNA

Muchos estudios han utilizado el ensayo del cometa para estudiar la capacidad de reparación. El protocolo a seguir consiste en la incubación de células dañadas *in vitro* a diferentes intervalos y someterlas al ensayo del cometa para estimar la cantidad de daño remanente (Collins y Horváthová, 2001). Así, por

ejemplo, los linfocitos pueden tratarse con peróxido de hidrógeno o radiación ionizante y enseguida permitir que reparen; o bien permitir la eliminación de las lesiones en las bases mediante incubación con endonucleasas apropiadas. El proceso de reparación de las roturas del DNA es bastante conocido en muchos tipos de células, y se trata de un proceso rápido de pocos minutos de duración (Frankenber-Schwager, 1989), pudiéndose evaluar su cinética con el ensayo del cometa; sin embargo, los linfocitos aislados aparentemente reparan el daño producido por H₂O₂ lentamente, y es probable que se deba a la inducción de daño adicional por la repentina exposición al oxígeno atmosférico durante la incubación del proceso de reparación (Torbergesen y Collins, 2000).

La versión alcalina del ensayo del cometa detecta roturas de cadena simple (también doble) del DNA, pero las roturas de cadena simple no son las más interesantes, ya que son fácilmente reparadas y no se considera que sean lesiones significativamente letales o mutagénicas. Muchos agentes mutagénicos no introducen roturas directamente, pero pueden producir sitios AP los cuales son álcali-lábiles y probablemente convertidos en roturas mientras el DNA se somete a la electroforesis a un alto pH. Además, otras lesiones pueden estar presentes transitoriamente durante la reparación celular vía BER y, por lo tanto, un alto nivel de roturas puede indicar un alto nivel de daño o una reparación eficiente.

El proceso de reparación por escisión de bases mediante enzimas específicas, como por ejemplo FPG o EndoIII, que reconocen las purinas y pirimidinas oxidadas, respectivamente, es un proceso lento que requiere de unas cuantas horas (Collins y Horváthová, 2001). La reparación de los dímeros de pirimidina inducidos por la radiación UV, llevada a cabo mediante la reparación por escisión de nucleótidos NER, puede detectarse con la endonucleasa T4 V, y también es un proceso lento (Collins *et al.*, 1997).

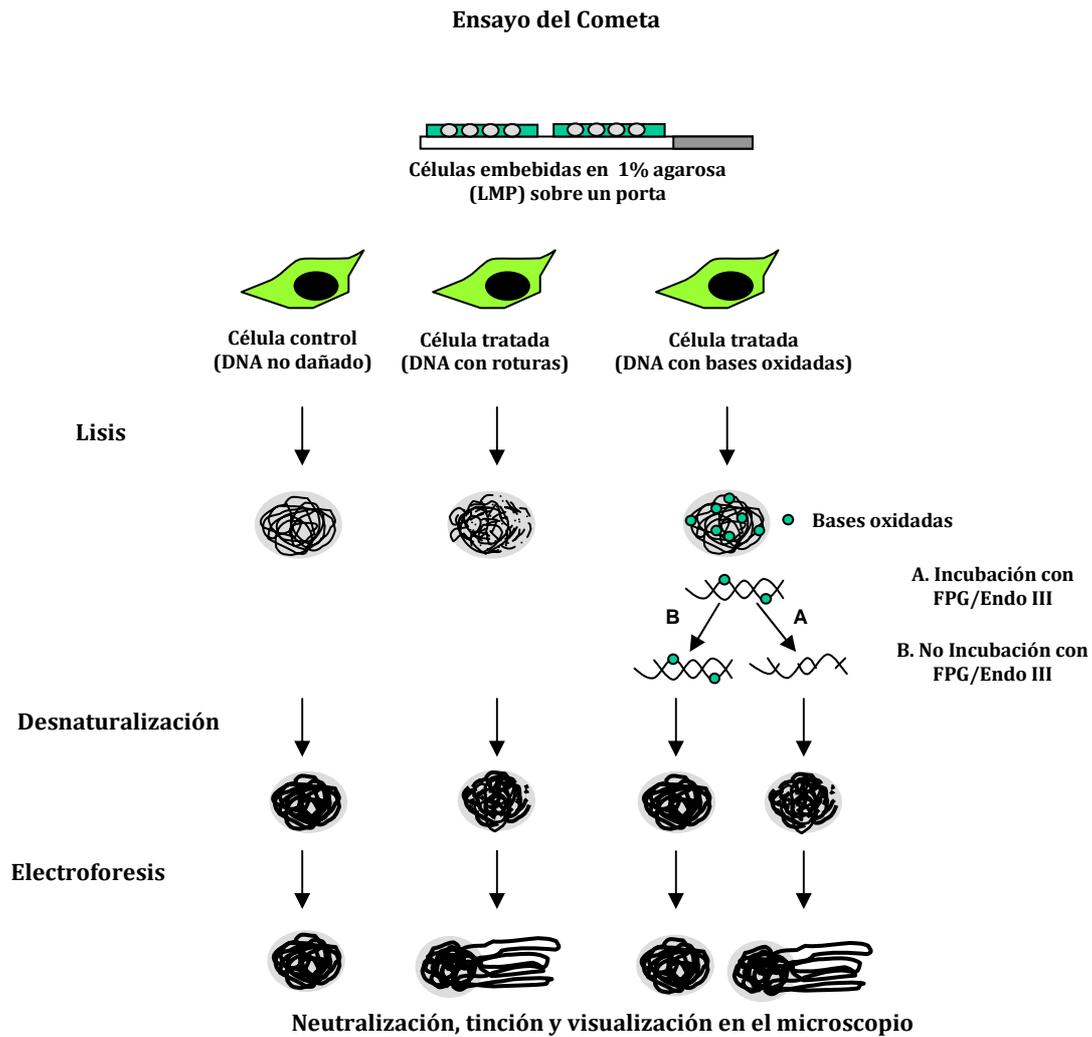


Figura 9. Representación esquemática del ensayo del cometa sin (A) y con (B) la incorporación de endonucleasas bacterianas que reconocen bases oxidadas en el DNA.

1.11. Cuestiones éticas relacionadas con la biomonitorización humana

El biomonitoreo es una herramienta de evaluación de la exposición muy útil para valorar el riesgo de las mismas. El uso de tejidos humanos para evaluar exposiciones medioambientales es más que un ejercicio de análisis y requiere la consideración de la utilidad e interpretación de los datos, así como la debida consideración de las cuestiones éticas. Estos dos aspectos están íntimamente vinculados (Sepai *et al.*, 2008). Según el taller organizado en 2006 en Copenhagen realizado por responsables académicos, responsables políticos, así como por organizaciones no gubernamentales, es necesario y oportuno la creación de un programa europeo armonizado de vigilancia biológica humana.

Los objetivos de este estudio propuesto deben ser transparentes y realistas con una buena estrategia para la interpretación de los datos del estudio que debe de desarrollarse. Este estudio debería incluir el desarrollo de una estrategia para integrar los datos de salud y los datos de monitoreo ambiental con los datos de biomonitoreo humano a nivel nacional e internacional. Los principios de la comunicación con los principales interesados son esenciales para lograr la máxima eficacia de la evolución de las políticas y facilitar el seguimiento posterior.

1.12. Nutrición y su papel modulador del daño genético

Durante los años 80, se llegó a afirmar que podría atribuirse a la dieta una gran parte de todos los tumores. Sin embargo, con los datos actuales, no es posible formular con precisión cuáles son los cánceres relacionados con la dieta y qué componentes son los responsables, porque los alimentos son mezclas muy complejas de nutrientes que incluyen aditivos y sustancias mal conocidas, y que puedan verse completamente alterados por los procesos de cocción y de conservación. De hecho, y por el gran aumento en la complejidad en la dieta consumida por los individuos, la dieta se considera como una sola exposición. Las investigaciones epidemiológicas han usado patrones dietéticos para resumir el consumo diario y para evaluar cómo la dieta se asocia con ciertas enfermedades (Hoffmann *et al.*, 2004; Slattery *et al.*, 2010).

Sin embargo, hay muchas cuestiones abiertas que planean sobre el uso e interpretación de los hábitos alimentarios. Estos temas incluyen la manera de recopilar, sintetizar y crear los hábitos alimentarios, y también la interpretación de los resultados.

Los resultados sobre la salud perinatal se sabe que están influenciados por una multitud de factores, incluyendo la nutrición y la salud, la genética y los factores de estrés fisiológico, así como las sustancias tóxicas del medio ambiente. En particular, la falta de atención a los factores de la nutrición para explicar muchas situaciones debe ser considerada. La nutrición puede ser a la vez un factor de confusión y un efecto modificador de las asociaciones entre la exposición y los efectos en la reproducción. Existen evidencias que señalan el importante papel que desempeña la nutrición, especialmente los micronutrientes, en la determinación de

resultados positivos en el embarazo (Block *et al.*, 2001) y en particular, el estrés gestacional es un fenómeno asociado con la malnutrición (Mardones-Santander *et al.*, 1999).

1.12.1. Exposición transplacentaria a contaminantes de la dieta

La ingesta de alimentos contaminados o procesados es la principal ruta de exposición y fuente de nitrosaminas, PAHs, acrilamida, micotoxinas y aminos heterocíclicas, entre otros compuestos (Jägerstad y Skog, 2005). Esta selección de compuestos (Tabla 2) es representativa de un amplio rango de factores dietéticos bajo investigación, debido a sus propiedades genotóxicas que pueden alterar la estructura, el contenido o la segregación cromosómica, al igual que sus propiedades inmunotóxicas. Estos compuestos están descritos en la literatura y clasificados según las Monografías del IRAC para ser investigados individualmente. De hecho, en nuestro trabajo, nos hemos fijado especialmente en investigar estos compuestos vía la dieta materna.

Respecto a las nitrosaminas, éstas constituyen una clase de compuestos químicos descritos en la literatura desde hace muchos años, pero no se les ha dado mucha importancia hasta los años 50. El descubrimiento de Magee y Barnes (1956) de que la dimetilnitrosamina produce tumores hepáticos en ratas durante una revisión de rutina de productos químicos que se estaban proponiendo para su uso como solvente (Magee y Barnes 1967), ha motivado que científicos de todo el mundo se hayan dedicado a investigar sus efectos cancerígenos, así como el de otros compuestos N-nitrosos. Aproximadamente 300 de estos compuestos ya han sido estudiados, y el 90% de ellos se han encontrado que poseen efectos carcinógenos en una amplia variedad de animales de experimentación. Desde entonces, cada vez es mayor el reconocimiento de la importancia de las nitrosaminas como posibles carcinógenos humanos, lo que ha estimulado una intensa investigación sobre los factores dietéticos protectores (García *et al.*, 2008). La mayoría de las nitrosaminas se ha demostrado que son cancerígenos transplacentarios; así, por ejemplo, la dimetilnitrosamina causa cáncer de hígado en animales de experimentación, mientras que algunas de las nitrosaminas específicas del tabaco causan cáncer de pulmón. Dado que las nitrosaminas son metabolizadas de la misma forma en los tejidos humanos y animales, parece muy

probable que los seres humanos son susceptibles a los efectos cancerígenos de las nitrosaminas.

Las nitrosaminas y muchos de sus derivados son cancerígenos y se originan en la reacción del óxido nitroso (NO) con las aminas secundarias y terciarias durante el curado de los productos cárnicos embutidos. Los pescados congelados y ahumados, así como las carnes curadas son alimentos especialmente ricos en nitrosaminas. Las N-nitrosaminas requieren activación metabólica para ejercer sus genotoxicidad, así, el NDBA y NPip son generalmente activados por el citocromo P450 (CYP) 2E1, 2A6 y 1A1 (Wong *et al.*, 2003).

A finales de 1970, la atención se centró en los posibles efectos de las nitrosaminas en las carnes curadas, proponiendo la eliminación del nitrito de sodio como aditivo alimentario. Sin embargo, la perspectiva de la eliminación del nitrito de sodio presenta un gran dilema para las agencias reguladoras dado que, aunque la eliminación del nitrito de sodio puede evitar la formación de nitrosaminas, también podría aumentar el riesgo de envenenamiento por botulismo ya que el nitrito de sodio y el cloruro de sodio son particularmente efectivos contra el *Clostridium botulinum*. La solución al dilema ha consistido en limitar la adición de nitrito de sodio a 120 partes por millón (ppm), el nivel más bajo encontrado para ser eficaz en el control de crecimiento y producción de toxinas por *Clostridium botulinum*.

Otros contaminantes muy abundantes, lo constituyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que representan un grupo muy amplio de compuestos orgánicos relacionados estructuralmente. Se producen durante la combustión incompleta de la materia orgánica como la madera, combustibles fósiles o tabaco. Se pueden encontrar también en los alimentos como contaminantes ambientales, o pueden formarse durante la cocción a la parrilla. Por tanto, estos contaminantes se pueden considerar como ubicuos.

Tabla 2: Resumen de los carcinógenos potenciales en la dieta

Grupo compuesto	Nombre compuesto	Referencia	Grupos de alimentos incluidos	Fuentes en la dieta	Clase de toxicidad	Enfermedades inmunes y cánceres asociados
Nitratos, nitritos, nitrosaminas	Nitratos, nitritos, NDMA, NPIP, NPVR, NPRO, y combinaciones	Jakszyn y González, 2006; Liu <i>et al.</i> , 2009	Patatas, verduras, frutas, Leche y productos lácteos, cereales, carnes, pescado, huevos, grasas, bebidas alcohólicas y no-alcohólicas	<ul style="list-style-type: none"> Contaminación con nitratos durante el proceso de los alimentos y posterior formación endógena 	Genotóxico Carcinogénico	ALL en niños, cáncer de esófago
Aminas heterocíclicas HAAs	PhIP, MeIQx, DiMeIQx	Keating <i>et al.</i> , 1999; Pfau <i>et al.</i> , 1999; Vanhaecke <i>et al.</i> , 2006	Carne (fresca, conservada, derivados de la carne) y pescado (fresco, mariscos, conservas de pescado)	<ul style="list-style-type: none"> Formación durante la cocción y al asar a la parrilla 	Genotóxico Carcinogénico	Cáncer de próstata, cáncer de colon
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	B(a)P, DiB(a)A, PAH totales	De la Chica <i>et al.</i> , 2005	Patatas, verduras, frutas, Leche y productos lácteos, cereales, carnes, pescado, huevos, grasas, bebidas alcohólicas y no-alcohólicas	<ul style="list-style-type: none"> Contaminación con nitratos durante el proceso de los alimentos y posterior formación endógena Formación durante la cocción y al freír Fumar y la exposición al tabaco en el ambiente humo (ETS) 	Genotóxico Carcinogénico Inmunotóxico	ALL en niños, cáncer testicular, cáncer de pulmón, Restricción del crecimiento fetal
Acrilamida	monoacrilamida			<ul style="list-style-type: none"> Formación durante la cocción y al freír 	Genotóxico carcinogénico	
Micotoxinas	Aflatoxina Deoxinivalenol (DON)	Sobrova <i>et al.</i> , 2010; Zhang <i>et al.</i> , 2011		<ul style="list-style-type: none"> Contaminación ambiental de la cadena de los alimentos 	Genotóxico Carcinogénico Inmunotóxico	Hepatitis aflatoxica, cáncer de hígado y del esófago
Alcoholes	Etanol	Sood <i>et al.</i> , 2001		<ul style="list-style-type: none"> Estilo de vida 	Co-carcinogénico Inmunotóxico	ALL en niños, síndrome de alcoholismo fetal
<p>NPIP: N-nitrosopiperidina, NPVR: N-nitrosopirrolidina, NPRO: N-nitrosoprolina, PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAAs: Aminas heterocíclicas, MeIQx: 2-Amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina), DiMeIQx: 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina, PhIP: 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina, DON: Deoxinivalenol, NDMA: nitrosodimetilamina, ENOCs: Compuestos N-nitroso endógenos.</p>						

Debido a la existencia de una gran variedad de fuentes, los PAHs se han detectado en todos los compartimentos medioambientales así como en los alimentos. Muchos de estos compuestos despiertan preocupación en salud pública ya que se conoce su posible carácter carcinogénico y mutagénico. Entre las distintas rutas de exposición humana a los PAHs, los alimentos son una de las principales vías de exposición. De acuerdo con Menzi *et al.* (1992), se estima que la ingesta diaria de PAHs carcinogénicos es de alrededor de los 3 µg/día, que es unas veinte veces mayor que la exposición por la vía inhalatoria (0,13 µg/día) y quinientas veces mayor que a través del agua (0,006 µg/día). La aparición de residuos de PAHs en los alimentos está muy influenciada por sus características físico-químicas apolares muy hidrofóbicas. Así, estos compuestos no tienden a acumularse en alimentos con un alto contenido acuoso y los tratamientos térmicos de los alimentos, como es la fritura o el asado, o procesos como el ahumado y el desecado, son las principales fuentes de contaminación por PAHs en los alimentos (Mottier *et al.*, 2000; Stumpe-Viksna *et al.*, 2008).

El Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) dictaminó en 2002 que algunos PAHs son cancerígenos genotóxicos. Entre ellos el benzo(a)pireno (BaP) suele utilizarse como marcador de la presencia y efecto de los PAHs cancerígenos en los alimentos, especialmente respecto a su metabolismo y a su potencial toxicológico, y se le considera generalmente como un carcinógeno modelo y un disruptor endocrino (Bui *et al.*, 1986; Bostrom *et al.*, 2002; Kazeto *et al.*, 2004).

La presencia de acrilamida (AA) en los alimentos supone su riesgo para la salud, dado que se considera que probablemente es un cancerígeno en humanos (Wilson *et al.*, 2009). Varias investigaciones han mostrado que los alimentos en general son la mayor fuente de exposición a la acrilamida, lo que ha motivado múltiples estudios en este campo. Se ha demostrado que después de ingerir la acrilamida contenida en los alimentos, el 1% se convierte en glicidamida durante el metabolismo y es este metabolito el que se considera como carcinógeno, y de ahí la conclusión de que el potencial mutagénico de la acrilamida está basado en la capacidad de su metabolito epóxido (la glicidamida) de formar aductos en el DNA.

La acrilamida se forma como resultado de lo que se conoce como la reacción de *Maillard*. Es una reacción química entre un aminoácido (componente básico de las proteínas) y un azúcar simple como la glucosa, la fructosa o la lactosa. El calor es necesario para iniciar dicha reacción, que produce toda una serie de cambios químicos cuyo resultado es la “caramelización” del alimento y la formación de una serie de compuestos de aroma y sabor.

Estos compuestos combinados son los que proporcionan la apariencia y el sabor característicos de los alimentos cocinados. El proceso de formación de la acrilamida se conoce parcialmente, ya que la reacción es una de las reacciones químicas más complicadas que se producen en los alimentos. Su formación parece depender del tipo del alimento, la temperatura y del tiempo que se tarda en cocinarlo. Sin embargo, y de manera general, se considera que los niveles de acrilamida son mayores en los alimentos que contienen almidón, como el pan o las patatas, ya que ésta aumenta cuando se cocinan a temperaturas altas y durante un período largo de tiempo.

Por último, la presencia de micotoxinas en los alimentos es otro tipo de contaminantes frecuentes en los alimentos con propiedades carcinógenas, una micotoxina típica es el deoxinivalenol (DON) que es un contaminante común del trigo que puede dar lugar a vómitos, retraso en el crecimiento y problemas en el sistema inmunológico, y su exposición se ha relacionado con el cáncer de hígado (Zhang *et al.*, 2009).

1.12.2. Factores que reducen el riesgo de la exposición prenatal

Los resultados de muchos estudios sugieren que las dietas relativamente saludables se asocian con una reducción significativa aunque modesta, del riesgo (15 -30%), para todas las causas de mortalidad y para la enfermedad coronaria (Kant, 2010; Tucker, 2010). La evidencia epidemiológica une el consumo de frutas y/o vegetales con una disminución de padecer cáncer (Collins, 1999; WCRF/AICR, 2007). Los seres humanos están expuestos a mezclas complejas de sustancias que pueden estar implicadas en causar, modular y prevenir ciertas enfermedades; sin embargo, ante la falta de evidencias concretas, el esfuerzo de las instituciones y los responsables de salud se está dirigiendo hacia la prevención de toda exposición

intencionada e irresponsable a los carcinógenos conocidos. En este sentido, es posible que en las siguientes décadas podamos apreciar el efecto de las campañas anti-tabaco sobre la incidencia de determinados tipos de cáncer.

Diversos estudios indican que algunos componentes alimentarios pueden ayudar a prevenir el cáncer y, algunas veces, facilitan incluso que el cuerpo lo combata si ya se padece la enfermedad. Estos elementos son lo que los investigadores llaman quimio-protectores. Entre ellos se cuenta un grupo conocido a menudo como antioxidantes.

Las frutas y verduras contienen cantidades relativamente altas de componentes con características antioxidantes inherentes, tales como la vitamina C, los carotenoides y los flavonoides. Esto ha llevado a la sugerencia de que los antioxidantes de la dieta pueden aumentar las defensas antioxidantes celulares y ayudar a proteger a los componentes celulares contra el daño oxidativo. Por lo tanto, se considera que la actividad antioxidante desempeña un papel importante en los efectos protectores de frutas y verduras contra el cáncer (Block, 1992; Ames *et al.*, 1993). Así, los efectos protectores de las hortalizas y frutas pueden derivarse de los efectos combinados de varios compuestos fenólicos, vitaminas, fibras dietéticas e isotiocianatos, en lugar de por el efecto de un sólo ingrediente activo (Lee *et al.*, 2003).

En muchos casos, los efectos son indirectos, así la vitamina C (ácido ascórbico) reduce los nitritos, evitando la formación de nitrosaminas (García *et al.*, 2008; Erkekoglu y Baydar, 2010).

Otros antioxidantes, que no son vitaminas, también se encuentran en las frutas y los vegetales y, al parecer, tienen potentes propiedades para combatir el cáncer. Uno de ellos es el beta-caroteno, sustancia que otorga a algunos vegetales su color, como las zanahorias y los pimientos, y que el cuerpo convierte en vitamina A. Cuando se ingiere en estado natural (en un alimento rico en beta-caroteno, como los vegetales de hojas verdes, las zanahorias o los pimientos morrones), se puede mejorar las reacciones del sistema inmune en el cuerpo al estimular una molécula que ayuda a que el sistema inmune localice y destruya las

células cancerosas. Además, se ha descrito que el beta-caroteno tiene propiedades antioxidantes y podrían proteger frente al cáncer de pulmón (Lorenzo *et al.*, 2009).

En cualquier análisis del potencial de una dieta saludable para combatir el cáncer, es importante recordar que muchos alimentos diferentes contienen elementos benéficos. Las nuevas investigaciones destacan la necesidad de una dieta variada, más que cualquier alimento o grupo de alimentos en particular. Los nuevos parámetros subrayan también la necesidad de limitar o controlar la obesidad, no sólo mediante un descenso de las calorías consumidas, sino también por medio del ejercicio, que fortalece el cuerpo y fomenta un mejor uso de cualquier nutriente digerido.

La ingesta adecuada de ácido fólico periconcepcional (también llamado ácido fólico o vitamina B9) se ha demostrado que limita los defectos del tubo neural del feto y la prevención de la espina bífida, un defecto congénito grave (Delany *et al.*, 2011). El papel del folato en el embarazo está bien establecido, con la mayoría de las vitaminas prenatales (PNVs) en el mercado conteniendo al menos 800 microgramos de ácido fólico. El ácido fólico se debe convertir en el cuerpo en L-metilfolato, la forma natural y biológicamente activa de folato (Bentley *et al.*, 2011). Esto se hace mediante la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), cuya deficiencia induce alteraciones durante el desarrollo fetal (Wilffert *et al.*, 2011)

La DHA omega-3 es un importante ácido graso estructural para el cerebro y la retina, y se encuentra de forma natural en la leche materna. El desarrollo del feto no puede producir DHA de manera eficiente, y debe recibir este nutriente vital de la madre a través de la placenta durante el embarazo y en la leche materna después del nacimiento.

1.12.3. La dieta mediterránea como ejemplo de un patrón dietético saludable

Son varios los estudios que han demostrado que la alta calidad nutricional de la dieta mediterránea se caracteriza por una mejor calidad de grasa y una mayor cantidad de antioxidantes (Abrams, 2007). Estas bondades atribuidas a la dieta mediterránea hacen que ésta se encuentre en un momento de apogeo,

sirviendo como modelo para una vida saludable (Keys, 1980; Collins, 1999) e imponiéndose como patrón dietético en todo el mundo. Este amplio reconocimiento tiene su origen, fundamentalmente, en las investigaciones llevadas a cabo sobre la relación entre la dieta mediterránea y la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

Según estudios epidemiológicos, la ingesta diaria de alimentos específicos durante el embarazo o el patrón dietético de las madres, tiene influencia sobre las características somatométricas del recién nacido. Sin embargo, son pocos los estudios, y en muchos casos los resultados obtenidos son conflictivos, que han examinado el papel de la dieta durante el embarazo sobre los recién nacidos (Chatzi *et al.*, 2011).

Se han planteado muchas hipótesis sobre aspectos particulares de la dieta materna y su relación con el desarrollo fetal. Así, se han considerado factores positivos las dietas bajas en azúcar (King, 2006) y la ingesta de frutas, vegetales, pescados, productos lácteos y algunas vitaminas y antioxidantes (Lagiou *et al.*, 2005). Por lo tanto la evaluación de la posible asociación de la dieta mediterránea con el crecimiento del feto se adapta bien en el contexto de la evaluación del efecto global de un patrón dietético con la aparición de una enfermedad.

La evidencia epidemiológica ha mostrado que un ambiente *in útero* pobre en alimentos esenciales o con una insuficiencia placentaria puede suponer susceptibilidad en el feto para desarrollar futuras enfermedades cardiovasculares u otras relacionadas con el metabolismo. Según diversos estudios, los recién nacidos con BP presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y un preocupante aumento de enfermedades cognitivas (Richards *et al.*, 2002; Catov *et al.*, 2007). Consecuentemente, ha aumentado el interés por conocer y valorar los hábitos alimentarios que pueden ser más predictivos del riesgo de futuras enfermedades. En este contexto, cabe señalar que los componentes individuales de la dieta no son generalmente predictivos de la mortalidad total sino que varios componentes de la dieta son necesarios para producir un efecto protector.

A pesar de toda esta información, la evaluación de los hábitos alimentarios de las poblaciones de mujeres embarazadas es poco frecuente. Según los resultados de un estudio sobre una población danesa, la dieta durante el embarazo, rica en carne roja y carne procesada y con alto contenido en grasa está asociada con un mayor riesgo de PEG (Knudsen *et al.*, 2008), mientras que las mujeres que siguen una dieta mediterránea presentan un menor riesgo de parto prematuro (Mikkelsen *et al.*, 2008).



Figura 10. Pirámide para la dieta mediterránea, indicando los alimentos y su frecuencia de consumo para un adulto sano, las frutas y verduras, ricos a su vez en fibra, aseguran las suficientes fuentes vitamínicas y minerales. Las grasas o lípidos aportarán aproximadamente el 35% del aporte energético total (Down y Willows, 2008).

Las ventajas atribuidas a la dieta mediterránea se basan en que ésta supone una alta ingesta de frutas y verduras, panes y cereales, nueces y cantidades muy bajas hasta moderada en productos lácteos, huevos y pequeñas cantidades de carne roja (Figura 10). Por otra parte, este patrón dietético es muy bajo en materia grasa saturada, pero rico en carbohidratos, fibra y antioxidantes. También es de destacar el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-3 PUFA y monoinsaturados MUFA, principalmente derivados de la ingesta de aceite de oliva y de pescado.

De todos estos trabajos, se llega a la conclusión de que la dieta mediterránea tradicional tiene efectos positivos para la salud, concretamente en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes incluso el Alzheimer (Martínez-

González *et al.*, 2008; Benetou *et al.*, 2008, Trichopoulou *et al.*, 2010); por tanto, es de suponer que seguir esta dieta durante el embarazo puede suponer ventajas para el futuro hijo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Dado que esta Tesis se ha desarrollado en el contexto del proyecto de investigación europeo NewGeneris (CT-2005-016320), nuestro objetivo principal ha consistido en valorar la hipótesis de que la exposición materna durante la gestación a contaminantes genotóxicos y/o inmunotóxicos mediante la dieta, pueden inducir eventos en el feto que den lugar a un mayor riesgo de enfermedades y trastornos del sistema inmune durante la infancia.

En este contexto, hemos utilizado el ensayo del cometa en condiciones alcalinas como una herramienta apropiada y como un biomarcador de daño en el DNA.

Así, y según el diseño del estudio, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer los niveles basales de daño genético en los linfocitos de las madres y de sus recién nacidos, y determinar las eventuales asociaciones existentes.
2. Investigar los niveles de daño oxidativo en los linfocitos de madres-hijos mediante la incorporación de endonucleasas específicas (FPG y EndoIII) en el ensayo del cometa, y determinar las eventuales asociaciones existentes.
3. Aplicar la versión del ensayo del cometa adaptado para estudiar la capacidad de reparación *in vitro*, utilizando los extractos proteicos de los linfocitos de las madres-hijos, así como determinar las eventuales asociaciones existentes.

A partir de las respuestas a los cuestionarios establecidos para este trabajo: cuestionarios sobre el estilo de vida y hábitos de las madres, informaciones somatométricas de los recién nacidos y cuestionarios de frecuencia alimentaria (CFA), se plantearon otros dos objetivos específicos:

4. Estimar las asociaciones entre alimentación y los biomarcadores de efecto en las madres y relacionarlas con las características del recién nacido.

5. Evaluar las asociaciones entre la exposición a través de la dieta materna a los agentes carcinógenos y/o inmunotóxicos seleccionados, y determinar posibles efectos genotóxicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población estudiada

El estudio consistió en el muestreo de una población de madres y sus recién nacidos. Los nacimientos tuvieron lugar en el hospital del Mar (Barcelona). La muestra estaba conformada por 200 parejas madres-hijos, y fue reclutada entre Octubre de 2008 y Marzo de 2010. Para formar parte del estudio, las participantes habían de cumplir los criterios siguiente, no padecer enfermedades crónicas (por ejemplo diabetes), ser mayores de 18 años, firmar un informe de consentimiento de que participan voluntariamente en el estudio, y rellenar un cuestionario específico sobre hábitos alimentarios (cuestionario de frecuencia alimentaria, CFA), además de otros dos sobre información socio-demográfica de la madre y sobre somatometría del recién nacido, respectivamente (Anexos 1 y 2).

La eficiente colaboración del personal del hospital ha sido básica para evitar toda perturbación y retraso en la colección de las muestras y para completar adecuadamente los cuestionarios. Para la identificación y la codificación de las muestras se adoptó una logística muy específica para todas las muestras biológicas obtenidas, así como para los cuestionarios rellenados.

Hay que destacar que este trabajo forma parte del proyecto europeo *NewGeneris (Newborns and Genotoxic Exposure Risk)* y que parte importante de nuestra aportación al mismo, consistió en obtener información sobre los niveles de determinados biomarcadores fenotípicos basándonos, principalmente, en los resultados obtenidos en el ensayo del cometa. Además, nuestro grupo estuvo encargado de manipular todas las muestras biológicas de la población de Barcelona y de distribuir las correspondientes alícuotas entre los laboratorios participantes en el estudio. En la Figura 9 se indican las distintas cohortes utilizadas en el proyecto europeo, así como donde se localiza la cohorte estudiada por nosotros.

3.2. Colección de las muestras de sangre

Debido a que nuestro trabajo estaba incluido dentro del proyecto europeo el volumen de sangre obtenido de cada individuo fue de 39 mL (madre) y 29 mL

(cordón umbilical) por punción endovenosa en vacutainers heparinizados, inmediatamente después del parto. La extracción de la sangre se realizó por enfermeras de la unidad de maternidad del Hospital del Mar (Anexo 3).

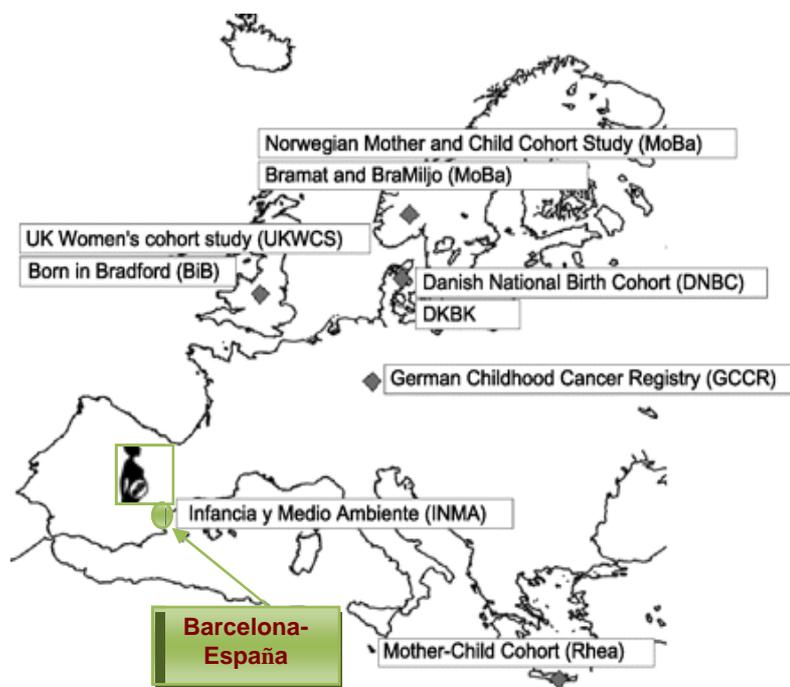


Figura 11. Mapa de participación en el proyecto Newgeneris en Europa con indicación de las cohortes participantes y la localidad de la procedencia de la población estudiada, Barcelona - España.

El traslado del material biológico desde el hospital hasta el laboratorio se realizó dentro de las dos horas siguientes al parto, a temperatura ambiente, manteniendo el tubo en posición horizontal y evitando cualquier movimiento brusco del mismo.

En los estudios de biomonitorización humana, los linfocitos de sangre periférica constituyen el material preferentemente utilizado. Dado que los periodos de muestreo suelen prolongarse bastante tiempo (meses e incluso años), con la consiguiente variabilidad en los resultados debido a las diferencias temporales, lo oportuno es aislar los linfocitos (según se van recogiendo las muestras) y criopreservarlos hasta el momento del análisis. De esta manera todo el

análisis se realiza en un corto espacio de tiempo, minimizando los efectos de las variaciones temporales.

3.3. Aislamiento y congelación de los linfocitos

Una vez que la muestra llega al laboratorio del Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la UAB, se procede inmediatamente al aislamiento de los linfocitos.

Para ello, los tubos heparinizados con sangre periférica (madre) o con sangre del cordón umbilical, de un volumen de 10 mL, se homogeneizan suavemente por inversión del tubo un par de veces. A continuación, la sangre se diluye con un volumen igual de PBS y, posteriormente, la mezcla se añade a un volumen igual de Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma) contenido en un tubo de centrifuga de 50 mL. Este tubo está posicionado con una inclinación aproximada de 45°, y la sangre diluida se añade muy lentamente, procurando no romper la interfase, desde la parte baja del tubo (la parte más cercana al Ficoll) hacia arriba. La posición vertical del tubo se va recuperando progresivamente, a medida que se va llenando para evitar la mezcla de las fases. A continuación se centrifuga a 1500 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este método permite la separación de células mononucleadas, que tienen una densidad inferior a la de las polimorfo-nucleares (granulocitos) y eritrocitos. La separación en un medio iso-osmótico de densidad igual a 1,077 g/mL permite que los eritrocitos y granulocitos sedimenten a través del medio y se forme una banda claramente visible con las células mononucleares entre la muestra y la interfase medio/muestra.

Mediante la utilización de una pipeta Pasteur de plástico, se toman aproximadamente 2 mL de la capa de células (linfocitos, monocitos y plaquetas). Estos 2 mL de células se depositan en un tubo de centrifuga de 15 mL que contiene 10 mL de PBS a 4 °C. Se mezcla suavemente y se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 700 g. Posteriormente se descarta el sobrenadante por decantación y se resuspende el botón celular en el PBS remanente y se completa con nuevo PBS hasta los 10 mL.

De esta suspensión celular se recogen 10 μL para determinar la densidad, con el método del Trypan blue. De los 10 mL se toman 3 mL y se transfiere a otro tubo, que se utilizará para la evaluación del daño genético y oxidativo en el DNA (N1), mientras que los otros 7 mL restantes se utilizaran para el estudio de la capacidad de reparación (N2).

Las muestras indicadas (3 mL y 7 mL) se vuelven a centrifugar durante 10 minutos a 700 g para luego resuspender el botón celular en 1 mL de medio de congelación (70% RPMI, 20% FCS y 10% DMSO que se añade al final) por cada $0,3 \times 10^6$ células. Finalmente se hacen alícuotas de 0,3 mL en crioviales de 1,5 mL y se congelan a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Otro proceso seguido para congelar los linfocitos, utilizado en el estudio diseñado para evaluar la capacidad de reparación, ha consistido en la congelación directa del pellet. Así, una vez los linfocitos aislados y suspendidos en PBS (7 mL) se dispensaron en alícuotas iguales de 1 mL de PBS con una densidad de 1×10^6 células/mL. A continuación, se centrifugaron a 14000 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos y el sobrenadante se elimina completamente dejando un pellet precipitado casi seco. Los pellets se congelaron por caída en nitrógeno líquido y almacenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Para la evaluación del daño genético basal e oxidativo, también se extrajo sangre de un donante sano para utilizarla como control externo. La toma de la muestra se hizo en el *Servei Assistencial de Salut* de la UAB. Al respecto, se extrajeron 10 mL de sangre periférica mediante punción endovenosa en tubos con heparina al 1%, y se aislaron los linfocitos siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Después de determinar la densidad celular, los linfocitos se resuspendieron en un volumen de medio de congelación a la densidad de $0,3 \times 10^6$ células en 300 μL de medio de congelación (70% RPMI, 20% FCS. La mitad de esos linfocitos se llevaron a irradiar (control positivo a 5 Gy) a la unidad Técnica de Protección Radiológica de la UAB (UTPR-UAB). Después se añadió el 10% de DMSO filtrado a los crioviales irradiados y no irradiados, y se homogeneizaron suavemente por inversión antes, de congelarlos gradualmente a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. La inclusión de un control externo permite corregir luego los datos del ensayo.

3.4. Descongelación de las muestras

Antes de extraer los viales de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o del LN_2) para la descongelación, hay que rotular previamente distintos tubos de centrifuga de 15 mL (tantos como el número de viales que se quieran descongelar) con los códigos de las muestras correspondiente (madre-hijo y controles externos) e introducir en cada uno de ellos 10 mL de PBS a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez se sacan los viales congelados, se ubican sobre hielo y se añade 1 mL de PBS a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el interior de cada uno, removiendo suavemente con la pipeta hasta conseguir que el cubito de hielo que contiene las células se desprenda de las paredes del tubo. Justo en este momento, se decanta este contenido en el interior del correspondiente tubo de centrifuga; allí, el cubito de hielo terminará de fundirse, consiguiendo que el medio de congelación (sobre todo el DMSO) se diluya rápidamente.

A continuación, se centrifugan los tubos durante 10 min a 700 g y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se resuspende muy suavemente el botón celular en 1 mL de PBS frío y se completa nuevamente hasta 10 mL. Se repite la centrifugación y finalmente, se resuspende de la misma manera el botón celular en 1 mL de PBS frío y se traslada la suspensión a tubos eppendorf debidamente rotulados, manteniendo siempre las muestras en hielo.

3.5. Ensayo del cometa

3.5.1. Descripción del protocolo estándar

En su versión estándar el ensayo se lleva a cabo en condiciones alcalinas, de acuerdo con el método inicialmente descrito por Singh *et al.* (1988), con ciertas modificaciones. Este protocolo supone la realización de diversas etapas, tal como se describe a continuación

3.5.1.1. Preparación del micro-gel de agarosa

Una de las modificaciones introducidas en el ensayo del cometa ha sido el soporte utilizado para preparar los geles. En nuestro trabajo hemos utilizado dos soportes diferentes:

El soporte estándar constituido por portaobjetos de vidrio, como se ha descrito en la versión estándar de Singh *et al.* (1988). En este caso, los portaobjetos de vidrio se pre-cubren con una fina capa (150 μ L) de agarosa de punto de fusión normal (Normal Melting Agarose, NMA) (GIBCO BRL) al 1% (deshidratada a 65 °C), disuelta en agua destilada (Singh *et al.*, 1988). Este soporte se utilizó para el estudio de la capacidad de reparación.

Teniendo en cuenta el área limitada que poseen los portaobjetos convencionales (76 x 26 mm), y con el objetivo de aumentar el número de muestras por experimento, sin dejar de lado un aspecto muy importante como es la estabilidad y la adherencia de los geles en el soporte correspondiente, en nuestro trabajo también hemos utilizado otro soporte con otras cualidades y dimensiones, el cual se utiliza directamente sin hacer la primera capa. Se trata de láminas transparentes y flexibles llamadas Gelbond®, adaptadas para contener hasta 48 microgeles de agarosa.

Estas películas poseen una cara hidrofílica, lo que asegura una excelente adherencia de las células embebidas en agarosa. Las láminas se adaptan en cuanto a sus dimensiones (10,5 x 7,5 cm) y se perforan en cada esquina para ser montadas en marcos de plástico y, así, facilitar su manipulación. Es importante para una correcta orientación hacer un pequeño corte en la esquina inferior derecha de cada gel. Este soporte se utilizó para estudiar el daño genético y oxidativo en el DNA

Este tipo de soporte transparente no se puede rotular, así que se diseñó una plantilla con el esquema de la lámina del Gelbond con los 48 geles. Sobre esta plantilla se indican los datos de cada experimento y los códigos de las muestras analizadas.

Una vez descongeladas las muestras (en nuestro caso linfocitos de madres-hijos y de controles externos) y suspendidas en 1 mL de PBS, se separaron 10 μ L para contabilizar la densidad y así poder ajustar la densidad necesaria para la cantidad de geles requeridos. Se ajusta la densidad celular de cada muestra para tener en cada microgel de 7 μ L 500 células en una proporción 1:10 (suspensión celular:agarosa). En este momento se alícuotan 225 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Agarose, LMP al 0,75% en PBS-EDTA) en cada uno de 8 tubos

de 0,2 mL, ubicados en un bloque térmico estabilizado previamente a 37 °C y luego se mezclan 25 µL de cada suspensión celular con la agarosa (cantidad suficiente para preparar hasta 4 láminas de *Gelbond* con las mismas muestras, cada muestra repartida en 3 gotas).

Mediante una pipeta multicanal expandible (*eQualizer*), se dispensaron los 48 micro-geles sobre la lámina del *Gelbond* ubicada sobre una placa de aluminio fría. Los geles se dejaron solidificar a 4 °C durante 5 minutos.

Una ventaja importante del uso de este formato de 48 geles por soporte (*Gelbond*) es su alto rendimiento, lo que es especialmente útil en los estudios de biomonitoreo humano en el que se trabaja con múltiples muestras. Este nuevo procedimiento permite ahorrar tiempo en todas las etapas, ya que se manejan menos soportes y también reduce la cantidad de reactivos necesarios. En la Figura 12 se esquematiza la distribución de muestras en un *Gelbond*, al tiempo que se muestra un *Gelbond* montado en el marco de plástico que facilita su manipulación.

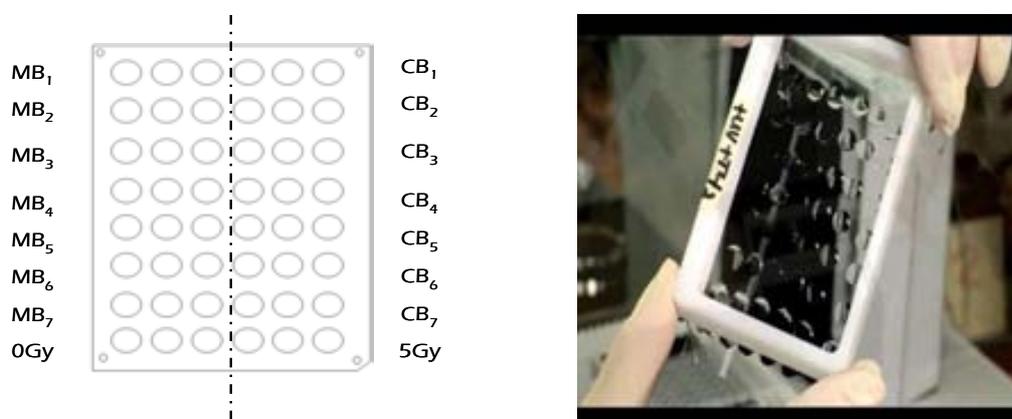


Figura 12. Diseño de una lámina de *Gelbond* de 48 geles para procesar 14 muestras y 2 controles (0 Gy y 5 Gy) (izquierda). Imagen de una lámina de *Gelbond* con los 48 geles solidificados 5 min a 4 °C (derecha).

3.5.1.2. Lisis

Una vez los geles están solidificados, se sumergen durante toda la noche en una solución de lisis convencional (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, DMSO 10%, 1% Triton X-100, pH 10) recién preparada a 4 °C. Esta solución se debe enfriar previamente, para asegurar la estabilidad de los geles.

La alta concentración de sales y detergentes de esta solución permite la desintegración de las membranas citoplasmáticas y nucleares, así como la eliminación de restos citoplasmáticos, RNA y algunas proteínas nucleares (Singh, 2000). A partir de este punto, todo el proceso se realiza en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz en el DNA desprotegido.

3.5.1.3. Desnaturalización y electroforesis

Tras la lisis, las láminas de *Gelbond* se prelav an con el tampón de electroforesis a 4 °C (1 mM Na₂EDTA y 300 mM NaOH a pH 13,2) durante 5 minutos, y luego se ubican dentro del tanque de electroforesis, totalmente sumergidas en un nuevo tampón de electroforesis, durante 35 minutos para la desnaturalización del DNA. Una vez finalizado el tratamiento alcalino, se inicia la electroforesis durante 20 minutos a 20 V - 300 mA. La alcalinidad de esta solución permite la disociación de las hebras de DNA.

Se debe procurar establecer una orientación de las preparaciones teniendo en cuenta que el DNA, al tener carga negativa, migrará hacia el polo positivo.

3.5.1.4. Neutralización y fijación

Una vez finalizada la electroforesis, se realiza la neutralización de las láminas de *Gelbond* que se realiza con agua destilada fría. A continuación se procede a la fijación en un baño de etanol absoluto por un periodo de 2 a 24 horas. Finalmente se dejan secar a temperatura ambiente antes de la tinción.

La deshidratación con alcohol (metanol absoluto o etanol) permite almacenar los portaobjetos durante un tiempo relativamente largo antes de su recuento (Klaude *et al.*, 1996; Tice *et al.*, 2000). Las preparaciones se deben guardar en cajas oscuras, para evitar la luz directa, y a temperatura ambiente.

3.5.1.5. Tinción y visualización

Para la tinción se utiliza *Sybr Gold* (Molecular Probes). A partir de un stock de 10x diluido se mezclan 20 µL en 25 mL de tampón TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA a pH 7,5 y a temperatura ambiente) y se sumergen los *Gelbonds* a teñir en esta solución durante 20 min, con agitación leve (50 rpm). Hay que asegurarse que los

geles quedan completamente sumergidos en la solución de tinción. Finalmente, se realiza un lavado de 1 minuto con agua destilada y se dejan secar los geles posicionados en forma vertical y a temperatura ambiente, hasta observar que estén completamente secos y planos.

Para la visualización, los geles se rotulan debidamente y se cortan por la mitad, debido a que su tamaño es incompatible con las medidas de la platina del microscopio. Posteriormente se adhieren con una gota de agua destilada sobre un portaobjetos de metacrilato de dimensiones 52,5 x 75 x 3 mm y se cubren con un cubreobjetos de 14 x 49 mm (IZASA) adheridos también con 50 – 100 μ L de agua destilada. Para el recuento se utiliza un aumento de 200X y se contabilizan 100 células por cada muestra.

La visualización se realiza utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50, equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm, una bombilla de mercurio de 100 W y un filtro de barrera de 590 nm, conectado a una videocámara Hitachi Denshi, Ltd. CCD-IRIS.

El análisis de las imágenes captadas a 200X se realiza con el programa Komet 5.5. Se consideró el porcentaje de DNA en la cola (% DNA cola) como el parámetro de evaluación, debido a que estudios previos del Grupo han demostrado que es más adecuado que la longitud de la cola o el momento de la misma (que son otros parámetros utilizados), y que es también un parámetro más fácil de interpretar y más apropiado a la hora de hacer comparaciones entre laboratorios.

Por último, cabe recordar que durante todo el procedimiento se ha de evitar la luz directa, sobre todo desde la lisis de las células hasta su visualización. Todas las soluciones y pasos del ensayo se deben mantener y realizar a 4 °C, excepto las etapas de deshidratación, tinción y almacenamiento, que pueden efectuarse a temperatura ambiente.

3.5.2. Ensayo del cometa para la detección de bases oxidadas

El ensayo del cometa es suficientemente sensible para detectar niveles bajos de daño genético presente como daño basal en células normales, o como resultado de tratamientos a bajas dosis de agentes genotóxicos. Sin embargo, para

incrementar la especificidad del ensayo, hemos incluido una modificación relevante, añadiendo un paso adicional después de la lisis

Así, en el tratamiento hemos utilizado las enzimas extraídas de *E. coli*, FPG y EndoIII, que poseen una apropiada especificidad a la hora de detectar bases oxidadas (purinas y pirimidinas, respectivamente) eliminándolas del DNA lesionado (Collins *et al.*, 1993; 2010).

Para realizar el ensayo con incubación enzimática, se preparan cuatro láminas de *Gelbond* idénticas con las mismas muestras, como se ha descrito anteriormente. De las cuales una de ellas actuará como control, por lo que continúa en la solución de lisis (rotulado como lisis) y las tres restantes se retiran de esta solución de lisis para proceder a la incubación (codificadas como tampón, FPG y EndoIII).

El primer paso de la incubación consiste en dos lavados con el tampón F de reacción (10 mM HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/mL BSA; pH 8,0 ajustado con KOH) de 10 y 50 minutos, respectivamente, a 4 °C para luego sacar los geles del último lavado y realizar la incubación, procurando dejarlos totalmente sumergidos y cubiertos para evitar cambios en la concentración por posible evaporación del tampón. Uno de los tres geles se incubó en tampón sin enzima y los otros dos en tampón más FPG o EndoIII a 1:10000. Estas enzimas fueron suministradas por el Dr. Andrew Collins del Departamento de Nutrición en la Facultad de Medicina de la Universidad de Oslo (Noruega).

Las dos concentraciones de las enzimas se hicieron a partir de un stock de 1:3000 congeladas a -80 °C. Para ello se diluyeron 5 µL en 25 mL del tampón de reacción, previamente calentado a 37 °C. El proceso se prolonga 30 min a 37 °C, y al finalizar el tratamiento enzimático, se continúa con el protocolo del ensayo del cometa estándar desde el punto de la lisis.

3.5.3. Ensayo del cometa para el estudio de la reparación

Además de la versión básica alcalina del ensayo del cometa, existen distintas variaciones del mismo para adaptarlo a distintos estudios, en función de lo que se quiera evaluar. Así, se ha desarrollado un método, aplicable a los estudios de

epidemiología molecular, para estudiar la capacidad de reparación (Collins y Horvathova, 2001). El enfoque de esta variación consiste en medir la capacidad que poseen los extractos de linfocitos humanos de llevar a cabo las etapas iniciales de la escisión de bases dañadas de un substrato que contiene lesiones específicas.

Para ello, se utilizó un dispositivo especial (Figura 13) con una junta de silicona para la incubación de las muestras. Este dispositivo fue desarrollado previamente para el ensayo Comet-FISH con el fin de detectar secuencias específicas dentro de las preparaciones del cometa, permitiendo llevar a cabo hasta 12 hibridaciones individuales por portaobjeto en condiciones casi idénticas (Collins y Horvathova, 2001; Shaposhnikov *et al.*, 2010).

El dispositivo lleva una junta de silicona de tres milímetros de espesor que se prepara a partir de dos componentes a pesos iguales, RHODORSIL RTV 4420 A y B (Severn Biotech), bien mezclados y desgasificados al vacío.

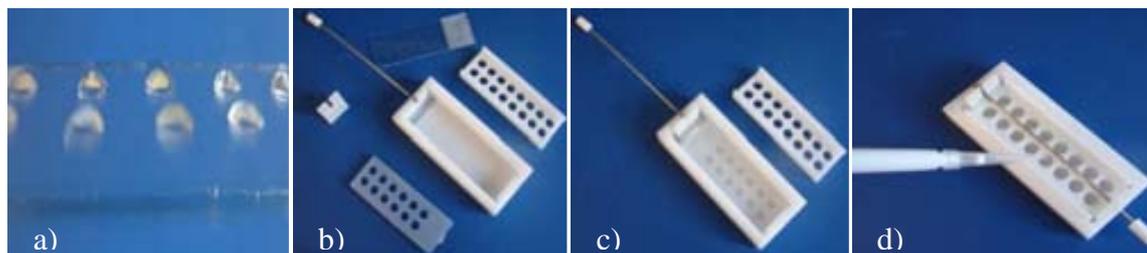


Figura 13. Sistema de incubación individual de 12 muestras. (a) Portaobjeto con el substrato en 12 geles. (b) Junta de silicona con los elementos del dispositivo para la incubación. (c) El portaobjeto con los 12 geles montado en el dispositivo. (d) En cada pocillo se agrega el extractos proteico.

El ensayo del cometa con esta modificación nos permite detectar la capacidad que tiene un extracto proteico, obtenido a partir de linfocitos, para revelar daño específico existente en el DNA. En nuestro caso el daño a detectar es la 8-oxoguanina en linfocitos controles tratados con el compuesto Ro 19-8022 más luz visible.

El Ro19-8022 (1-((10-cloro-4-oxo-3-fenil-4H-benzo(a)quinolizina-1-il) carbonil)-2-pirrolidinmetanol) es un fotosensibilizador polar de la familia de las

pirrolidinas que, en presencia de luz visible, interactúa directamente con el DNA produciendo daño oxidativo, principalmente aumentando la concentración de 8-oxoG. Este compuesto fue gentilmente facilitado por los laboratorios F. Hoffmann-La Roche SA.

El uso de 12 geles en los portaobjetos pre-cubiertos con NMA al 1% ha sido otra de las modificaciones introducidas en el ensayo del cometa. Con el uso del formato de 12-geles, se pueden analizar muchas muestras por cada porta, gracias a la opción de incubación individual de cada gel con soluciones distintas. Esto es posible porque cada incubación está físicamente aislada de las demás.

3.5.3.1. Preparación de los substratos

Siguiendo el mismo protocolo descrito antes, para el aislamiento de los linfocitos, se extrajeron 10 mL de sangre periférica de un donante sano sin exposición previa a agentes genotóxicos. Los linfocitos aislados se re-suspendieron en PBS a 1×10^6 células/mL. La mitad de las células se tratan con Ro 19-8022 a la concentración 2 μ M antes de irradiarlas con luz visible (5 minutos a 33 cm de una fuente halógena de tungsteno de 500 W), para inducir la oxidación de la guanina a 8-oxoguanina. Después de la irradiación, se lavan las células tratadas (2 Ro) y no tratadas (0 Ro) dos veces con PBS frío y después de una centrifugación a 700 g durante 7 min a 4 °C, se resuspende el pellet en medio de congelación DMEM con un 20% de suero y 10% de DMSO añadido al final. A continuación se congelan gradualmente a -80 °C en alícuotas de 700 μ L.

El día del experimento se descongelan las alícuotas de linfocitos (2 Ro) y (0 Ro), de la misma manera descrita en el protocolo para la descongelación. Por decantación se elimina el sobrenadante de PBS y las células se resuspenden en el volumen remanente. A continuación, se completa hasta 1 mL de PBS a 4 °C.

Antes de realizar los 12 geles, cabe recordar que para un experimento se necesitan 4 portaobjetos precubiertos con NMA al 1% y previamente marcados: 0 Ro 1, 0 Ro 2, 2 Ro 1, 2 Ro 2. En los portaobjetos marcados 0 Ro (1 y 2) se colocan los geles con linfocitos sin tratamiento (0 Ro), mientras que en los marcados como 2 Ro (1 y 2) se colocan los geles con los linfocitos tratados con 2 Ro.

El primer paso para preparar los geles consiste en mezclar 60 μL (2×10^4 de linfocitos) de cada suspensión celular con 280 μL de agarosa de bajo punto de fusión LMP al 1 % en PBS. Mediante la pipeta multi-canal, se colocan 12 geles con 5 μL cada uno en cada portaobjeto.

Con la finalidad de colocarlos a las distancias requeridas se utiliza un molde o plantilla debajo de cada portaobjetos. Se solidifican las preparaciones durante 5 min a 4 °C y luego se mantienen sumergidas en la solución de lisis convencional a 4 °C toda la noche. Los geles deben de estar bien ubicados dentro de cada porta para que cuando se monte el dispositivo para la incubación con los extractos cada pocillo debe coincidir con el gel.

Hay que recordar que siempre hay que rotular los tubos, con sus códigos correspondientes, antes de empezar el experimento ya que es difícil manejar los códigos reales de las muestras. Los tubos con las muestras se han de mantener siempre en hielo a 4 °C. En el momento de colocar los geles se recomienda hacerlo sobre hielo porque impide que las gotas se expandan y se junten.

3.5.3.2. Preparación de los extractos proteicos

Justo antes que se acabe el tiempo de lisis de los substratos (0 Ro y 2 Ro), se procede con la preparación de los extractos proteicos. Los linfocitos de madres-hijos congelados destinados al ensayo de reparación (N2), se descongelan y se lavan con PBS para luego resuspenderse en PBS frío a 1×10^6 células/mL, antes de volver a centrifugar a 700 g durante 7 min a 4 °C y quitar el sobrenadante.

Al pellet, resuspendido en el volumen remanente del PBS, se le añade 1 mL del tampón A (45 mM HEPES, 0,4 M KCl, 1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 0,1 mM DTT (ditiotreitól), 10% glicerol, pH 7,8) diluido tres veces.

Después de una centrifugación a la máxima velocidad, 13.000 rpm, a 4 °C durante 5 minutos, se quita el sobrenadante con una pipeta, asegurándonos de sacar el máximo del sobrenadante. Se le añaden al pellet 70 μL del tampón A en cada tubo, se vuelve a resuspender el pellet con movimientos y luego con el vortex durante 5 segundos.

Una vez el pellet está disuelto, se realiza una congelación rápida en nitrógeno líquido durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo, se descongela la suspensión a 4 °C. Finalmente se le añaden 24 µL del tampón A con Triton X-100 al 1%, se mezcla ligeramente y se deja en hielo 5 minutos. Por último, se centrifuga nuevamente a 13000 rpm, durante 5 minutos a 4°C.

Se sacan unos 30 µL del sobrenadante y se mezclan con 120 µL del tampón F frío (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8) y se guarda a 4°C hasta su uso. El resto del sobrenadante (extracto proteico) se congela a - 20°C en otro tubo para una posterior cuantificación de las proteínas.

Cabe recordar que para algunas muestras destinadas al ensayo de reparación se congelaron únicamente los pellets (5,6 x 10⁶ células). Para estas muestras, una vez descongeladas a 4°C se les añade 56 µL del tampón A directamente y se continúa con el protocolo.

3.5.3.3. Incubación del extracto proteico con el substrato celular

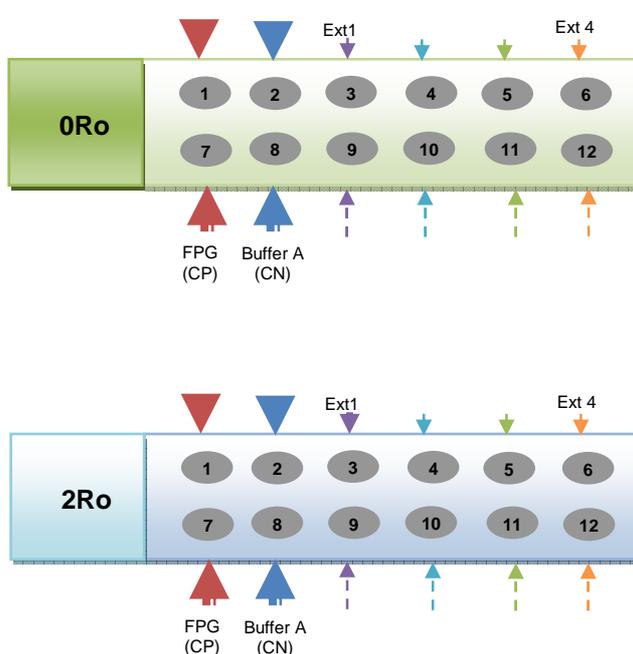
Previo a la incubación, se preparan las diluciones adecuadas para los controles (positivo y negativo). Como control positivo, se usa la formamidopirimidina FPG como enzima específica para detectar bases oxidadas (purinas oxidadas). La enzima se prepara añadiendo 290 µL del tampón F a 10 µL de una dilución de 1/1000 de la formamidopirimidina FPG. Para el control negativo se añade a 120 µL del tampón F, 30 µL de una mezcla del tampón A (70 µL) con el tampón A al 1% de Triton-100 (24 µL). Los controles se mantienen a 4°C.

El primer paso de la incubación de los substratos, una vez finalizada la lisis, consiste en lavar los portaobjetos con los 12 geles. Este lavado se repite tres veces con el tampón para enzimas, durante 5 minutos cada uno.

Cada portaobjeto con los 12 geles se monta en una cámara especialmente diseñada (*White Mouse*) sobre hielo, colocando la junta de silicona con los 12 orificios sobre el portaobjeto con 12 geles, y sellando bajo una ligera presión con un perno de acero.

Según el diseño de la plantilla realizada (Figura 14), añadimos 30 μL de cada dilución (muestras, control negativo y positivo) en el pocillo correspondiente. Se cubre la cámara de incubación con un parafilm, o con un cubre, para reducir la evaporación y se deja incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$, durante 35 min.

Con este protocolo se pueden procesar en el mismo experimento 10 muestras, usando 4 portas y 4 cámaras para la incubación.



El porta 1: substrato sin Ro 19-8022 (0 Ro): los geles por duplicado se incuban con FPG (1 y 7), control negativo (2 y 8) y Ext 1 (3 y 9), Ext 2 (4 y 10), Ext 3 (5 y 11) y Ext 4 (6 y 12).

El porta 1: substrato sin Ro 19-8022 (0 Ro): los geles por duplicado se incuban con FPG (1 y 7), control negativo (2 y 8) y Ext 1 (3 y 9), Ext 2 (4 y 10), Ext 3 (5 y 11) y Ext 4 (6 y 12).

Figura 14. Diseño de los portas con 12 geles. Ext: Extracto proteico.

Finalizado el tiempo de incubación, se sumergen inmediatamente los portaobjetos en un baño con el tampón de electroforesis, como paso para desactivar la reacción enzimática. Luego se continúa con los pasos estándar del ensayo del cometa; desnaturalización, electroforesis, neutralización, visualización y recuento. Aunque estos pasos se han modificado ligeramente.

Primero, una vez los portaobjetos se colocan en la cubeta para la electroforesis y se cubren con el tampón de electroforesis, se dejan para el

tratamiento alcalino durante 20 minutos seguidos de una electroforesis de 22 minutos a 22 V y 300 mA. La neutralización se realiza con baños de PBS 3x durante 10 min a 4 °C (en lugar de con agua destilada, como se describió en el protocolo estándar). La fijación consiste en una deshidratación durante 15 min en etanol (70%) seguida de una segunda, durante 15 min, en etanol absoluto (Figura 15). Para la tinción, se utiliza el *Syber Gold* a la misma concentración que para la tinción de los *Gelbonds*.

Para la visualización y el recuento celular se utilizó el sistema *Imstar Pathfinder™* con su software para la captura de imágenes del ensayo del cometa y su análisis adaptado para escanear portaobjetos en los formatos de 12 geles y también para láminas de *Gelbond* de 48 y 96 geles. Se han desarrollado algoritmos específicos para detectar cometas para una amplia variedad de tipos de células, con diferentes morfologías. *Imstar Pathfinder™* es un sistema de puntuación totalmente automatizado, esencial cuando se requiere un recuento y análisis de muchos geles.

El *Imstar Pathfinder™* permite incrementar 32 veces el número de portas procesados por día, en comparación con los software convencionales de recuento asistido. El recuento con el *Imstar Pathfinder™* se produce sin la intervención del investigador. Este sistema ha mostrado ser 100% repetible, fiable e independiente del operador. Actualmente se están ensayando modificaciones para aplicarlo en el ensayo del cometa con las láminas de *Gelbond™*.

3.5.3.4. Estimación de las proteínas totales en los extractos

Para la estimación de las proteínas totales, se descongelan los extractos proteicos previamente congelados a -20 °C hasta los 4 °C. La estimación se llevó a cabo utilizando fluoroscamina (Fluoram de Sigma) a una concentración de 3 mg/mL en DMSO, recién preparada y protegida de la luz. Las referencias estándar son: el tampón A (0) y el BSA diluido en el tampón A (500 µg /mL). La estimación del contenido en proteínas de las muestras se realizó mediante un Nanodrop.

Se mezclan 4 µL de la muestra (extracto celular) en un tubo de 0,6 mL y se le añaden 44 µL del tampón A (dilución 12x). En otros tubos oscuros de 0,6 mL se

colocan 3 μL de la solución del Fluoram, y se le agrega 9 μL de la dilución 12x del extracto. Se deja actuar 15 min a temperatura ambiente antes de medir las proteínas con el Nanodrop. Como control estándar, se utiliza BSA 500 μg /mL mezclado también con el Fluoram.

Hay que señalar que antes de proceder a pasar las muestras de madres/hijos en el Nanodrop, se utilizó una serie de diluciones del BSA crecientes de (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 mg/mL) diluido en el tampón A para su calibración. Para ello, y de la misma manera descrita antes, se diluyen 4 μL de cada concentración del BSA en el tampón A, y luego con el fluoram. La curva de calibración del Nanodrop permite la estimación de las proteínas totales en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada muestra.

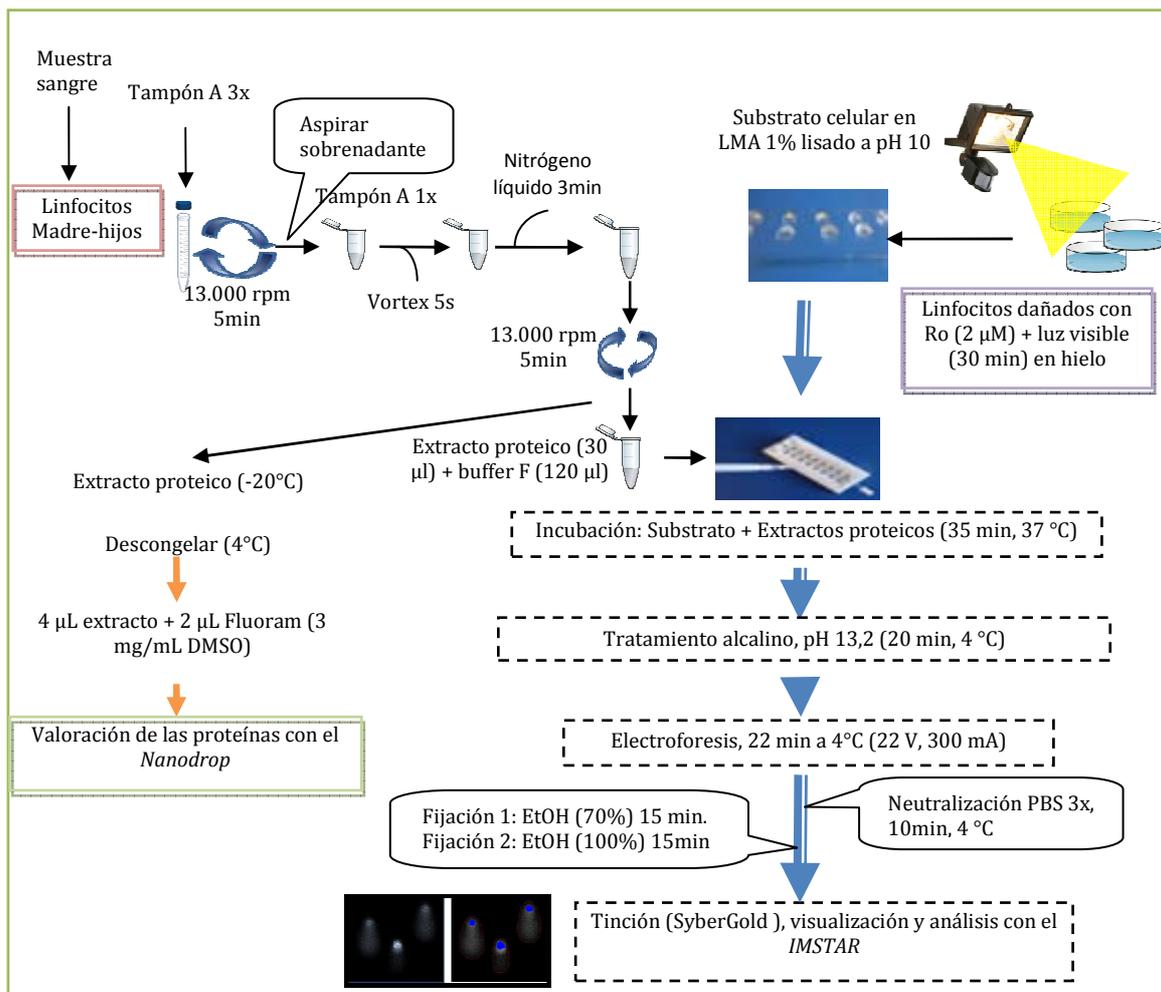


Figura 15. Proceso del ensayo del cometa para BER *in vitro*.

3.6. Desarrollo, colección y análisis de los cuestionarios

Para satisfacer los objetivos de todas las investigaciones involucradas en el proyecto, se diseñaron dos cuestionarios. El primero incluye datos habituales sobre demografía (edad, lugar de nacimiento lugar de residencia, etc), preguntas relacionadas con el historial médico (enfermedades, medicación y suplementos vitamínicos durante el embarazo, etc), asimismo, hábitos de consumo (alcohol, tabaco, café, etc). El segundo es un cuestionario de frecuencia alimentaria CFA que incluye información muy detallada sobre la dieta de las madres durante el último mes del embarazo, junto con otros factores.

Los cuestionarios destinados a las participantes antes del parto (Anexos 1 y 2) han permitido obtener informaciones sobre ellas y también permitirán comparaciones ulteriores con las otras cohortes.

El objetivo de esta encuesta es el de poder detectar cualquier posible factor de confusión que pueda influir en los resultados obtenidos, tanto para el daño genético como para el oxidativo y para la capacidad de reparación. Las respuestas del cuestionario se informatizaron dos veces y las bases de datos se compararon antes para evitar errores.

3.6.1. Valoración y/o estimaciones de las ingestas dietéticas maternas

El principal instrumento para recopilar información sobre la dieta materna y las bebidas fue mediante el cuestionario de frecuencia alimentaria (CFA) que se desarrolló principalmente basándose sobre el CFA previamente validado y utilizado para la cohorte INMA.

El modelo del CFA es semi-cuantitativo y cubre hasta 400 items entre alimentos, bebidas, suplementos, métodos de preparación de alimentos ingeridos durante el último mes del embarazo, así como el nombre del producto y el número de dosis diarias. En general el CFA tiene tres componentes principales: la frecuencia de los alimentos, los suplementos dietéticos y otras informaciones por ejemplo, el método de cocción de los alimentos.

En colaboración con expertos del CREAL (Barcelona), las respuestas sobre la frecuencia de cada ingesta de alimento se cuantificaron a gramos por día, utilizando los supuestos en recetas y tamaño de las porciones.

Para calcular valores específicos para la cantidad de xenobióticos ingeridos en tasas de xenobióticos ingeridos por día, y por cada individuo participante en el estudio, ha sido necesario crear un algoritmo rápido, eficiente y simple a partir de los datos del CFA. El análisis y las conversiones de este algoritmo se calcularon para los compuestos indicados en la Tabla 3.

Tabla 3. Listado de los compuestos químicos investigados.

Grupo	Tipo	Nomenclatura	Formula química
PAHs	benzo[a]pireno	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	C ₂₀ H ₁₂
HAs		Meiqx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina)
		Dimeiqx	Dimeiqx: 2-amino-3,4-8-trimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxalina
		Phip	2-amino-1-methyl-6-fenilimidazo [4,5-b]piridina
Acrilamida	NDMA	AA	C ₃ H ₅ NO
Nitrosaminas		nitrosodimetilamina	C ₂ H ₆ N ₂ O
	Nitratos		NO ⁻³
	Nitritos		NO ₂ ⁻
Micotoxina	DON	Deoxinivalenol	
ENOCs		Compuestos N-nitroso endógenos	
Alcohol	Etanol		CH ₃ CH ₂ OH

3.7. Análisis estadístico

3.7.1. Ensayo del cometa

Tanto la descripción como el análisis estadístico de este estudio se realizaron empleando el programa SPSS, versión 17.0.

Se verificó la normalidad de todos los datos de las variables del ensayo del cometa, mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Los datos del ensayo del cometa no siguieron la distribución normal lo que nos llevó a utilizar una estadística no paramétrica para las comparaciones de medias entre madres y sus hijos. Se aplicó la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas. Se asumieron diferencias estadísticamente significativas a valores de $P < 0,05$ y diferencias altamente significativas a valores de $P < 0,001$.

Las variables del cometa se transformaron mediante el logaritmo $\ln(1+x)$ para que cumpliesen los requerimientos necesarios para la realización de pruebas paramétricas; de igual forma se transformaron las variables somatométricas del recién nacido. Todas las comparaciones positivas se han basado en un nivel de significación estadística del 95%.

Se llevó a cabo una regresión lineal con las variables del ensayo del cometa como variables dependientes y con diversas características de las madres y otras del recién nacidos como covariables.

3.7.2. Biomonitorización y análisis de los factores de confusión

Para verificar la influencia de los hábitos de cada una de las poblaciones en los niveles de daño basal, oxidativo y capacidad en reparar daño en el DNA, se realizaron análisis de regresión lineal. Cada modelo construido debió cumplir con las condiciones estadísticas para tener la máxima bondad de ajuste posible.

De acuerdo con los criterios de significación, sólo se incorporaron al modelo aquellas variables cuyo nivel crítico asociado a su coeficiente de correlación parcial, al contrastar la hipótesis de independencia, fuese menor que 0,05 quedando fuera del modelo de regresión si ese nivel crítico era mayor que 0,10.

En los casos donde más de un modelo cumplía con los criterios de significación, se eligió aquel que presentaba un R^2 corregido (coeficiente de determinación corregido) mayor y un menor error típico de la estimación.

Los modelos se obtuvieron aplicando la metodología opcional del programa SPSS “hacia atrás”, donde se comienza incluyendo en el modelo todas las variables

independientes que se quieren contrastar y luego se procede a eliminarlas una a una. La primera variable eliminada es aquella que, además de no cumplir con los criterios de significación, posee el coeficiente de regresión más bajo en valor absoluto. En cada paso sucesivo se fueron eliminando las variables con coeficientes de regresión no significativos, siempre en orden inverso a su nivel crítico.

La eliminación de variables finaliza cuando no quedan variables en el modelo que cumplan con los requisitos estadísticos de significación y de tolerancia establecidos.

Por último, se utilizaron modelos de regresión logística multinomial para calcular las *odds ratios* y los intervalos de confianza del 95% de la relación entre diferentes características de la madre y los cuartiles de la ingesta de PAHs, acrilamida, nitritos, nitratos, NDMA, DON, ENOCs y HAs. Para identificar inconsistencias, errores y/o cualquier problema potencial de colinealidad, se examinó las correlaciones de *Pearson* entre las variables de predicción.

La significación de la asociación entre las características de la madre con cada variable dependiente (PAHs, acrilamida, nitritos, nitratos, NDMA, DON, ENOCs y HAs) se ha obtenido mediante la prueba de chi-cuadrado et la razón de verosimilitud.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Descriptiva de la población estudiada

El análisis descriptivo de la población se realizó a partir de los cuestionarios rellenos por las voluntarias. A partir de estos cuestionarios y de la información clínica de la madre y del recién nacido, se ha recopilado diversa información sobre el estilo de vida y la dieta de la madre, así como información somatométrica sobre los recién nacidos.

En la Tabla 4 se resumen las características de la población de las madres. Los datos se expresan como medias (\pm SD) para las variables continuas y como porcentajes para los parámetros categóricos.

Como se ve en la Tabla 4, la población estudiada es heterogénea. El 47% de las mujeres son caucásicas (predominio de españolas), mientras que el resto está repartido entre latinoamericanas (20,7%), asiáticas (15,7%), del norte de África (11 %) y por último se ha establecido un grupo constituido por distintas minorías de etnia gitana, africana e indígenas de América Latina (5,5%).

Para responder a los objetivos de este trabajo se ha incluido en la descriptiva aquellos posibles factores de confusión que pudieran ejercer alguna influencia sobre los niveles del daño genético analizado, que es el objetivo último de nuestro estudio. Como posibles factores a tener en cuenta se consideraron los siguientes: la edad, el *pre-IMC*, la etnia, el hábito de fumar, el consumo de alcohol, té, café, los distintos componentes de la dieta y los contaminantes ambientales estimados a partir de la dieta.

Del total de mujeres evaluadas, se constata que la edad promedio es de 29,7 años. El 37,5% de las mujeres tienen una edad inferior o igual a 27 años, en el 32% de los casos la edad oscila entre 27-33 años, mientras que en el 30,5% la edad es superior a los 33 años. Las mujeres se han categorizado en dos grupos según sus *pre-IMC*. Así, más del 60% de las madres tenían un *pre-IMC* igual o inferior a 24,12 (Kg/m²) mientras que el 37,5% poseían un *pre-IMC* superior a dicho valor.

El hábito de fumar dentro de este grupo de mujeres no parece ser frecuente. Sólo el 26,6% fumó (una media de 4,22 cigarrillos/día) durante los meses del embarazo desde el primer trimestre hasta el tercero, mientras que el 73,3% no fuma. Sin embargo casi la mitad (92%) ha estado expuesta al humo del tabaco durante este periodo ya sea en casa, en el trabajo o en ambos.

Tabla 4. Descripción socio-demográfica de las madres durante el periodo del embarazo. Los datos son medias (\pm SD) o %, según corresponda. La información se ha obtenido del análisis del cuestionario general. ^a Hierro y folato. tabl/sem: tabletas por semana.

Características de las madres		Casos	Media \pm SD o (%)
Edad (años)	≤ 27	75	37,5
	27-33	64	32
	> 33	61	30,5
	Total	200	29,70 \pm 6,02
Etnia	Caucásica	93	47
	Latinoamericana	41	20,7
	Asiática	31	15,7
	Norte África	22	11
	Otras	11	5,5
Educación	Universidad	48	24
	Secundaria	81	40,5
	Primaria o menos	65	32,5
Pre-IMC (Kg/m ²)	$\leq 24,12$	113	62,4
	$> 24,12$	68	37,5
	Total	181	23,76 \pm 4,76
Partos previos (%)	Si (+1)	89	48,5
	No	97	44,5
Fumadora activa	Si (4,22 cig/día)	52	26,6
	No	143	73,3
Fumadora pasiva	Si	92	46
	No	105	52,5
Alcohol	Si (9,96 g/día)	42	25,9
	No	120	74,1
Actividad física	Sedentaria	54	27
	Poco activas	64	32
	Muy activa	65	32,5
Suplementos ^a	Si (7 ó más tabl/sem)	93	78,15
	No	26	21,8
Café	Si	106	70,2
	No	45	29,8
Té	Si	89	58,17
	No	64	41,83

En lo que respecta al consumo de alcohol, la mayoría no lo consumió durante el embarazo aunque un 25,9% de la población sí que indica haberlo hecho (una media de 9,96 g/día). El hierro y el ácido fólico han sido los únicos suplementos tomados durante este periodo de embarazo con un promedio de 7 tabletas por semana. En cuanto a la actividad física, se clasificó a las madres en sedentarias (27%), poco activas (32%) y muy activas (32,5%). El consumo de café y de té, en la población de las mujeres resulta ser muy común.

Respecto a la población de neonatos, en la Tabla 5 se resumen tanto sus características somatométricas cuantitativas (talla, peso, etc) como cualitativas (género y tipo de parto).

Tabla 5. Características y datos relacionados con los recién nacidos de la población estudiada. Los datos son medias (\pm SD) o % según corresponda. La información se ha obtenido del análisis del cuestionario.

		Casos	Media \pm SD o %	95% CI
Género	Niño	102	51	
	Niña	98	49	
Tipo del parto	Cesárea	22	11	
	No-cesárea (VD)	170	85	
Temporada del parto	Verano	52	26	
	Otoño	23	23	
	Invierno	56	56	
	Primavera	69	69	
Tiempo de gestación (d)		200	275,67 \pm 12,25	274,34-278,00
Parto prematuro (< 37sem)	Si (prematuro)	18	9,0	
	No (a término)	182	91	
Pequeño para la edad gestacional (PEG)	Si	11	5,5	
	No	189	94,5	
Peso (g)		200	3380,84 \pm 440,86	3296,61-3450,41
Talla (cm)		194	50,15 \pm 1,94	49,85-50,52
Peso placenta (g)		136	604,63 \pm 115,80	580,39-619,13
Circunferencia de la cabeza (cm)		194	34,37 \pm 1,62	34,07-34,64

Como se observa en la Tabla 5, la población de los recién nacidos está conformada por proporciones iguales en cuanto al género. La mayoría nació por parto normal (85%) mientras que el resto nació por cesárea. El promedio del tiempo de gestación es de $275,67 \pm 12,25$ días (39,38 semanas), y la mayoría nació a término, sólo el 9% son prematuros (tiempo de gestación inferior a 37 semanas). Los recién nacidos cuyo peso al nacer es menor al percentil 10° correspondiente a su edad gestacional (PEG), por lo general debido a una restricción del crecimiento intrauterino, no superan el 5,5% del total de los niños.

El peso promedio de los recién nacidos es de $3380,84 \pm 31,17$ gramos y la talla promedio es de $50,15 \pm 0,13$ cm, sin que se haya detectado ningún tipo de malformaciones o estado crítico dentro de este grupo.

En la Tabla 6, se indican las características de los recién nacidos según el género y las características de las madres. Al comparar el efecto de cada variable (edad, *pre*-IMC, partos previos y género) sobre la talla, la circunferencia de la cabeza, el peso del recién nacido y el peso de la placenta, se han observado diferencias significativas (Prueba de *Kruskal wallis*, $P < 0,05$) en relación al género, *pre*-IMC y partos previos.

Tabla 6. Relaciones entre características somatométricas de los neonatos con el género y ciertas características de las madres. Los datos son medias \pm ET.

	Talla (cm)	Circunferencia de la cabeza (cm)	Peso (g)	Placenta (g)
Edad (madres)				
<27	$50,29 \pm 0,24$	$34,32 \pm 0,19$	$3387,78 \pm 57,60$	$611,22 \pm 14,54$
27-33	$50,11 \pm 0,23$	$34,47 \pm 0,169$	$3359,60 \pm 48,89$	$591,95 \pm 16,45$
>33	$50,00 \pm 0,25$	$34,31 \pm 0,249$	$3394,59 \pm 53,75$	$610,97 \pm 21,25$
Pre-IMC (kg/m²)				
$\leq 24,12$	$49,91 \pm 0,15^*$	$34,16 \pm 0,13$	$3322,55 \pm 39,63^*$	$586,11 \pm 12,68$
$> 24,1$	$50,60 \pm 0,27$	$34,67 \pm 0,21$	$3468,61 \pm 57,12$	$627,29 \pm 17,24$
Partos previos				
Si	$50,01 \pm 0,19$	$34,29 \pm 0,15$	$3297,69 \pm 44,50^*$	$578,77 \pm 12,47^*$
No	$50,26 \pm 0,20$	$34,43 \pm 0,18$	$3459,42 \pm 45,51$	$628,59 \pm 14,91$
Género				
Niño	$50,66 \pm 0,18^{**}$	$34,77 \pm 0,16^{**}$	$3441,73 \pm 42,20$	$611,42 \pm 13,92$
Niña	$49,61 \pm 0,19$	$33,94 \pm 0,15$	$3317,46 \pm 45,35$	$597,42 \pm 14,21$

* Diferencias significativas ($P < 0,05$). Prueba de *Kruskal wallis*.

La talla y la circunferencia de la cabeza son superiores en niños que en niñas, lo que concuerda con lo indicado en la literatura. También, se observó que la talla y el peso difieren entre los nacidos según el *pre-IMC* de sus madres; así, los hijos de madres con un *pre-IMC* superior a 24,12 (kg/m²) tienen una talla y peso más elevado que los hijos nacidos de madres con un *pre-IMC* inferior a dicho valor.

En este análisis, el efecto de partos previos parece tener una relación con el peso del recién nacido y de la placenta. Sin embargo, la edad de las madres parece no tener ninguna relación con las características del recién nacido.

Se aplicó el test de *Kolmogrov Smirnov* a las tres variables para comprobar si responden a la condición de normalidad. El peso ha resultado ser el único que sigue una distribución normal, así que se aplicó el análisis utilizando únicamente el peso como variable dependiente. Según el análisis, y a pesar de las diferencias observadas, se constató que únicamente un parto previo y el género resultan ser factores que modulan el peso de los niños ($\beta=0,0182$, $P=0,026$) y ($\beta =-0,162$, $P=0,045$), respectivamente.

4.2. Ingesta diaria de alimentos por las madres

El análisis de esta información se ha obtenido gracias al cuestionario de frecuencia alimentaria CFA. En el grupo de las participantes ninguna mujer se ha clasificado como vegetariana, tampoco se ha señalado ningún caso de ingesta de alimentos orgánicos. En la Tabla 7 se encuentran descritos los alimentos consumidos por las madres.

En primer lugar, se constata que el alimento más ingerido por las mujeres es la fruta, con un promedio de 306,05 g/día, seguido por los productos lácteos, verdura y cereales.

El pescado se consume poco, situándose su consumo por detrás de patatas, carne roja y carne blanca. El promedio de verduras y de frutas consumidas es superior al promedio ideal recomendado para prevenir la incidencia de cánceres. Analizando las metodologías de cocción y de preparación de los alimentos se constata que el asado a la parrilla es el método más común utilizado para el

consumo de las carnes y el pescado. Respecto a la ingesta de patatas, se observó que las mujeres consumen en general patatas hervidas o cocinadas al horno y no las patatas fritas o de bolsa. En general, según este análisis se puede hablar de un patrón dietético mediterráneo.

Tabla 7. Ingesta diaria de los alimentos seleccionados, macronutrientes, vitaminas, minerales y ácidos grasos estimados a partir de los cuestionarios CFA rellenados por las mujeres participantes. Vit: vitamina.

	N	Media ± ET	5%	50%	95%
Productos lácteos ^a (g/día)	161	85,88 ± 12,35	19,11	58,23	211,06
Carne blanca ^b (g/día)	161	31,02 ± 5,92	3,17	18,53	88,28
Carne roja ^c (g/día)	161	31,58 ± 5,70	0,89	16,24	90,6
Pescado ^d (g/día)	161	21,16 ± 3,39	0,75	13,42	60,32
Verdura ^e (g/día)	156	88,15 ± 7,30	11,33	57,89	286,72
Fruta ^f (g/día)	155	306,05 ± 30,09	29,06	184,66	993,90
Cereales ^g (g/día)	156	75,62 ± 5,69	11,47	55,98	200,08
Patatas ^h (g/día)	155	43,27 ± 8,41	2,74	21,93	93,69
Grasa total (g/día)*	161	128,70 ± 9,72	52,95	105,66	323,08
Grasa saturada (g/día)*	161	39,04 ± 2,64	14,55	31,28	90,57
Grasa monoinsaturada (g/día)*	161	53,51 ± 3,92	19,57	44,09	125,07
Grasa poliinsaturada (g/día)*	161	25,22 ± 2,42	7,90	18,03	75,98
Omega 6 (g/día)*	161	14,02 ± 1,19	4,90	10,54	37,32
Omega 3 (g/día)*	161	3,55 ± 0,35	0,90	2,56	9,47
Energía Kcal/día*	161	3343,57 ± 244,75	1343,83	2689,29	8109,63
Proteínas (g/día)*	161	164,92 ± 15,58	58,18	120,90	417,06
Carbohidratos (g/día)*	161	395,26 ± 23,72	144,27	310,29	904,64
Vit. C (mg/día)*	161	308,47 ± 26,99	37,57	229,48	800,81
Vit. E (mg/día)*	161	19,58 ± 1,69	5,72	14,79	50,02
Hierro (mg/día)*	161	25,13 ± 2,05	8,20	19,28	63,29
Folato (µg/día)*	161	596,43 ± 47,94	197,58	432,82	1305,17

* Datos estimados de la suma de todos los alimentos y bebidas consumidas por las madres. ^a leche desnatada, semidesnatada y leche entera, mantequilla, queso, crema, yogurt y helados ^b pollo, pavo, pato y ganso, ^c carne de res, ternera, cerdo, cordero, paté de hígado, ^d pescados y mariscos, ^e lechuga, brócoli, zanahoria, puerro, cebolla, frijoles, apio, tomates, pepino, ajo, aceitunas, hojas de soja, pimiento, aguacate, maíz, guisantes, ^f manzana, pera, plátano, piña, fresa, melón, kiwi, cítricos, nueces y frutos secos, ^g pan, cereales, arroz, pasta, ^h patatas de bolsa, patatas fritas.

4.3. Ingesta de contaminantes según el CFA

La exposición a contaminantes a través de la dieta de la madre durante el desarrollo fetal se ha obtenido haciendo un análisis profundo de los CFA por profesionales del CREAL mediante un algoritmo automatizado en SQL (Structured Query Language) que permite calcular los valores de exposición a los distintos contaminantes por cada individuo según su dieta. Aproximadamente para el 70% se completó la información para la ingesta diaria en contaminantes.

En la Tabla 8 se representa la estima de la ingesta diaria de contaminantes por las madres durante el embarazo, al igual que los cuartiles para cada variable.

Tabla 8. Estimación de contaminantes ingeridos a través de la dieta materna durante el tiempo de gestación en ($\mu\text{g}/\text{día}$). La información se ha obtenido del análisis de la información obtenida en los CFA.

Grupo	Tipo	N	Media \pm ET	25 th	50 th	75 th	95 th
PAHs	Benzo[a]pireno	159	0,15 \pm 0,07	0,01	0,12	0,16	0,31
HAs	Meiqx	144	0,12 \pm 0,09	0,05	0,10	0,18	0,32
	Dimeiqx	147	0,07 \pm 0,10	0,02	0,03	0,07	0,21
	Phip	157	0,55 \pm 0,49	0,23	0,43	0,70	1,42
Acrilamida	Monoacrilamida	153	21,69 \pm 16,30	9,78	16,94	30,96	52,93
Nitrosaminas	NDMA	124	0,10 \pm 0,08	0,06	0,08	0,13	0,32
	Nitratos*	153	49,85 \pm 41,70	19,60	38,31	67,39	154,32
	Nitritos*	161	1,72 \pm 16,02	0,94	1,37	1,85	4,11
DON	Deoxinivalenol	159	10,64 \pm 9,54	4,45	8,48	12,27	29,78
ENOCs		123	109,50 \pm 51,16	67,22	101,05	145,88	201,41
Alcohol	Etanol	160	1,89 \pm 0,64	0,00	0,00	0,04	7,57

PAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAs Aminas heterocíclicas, Meiqx 2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-f]quinoxalina), Dimeiqx: 2-amino-3,4-8-trimetil-imidazol[4,5-f]quinoxalina, Phip: 2-Amino1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina, NDMA: Nitrosodimetilamina, ENOCs: Compuestos N- nitroso endogénos. *(mg/día).

4.4. Ensayo del cometa

El ensayo del cometa realizado en condiciones alcalinas detecta roturas de simple y doble cadena y sitios álcali-lábiles, lo que en nuestro estudio hemos denominado daño basal SSB-ALS. Por otro lado, para detectar el daño oxidativo, se incubaron las muestras con las enzimas EndoIII y FPG que reconocen pirimidinas y purinas oxidadas, respectivamente. El análisis de cada enzima se realizó por separado, calculándose el daño neto correspondiente a purinas y pirimidinas oxidadas.

En primer lugar y considerando la gran variabilidad del ensayo del cometa, y para permitir una asociación del daño genético, tanto basal como oxidativo, entre las madres y sus hijos, los resultados del ensayo del cometa se corrigieron. Para ello se utilizó un factor de corrección para anular la variación entre experimentos, que fue calculado para cada experimento utilizando los controles externos incluidos en las láminas de *Gelbond*. Este factor se aplicó tanto para el daño basal como para el daño oxidativo.

La corrección se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe:

1. Se calculó la mediana de las medianas para el daño genético basal y para el daño oxidativo neto FPG y EndoIII de los controles externos de todos los experimentos.
2. Para cada experimento, se calculó el factor de corrección de cada tratamiento (Lisis, FPG y EndoIII) de la siguiente manera:
 - Se dividió la mediana general del daño basal calculada en el paso 1 por el valor del daño basal del control externo de cada experimento → Factor de corrección para el daño basal.
 - Se dividió la mediana general del valor neto FPG calculada en el paso 1 por el valor neto FPG del control negativo de cada experimento → Factor de corrección para neto FPG.
 - Se dividió la mediana general del neto EndoIII calculada en el paso 1 por el valor de neto EndoIII del control negativo de cada experimento → Factor de corrección para neto EndoIII.

Para calcular los valores experimentales corregidos para cada muestra (madres y sus neonatos), se procedió de la siguiente manera:

- El valor experimental del daño genético basal de cada individuo se multiplicó por el factor de corrección para el daño, calculado en el paso 2, correspondiente a cada experimento.
- El valor experimental del valor neto FPG (purinas oxidadas) y el valor experimental del valor neto EndoIII (pirimidinas oxidadas) de cada individuo se multiplicaron por el factor de corrección para neto FPG y neto EndoIII, calculado en el paso 2, correspondiente a cada experimento.

Después de la corrección, los datos tienden a comportarse de manera más homogénea entre experimentos. En la Figura 16 se muestra la dispersión de los controles negativos externos (0 Gy) en cada experimento, lo que demuestra que la variabilidad entre cada experimento viene determinada por las condiciones del mismo, y no por las características propias de cada individuo.

Los valores netos del daño oxidativo correspondiente a cada enzima (FPG y EndoIII) se obtuvieron restando el valor del daño genético obtenido con el tampón, del valor correspondiente a cada enzima.

En segundo lugar, el resultado para los daños detectados mediante el ensayo del cometa se expresó, además de como el % DNA en la cola, también como frecuencia de roturas por 10^9 Da de DNA. Para ello se utilizó la curva de calibración del ensayo del cometa establecida para optimizar este ensayo en nuestro laboratorio. Entre las numerosas investigaciones realizadas utilizando el ensayo del cometa, un alto porcentaje de ellas se ha dedicado a la calibración de esta técnica dada la eficiencia de la radiación gamma para inducir roturas en el DNA. Así, el establecimiento de una curva de calibración en cada laboratorio para el ensayo del cometa permite expresar el daño en frecuencia de roturas en el DNA, o en otras unidades, lo que facilita comparaciones entre laboratorios.

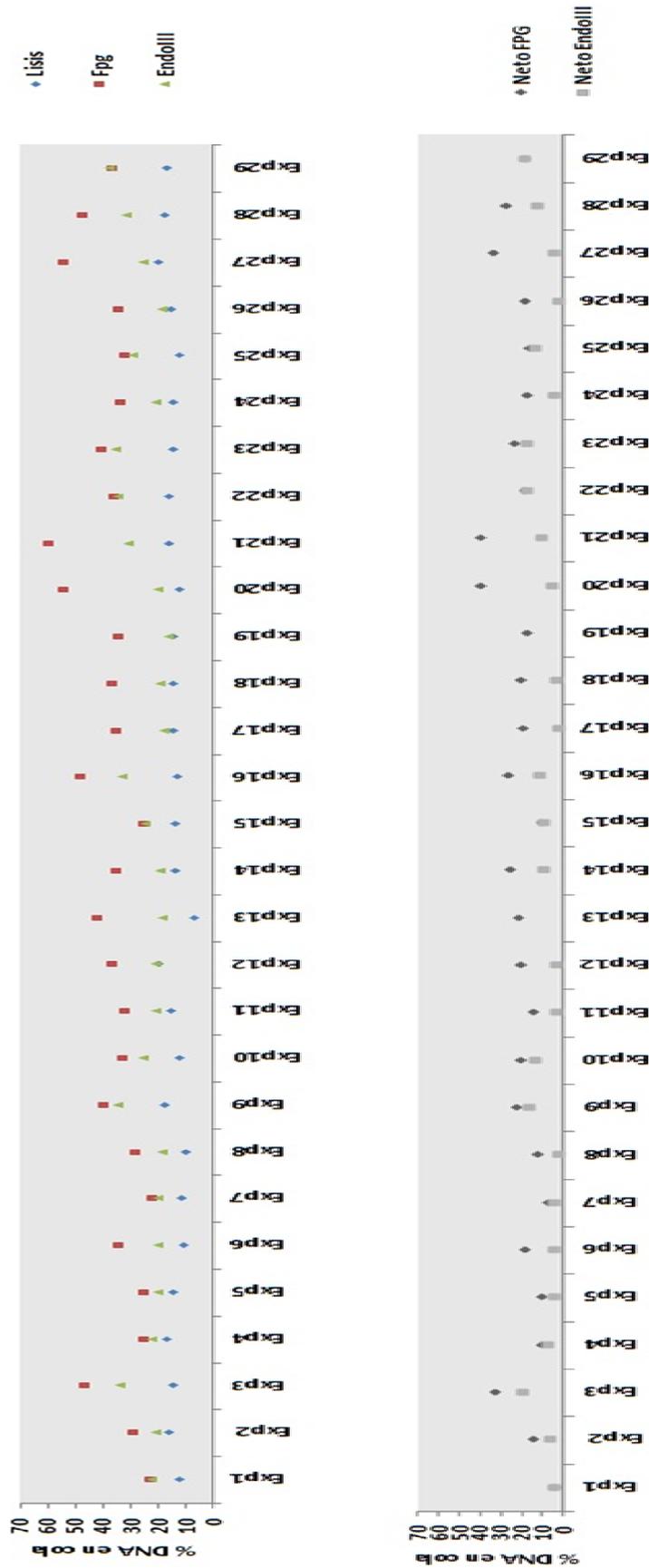


Figura 16. a) gráfico de los valores medios de daño basal (Lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) del control negativo externo (0 Gy) incluido en cada uno de los experimentos. b) gráfico de los netos del daño oxidativo (neto FPG y neto EndoIII) del control negativo externo (0 Gy) incluido en cada uno de los experimentos.

La curva de frecuencia de roturas (Figura 17) se construyó irradiando células control (linfocitos humanos) con una batería de dosis de irradiaciones (0 Gy- 8 Gy) para inducir roturas de doble cadena. Hay que destacar que las curvas de calibración son tan sólo válidas para el mismo laboratorio, utilizando la misma versión del ensayo del cometa y bajo las mismas condiciones.

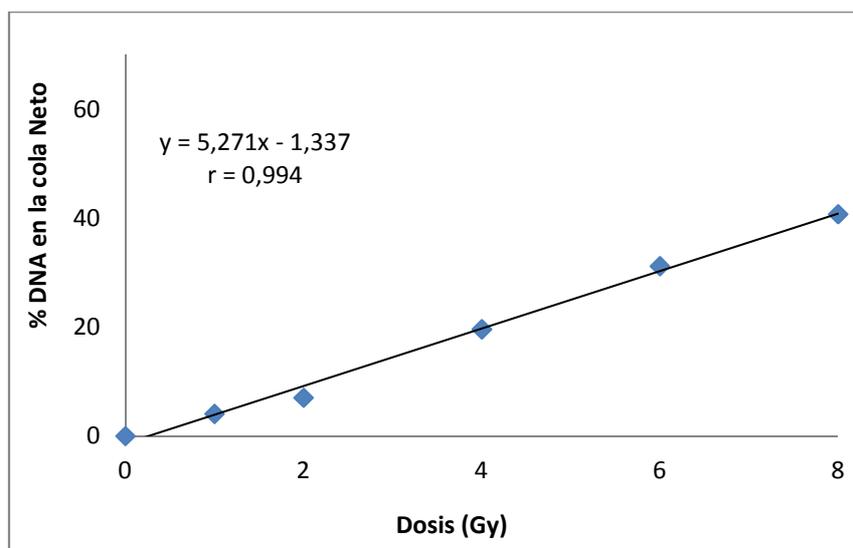


Figura 17. Curva general dosis-respuesta. Los valores se expresan en % DNA en la cola neto (el nivel basal corresponde a la dosis = 0, y fue sustraído a cada uno de los valores de irradiación). Se indica el coeficiente de correlación y el ajuste de la ecuación matemática.

A partir de la curva de calibración del ensayo del cometa, el daño genético neto detectado después de una irradiación a 8 Gy corresponde a un porcentaje de DNA en la cola de 40,76.

Según la literatura (Ahnström y Edvardsson, 1974) 1 Gy induce aproximadamente 0,31 roturas/ 10^9 Da de DNA. Lo que significa que a 8 Gy, la frecuencia de roturas es de 2,48 roturas/ 10^9 Da de DNA. Estos valores nos sirven para realizar los siguientes cálculos:

- *Frecuencia neta de roturas a 8 Gy:*
 $8 \text{ Gy} \times 0,31 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da de DNA/Gy} = 2,48 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da de DNA}$
- *Ecuación para el cálculo de la frecuencia de roturas / % DNA en la cola:*
 $(2,48/10^9 \text{ Da DNA}) / (40,76\% \text{ DNA en la cola}) = 0,061 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da DNA}.$

Según este cálculo, un 1% DNA en la cola es equivalente a 0,061 roturas/ 10^9 Da de DNA.

4.4.1. Daño genético basal en el DNA de las madres y sus recién nacidos

En la Tabla 9 se representan los resultados correspondientes al ensayo del cometa para el daño genético basal expresado en %DNA en cola y en roturas/ 10^9 Da, antes y después de corregir los datos con los factores de corrección calculados anteriormente.

Tabla 9. Daño genético basal en el DNA de los linfocitos de las madres y sus recién nacidos analizados con el ensayo del cometa antes y después de corregir los datos. Los valores están expresados en % DNA en cola y en roturas en el DNA por 10^9 Da. Los valores indican medias (ET).

	Recién nacidos		Madres		P
	% DNA en cola	Roturas / 10^9 Da	% DNA en cola	Roturas / 10^9 Da	
Daño genético basal (Antes de la corrección)	13,50 ± 0,24	0,82 ± 0,01	14,85 ± 0,27	0,90 ± 0,16	<0,001
Daño genético basal (Después de la corrección)	13,66 ± 0,24	0,83 ± 0,01	15,09 ± 0,30	0,92 ± 0,01	<0,001

** Diferencias significativas respecto al daño genético basal entre madres e hijos (prueba *Wilcoxon*, $P < 0,01$).

Según el análisis estadístico, se ve que el daño genético observado en las madres (14,85% DNA en la cola) es significativamente mayor que el daño observado en sus recién nacidos ($P < 0,001$), tanto antes como después de la corrección de los valores.

Con el objetivo de visualizar y establecer la relación entre el daño observado en madres e hijos, se han elaborado los gráficos de la Figura 18. En éstos se representan los valores del %DNA en la cola antes y después de la normalización con los factores de corrección, determinándose el coeficiente de correlación de *Spearman* para cada caso. En esta Figura se observa una fuerte

relación entre los niveles de daño genético de las madres con respecto al observado en sus hijos, siendo estos valores estadísticamente significativos al nivel de 0,05. Así, los valores observados para la R de *Spearman*, antes de la normalización y después, son ($R_s=0,466$ $P<0,01$) y ($R_s=0,51$ $P<0,01$), respectivamente.

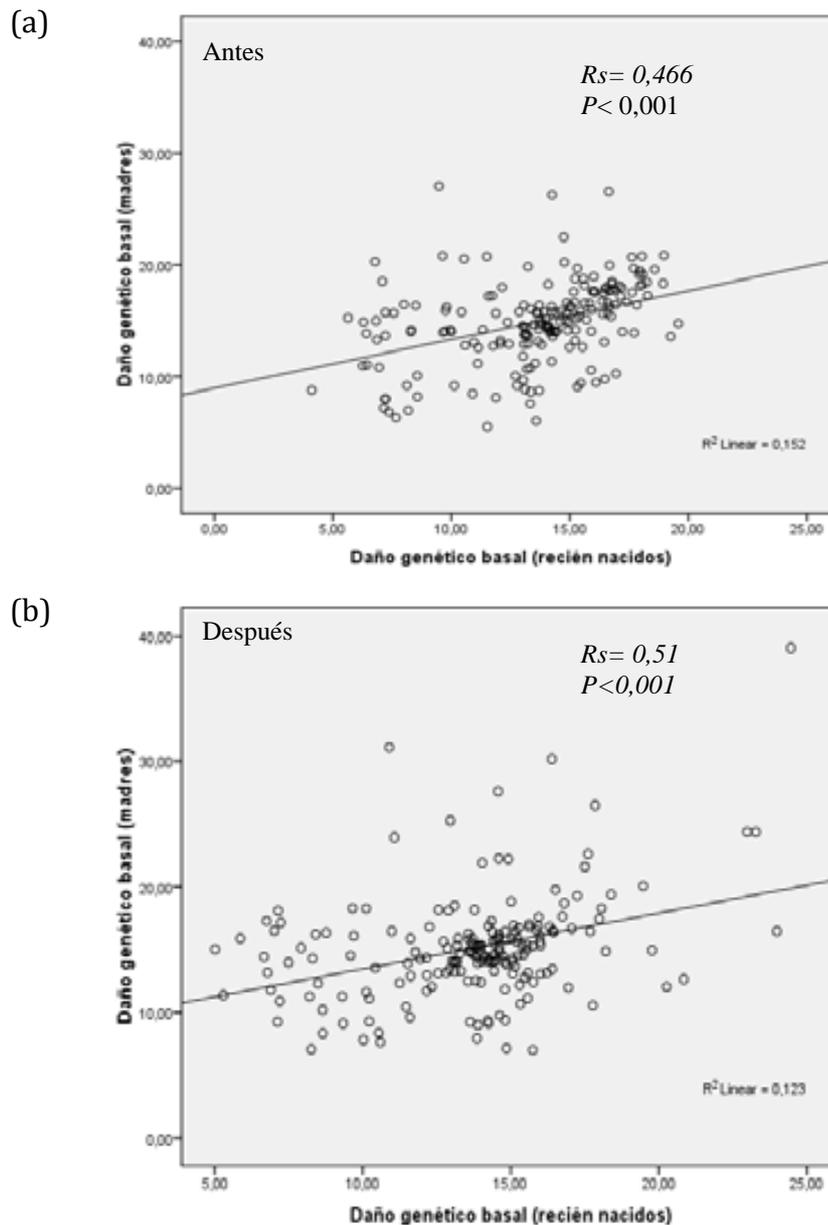


Figura 18. Relación entre daño genético basal en madres y en sus recién nacidos antes (a) y después (b) de corregir los datos. Los puntos indican las medias de daño genético basal.

4.4.2. Daño oxidativo en el DNA de las madres y sus recién nacidos

En la Tabla 10, se presentan los valores del daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) detectado por las enzimas FPG y EndoIII, respectivamente. Estos valores se indican tanto para las madres como para sus recién nacidos y se expresan como %DNA en cola y como roturas/ 10^9 Da de DNA. Según la prueba no-paramétrica de *Wilcoxon* para muestras relacionadas, se constata que las madres presentan un daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) significativamente superior al de los recién nacidos ($P < 0,001$).

Tabla 10. Daño oxidativo en el DNA de los linfocitos de las madres y sus recién nacidos analizados con el ensayo del cometa, después de corregir los datos. Los valores están expresados en % DNA en la cola y en roturas en el DNA por 10^9 Da. Los valores indican medias \pm ET.

	Recién nacidos		Madres	
	% DNA en cola	Roturas / 10^9 Da	% DNA en cola	Roturas / 10^9 Da
Neto purinas oxidadas (FPG) **	18,90 \pm 0,75	1,15 \pm 0,07	25,00 \pm 0,92	1,52 \pm 0,11
Neto pirimidinas oxidadas (EndoIII) **	5,67 \pm 1,06	0,34 \pm 0,00	8,09 \pm 1,12	0,49 \pm 0,02

** Diferencias significativas respecto al daño neto FPG y neto EndoIII entre madres e hijos (prueba *Wilcoxon*, $P < 0,01$).

En la Figura 19, se muestra la relación entre los niveles de daño oxidativo detectado con la FPG (purinas oxidadas) y con la EndoIII (pirimidinas oxidadas) entre madres y sus hijos, después de corregir los valores.

Según el coeficiente de correlación de *Spearman*, se observó una fuerte correlación entre el daño oxidativo detectado con la enzima FPG y EndoIII en madres y sus recién nacidos, tanto antes de la corrección (Figura no mostrada) ($R_s = 0,38$ purinas oxidadas y $R_s = 0,53$ pirimidinas oxidadas) como después de la corrección ($R_s = 0,52$ purinas oxidadas y $R_s = 0,22$ pirimidinas oxidadas).

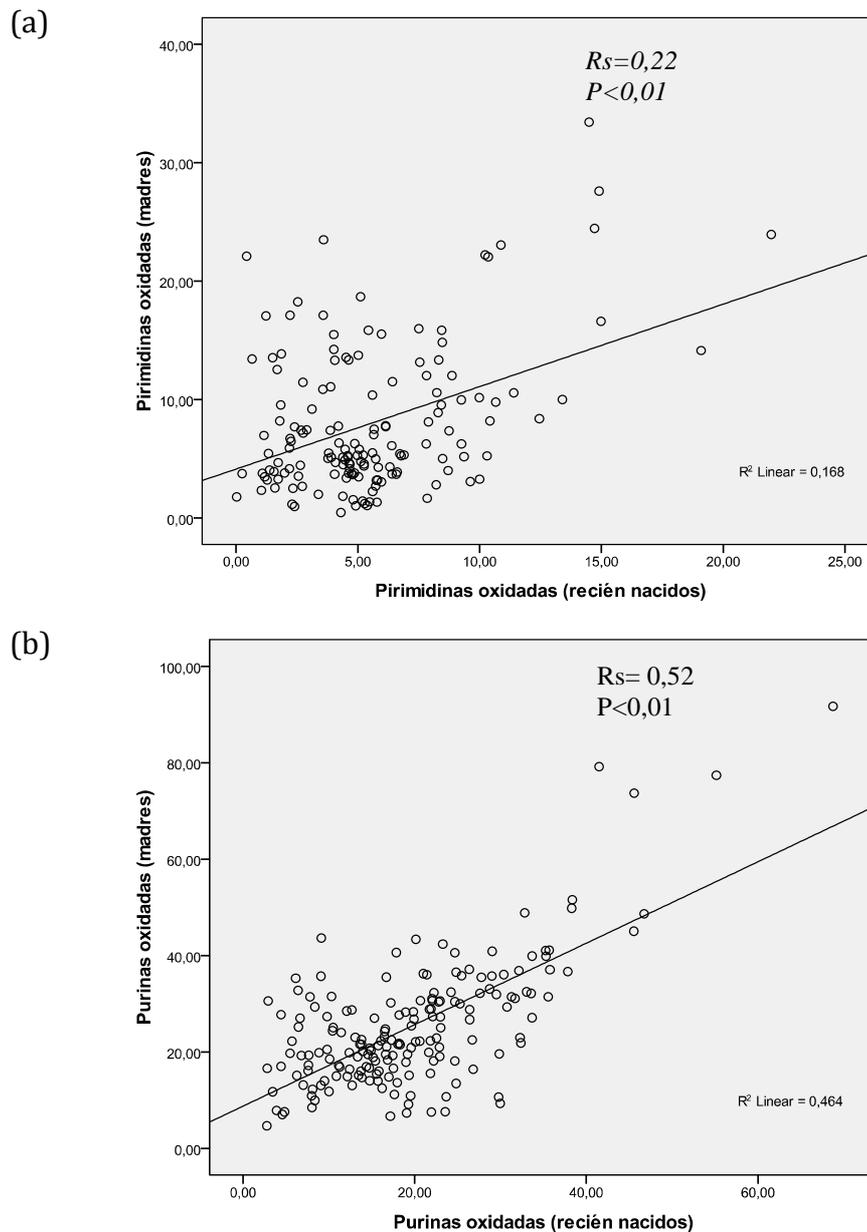


Figura 19. Relación entre el daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) detectado con la FPG y EndoIII en madres y sus recién nacidos, después de corregir los datos. Los puntos indican las medias de daño oxidativo.

4.4.3. Capacidad de reparación en las madres y sus recién nacidos

Para evaluar la capacidad de reparar las lesiones en el DNA de los participantes en el estudio, se ha trabajado con extractos proteicos obtenidos de los linfocitos. La capacidad de reparar se ha medido frente a su tipo específico de daño (8-oxoG), obtenidos tras el tratamiento con el agente fotosensibilizador Ro 19-8022, a una concentración de $2 \mu\text{M}$ seguido con una exposición a la luz visible.

Este compuesto es capaz de oxidar específicamente la guanina y producir 8-oxoG. Los extractos de linfocitos, tanto de madres como de hijos, se incubaron con células tratadas (2 Ro) y no tratadas (0 Ro) para determinar su efecto. En paralelo se llevaron a cabo un control positivo con la FPG diluida en el tampón F y otro negativo con el tampón A diluido en el tampón F.

La capacidad de las muestras para detectar bases oxidadas (especialmente 8-oxoG) se valora comparando los niveles del daño genético después de incubar los extractos con células no tratadas (0 Ro), tratadas con FPG (control positivo), tratadas con tampón F (control negativo) y tratadas con el agente fotosensibilizador (2 Ro). Los resultados se indican en la Tabla 11.

Tabla 11. Daño genético en los linfocitos irradiados con (Ro 2 μ M+luz) tras la co-incubación con los extractos proteicos de los distintos participantes en el estudio. Los datos se expresan como % DNA en la cola \pm SD.

	Tampón A	FPG ^a	Extracto proteico ^{a,b}
Recién nacidos (n=128)	4,29 \pm 1,24	53,01 \pm 11,95	16,56 \pm 5,16
Madres (n=118)	4,42 \pm 1,21	54,11 \pm 11,66	11,02 \pm 4,58

^a Diferencias significativas respecto al tampón A (control negativo). ^b Diferencias significativas entre los hijos y sus madres (Prueba *Wilcoxon*, $P < 0,01$).

La capacidad de la FPG de revelar los sitios oxidados es significativamente alta respecto la capacidad del control negativo (tampón A) ($P < 0,001$), lo que indica que la enzima funcionó correctamente siendo una enzima capaz de detectar el daño 8-oxoG inducido por el tratamiento (Ro + luz visible).

Comparando la capacidad de reparar del extracto proteico obtenido de madres y sus recién nacidos con el control negativo (tampón A), se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$).

Para estudiar la capacidad de reparación en función del contenido proteico de las muestras, se relativizó a unos niveles de 100 μ g de proteína/mL. Para ello, se determinó el contenido de cada muestra en proteínas totales (μ g/mL) y una vez

finalizada la estimación para cada muestra, se dividió la capacidad de reparación (expresada en % DNA en la cola) por el contenido en proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada muestra, multiplicado por 100.

En la Figura 20, se muestra la distribución de la capacidad de reparación expresada en 100 μg de proteína/mL en las madres y en sus hijos. Las medias (\pm ET) de madres e hijos son $2,21\pm 0,167$ y $2,25\pm 0,17$ respectivamente; presentando unos valores de mediana de 1,57 y 2,12. Por tanto, la capacidad de reparación del daño genético en los recién nacidos es significativamente superior a la que presentan sus madres (prueba *Wilcoxon* $P < 0,05$).

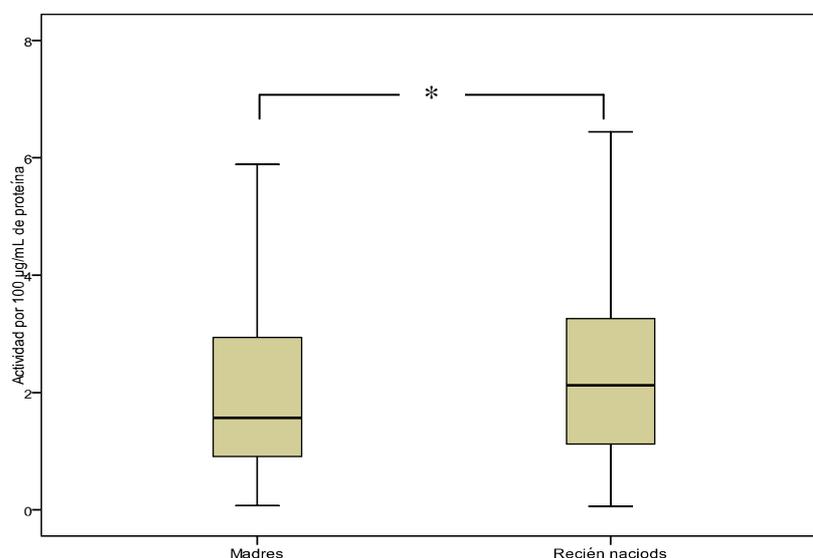


Figura 20. Capacidad de reparación expresada en actividad por 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína en madres y sus recién nacidos. * Diferencias significativas $P < 0,05$ (prueba *Wilcoxon* 1 muestras relacionadas).

Cuando se comparan las capacidades de reparar el daño oxidativo en las madres, con respecto a las de sus hijos, se obtiene la relación que se expresa en la Figura 21, donde se muestra la relación entre las madres y sus hijos respecto a la capacidad de sus extractos proteicos en reparar el daño oxidativo en los substratos tratados con Ro ($2 \mu\text{M}$) y luz visible.

Según el coeficiente de correlación de *Spearman*, existe una clara relación entre la capacidad de reparar de las madres con respecto a la de sus hijos, siendo ésta estadísticamente significativa ($P < 0,01$).

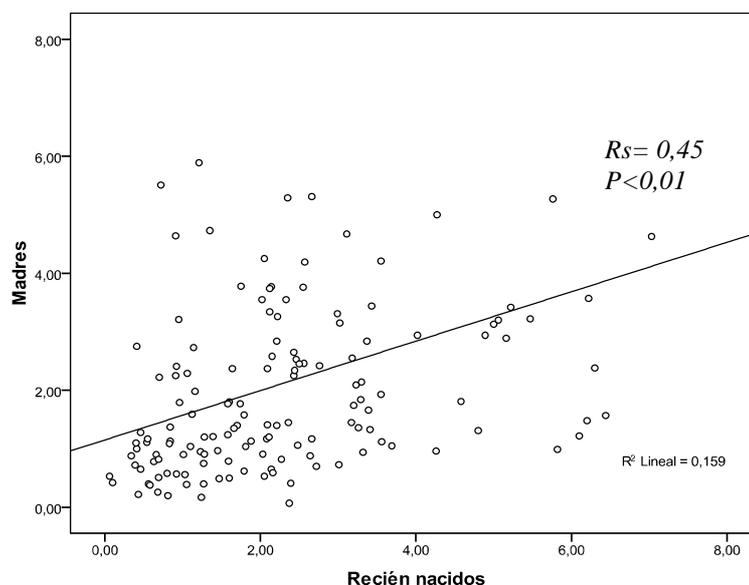


Figura 21. Relación madres vs hijos según la capacidad de reparación. La R de *Spearman* muestra un valor de $P < 0,01$.

4.5. Control de los factores de confusión

4.5.1. Daño genético basal y distintas características de la población

La variabilidad intra- e interindividual en las muestras de linfocitos humanos es ampliamente reconocida. Por lo tanto, en este trabajo se han estudiado diversos factores de confusión cuyo papel pudiera justificar la aparición de tal variabilidad. Las características de las madres (edad, *pre-IMC*, etnia, partos previos, temporada del parto y exposición al tabaco) fueron los factores en los que se estudió su posible papel modulador de los niveles de daño observados en el DNA.

4.5.1.1. Edad de las madres

El efecto de la edad de un individuo en los niveles de daño observado en el ensayo del cometa, ha sido uno de los factores de confusión más polémicos que se

ha tenido en cuenta en los análisis estadísticos que se han llevado a cabo en la mayoría de los estudios de biomonitorización, con resultados generalmente contradictorios.

En nuestro estudio, y dado que la población de las madres estudiada pertenecen a grupos de edades diferentes, consideraremos la edad como un factor de confusión que pudiera tener alguna relación con los niveles del daño en el DNA observado, tanto en las madres como en sus recién nacidos. En la Tabla 12 se presentan los valores del daño genético basal en el DNA de las madres y sus hijos según la edad de las madres.

Tabla 12. Daño genético basal en el DNA de las madres y sus recién nacidos, según la edad de las madres. Los datos se expresan como % DNA en la cola \pm ET.

Edad (años)	Daño genético basal		<i>P</i> ^b
	Madres	Recién nacidos ^a	
<27	14,99 \pm 0,5	12,92 \pm 0,37	0,005
27-33	15,29 \pm 0,5	13,27 \pm 0,42	0,002
>33	14,99 \pm 0,6	14,45 \pm 0,44	0,064

^a Diferencias significativas entre los hijos respecto a las características de las madres, ^b Comparación entre madres y sus recién nacidos prueba no paramétrica de *Wilcoxon* para muestras relacionadas ($P < 0,05$).

No hay diferencias significativas entre los tres grupos de madres según la edad. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los recién nacidos respecto a la edad de sus madres; el daño genético basal en los hijos de madres de edad menor de 27 años es significativamente inferior al nivel de daño genético en los recién nacidos de madres de edad superior a 33 años.

Por otra parte, según al análisis estadístico, el daño genético en las madres es significativamente mayor que en sus hijos (prueba *Wilcoxon*, $P < 0,05$), lo que concuerda con lo encontrado anteriormente. Un estudio de regresión del nivel de daño basal en las madres con respecto a su edad, no indicó diferencias

significativas ($R^2= 0,001$; $P>0,05$). Esto está de acuerdo con varios estudios realizados sobre poblaciones de individuos sanos donde no se observó ningún efecto de la edad sobre el nivel basal de daño en el DNA (Singh *et al.*, 1990, Pitarque *et al.*, 1999). Al contrario, en sus recién nacidos, se observa una relación significativa entre el daño basal y la edad de las madres ($R^2=0,033$; $B=1,32$; $P<0,05$).

4.5.1.2. Índice de masa corporal (*pre-IMC*)

El IMC es un parámetro al que últimamente se le está prestando atención debido a la creciente epidemia de obesidad, y que ésta es un factor de riesgo para enfermedades crónicas como la ECV, la diabetes y algunos tipos de cánceres como el de endometrio, de mama y de colon (OMS, 2006). Por lo tanto es un parámetro que se toma en cuenta para la evaluación de los riesgos durante el embarazo. En la Tabla 13, se representa la distribución de los niveles de daño genético de las madres y de sus recién nacidos según el *pre-IMC* de las madres.

Tabla 13. Daño genético basal en el DNA de las madres y sus recién nacidos según el *pre-IMC* de las madres. Los datos se expresan como % DNA en la cola (ET).

<i>pre-IMC</i> (Kg/m ²)	Daño genético basal		<i>P</i> ^b
	Madres ^a	Recién nacidos ^a	
≤24,12	15,54 ± 0,44	13,78 ± 0,3	0,001
>24,12	13,78 ± 0,43	12,58 ± 0,37	0,050

^a Diferencias significativas respecto a las características de las madres. ^b Comparación entre madres y sus recién nacidos, prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas ($P<0,05$).

En el grupo de madres con un *pre-IMC* inferior a 24,12 Kg/m², la comparación de las medias entre madres y sus hijos muestra nuevamente que el daño genético de las madres es significativamente más alto que el de sus hijos ($P<0,05$). Lo mismo se observó en el grupo de madres con un *pre-IMC* superior a dicho valor.

Se constató también que el daño genético de las madres con un *pre-IMC* igual o inferior a 24,12 (Kg/m²) es significativamente más alto que el de aquellas con un *pre-IMC* superior a dicho valor, encontrándose una asociación negativa entre los valores de *pre-IMC* y el daño genético en madres ($R^2= 0,029$ $B= -1,309$ $P= 0,027$). Esto concuerda con el estudio de Mizoue *et al.* (2007). Por lo que respecta a los recién nacidos, la comparación de las medias ha mostrado también diferencias significativas en los niveles de daño genético en función del valor *pre-IMC* de sus madres ($P<0,05$) con una asociación negativa entre los valores del *pre-IMC* y su daño genético basal ($R^2= 0,023$ $B= -1,11$ $P= 0,037$).

4.5.1.3. Etnia de las madres

Dado que la población estudiada es heterogénea con respecto a la etnia de las madres, éste podría ser un factor de confusión que modulara los niveles del daño en el DNA. En la Tabla 14, se indica la distribución de los niveles de daño genético en madres y en sus recién nacidos, según el grupo étnico de las madres. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en los niveles de daño genético entre las madres de etnias diferentes, al igual que entre sus recién nacidos según la etnia. Sin embargo, cuando se hizo la comparación entre madres y sus hijos, se observaron diferencias significativas dependiendo de la etnia. Así, el daño en las madres fue más elevado en el grupo de caucásicas y de latinoamericanas que en sus hijos ($P<0,05$), mientras que no se observaron diferencias significativas en el resto de las etnias ($P>0,05$).

Tabla 14. Daño genético basal en el DNA de las madres y sus recién nacidos según la etnia de las madres. Los datos se expresan como % DNA en la cola \pm ET.

Etnia	Daño genético basal		P^a
	Madres	Hijos	
Caucásica	14,93 \pm 0,45	13,75 \pm 0,43	0,002
Latinoamericana	16,40 \pm 0,79	14,64 \pm 0,60	0,013
Asiática	14,62 \pm 1,01	13,67 \pm 0,51	0,131
Norte África	14,97 \pm 0,69	13,12 \pm 0,75	0,084
Otras	13,96 \pm 0,75	13,28 \pm 0,79	0,065

^a comparación entre madres y sus recién nacidos, prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas ($P<0,05$).

4.5.1.4. Exposición al tabaco

Dado el contenido de carcinógenos potenciales en el humo del tabaco, el hábito de fumar podría modular los niveles de daño genético. Es por esta razón que hemos introducido este factor entre los estudiados. En la Figura 22 se muestra la distribución de los niveles de daño genético en madres según su exposición ambiental al humo del tabaco. Dado que los recién nacidos podrían estar amenazados por los efectos de una exposición al humo de tabaco, ya sea directamente o indirectamente, también se analizaron sus niveles de daño genético según la exposición materna al tabaco.

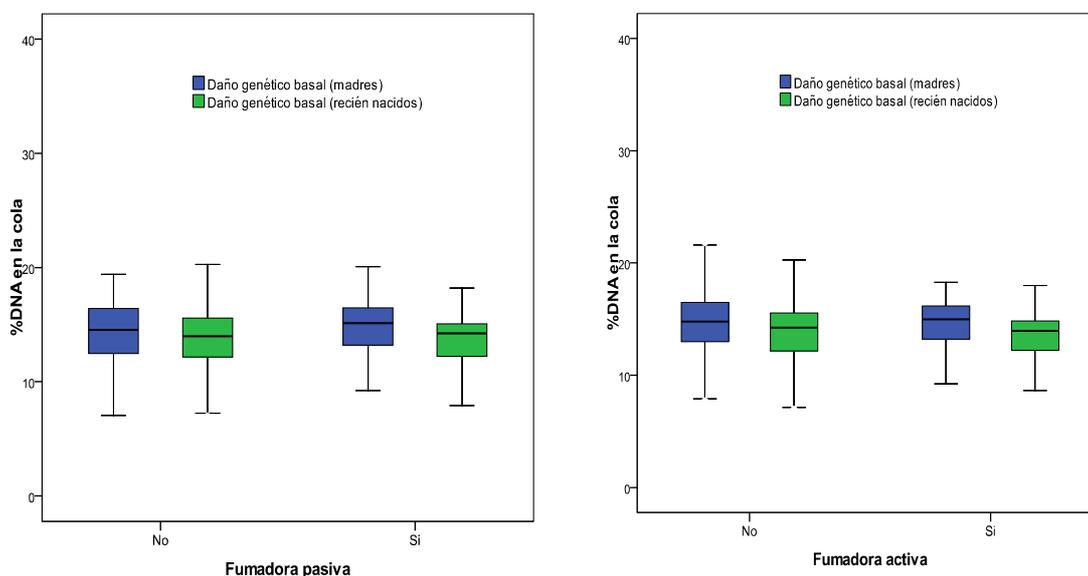


Figura 22. Distribución del daño genético en las madres y sus recién nacidos según la exposición al humo del tabaco (fumadora pasiva y activa). Los valores son medias \pm ET.

Al comparar los niveles del daño genético basal en madres y sus recién nacidos respecto a la exposición al tabaco, no se ha observado ninguna diferencia significativa entre las madres expuestas y no expuestas ($P > 0,05$). Lo mismo se observó para los recién nacidos.

4.5.1.5. Otros factores de confusión

Además de los factores indicados, hay que señalar que en nuestra población existen otros factores que pudieran afectar tanto el embarazo como su resultado. Nos hemos fijado principalmente en la temporada del parto, el PEG y el número de partos previos.

En la Figura 23, se muestra la distribución de los niveles del daño genético en madres y sus hijos según la temporada del parto. Analizando el efecto de este factor sobre los niveles de daño genético, tanto en madres como en sus hijos; sorprende el hecho de que se han observado diferencias significativas entre los niveles de daño genético basal en los recién nacidos según hayan nacido en verano, otoño, primavera o invierno (prueba de *Kruskal Wallis* $P=0,038$); siendo el nivel de daño en los hijos que han nacido en otoño significativamente más elevado (prueba *Mann Whithney* $P<0,05$) que en los que han nacido en las otras estaciones. Por lo que respecta a los niveles de daño en las madres éste no está relacionado con la temporada del parto.

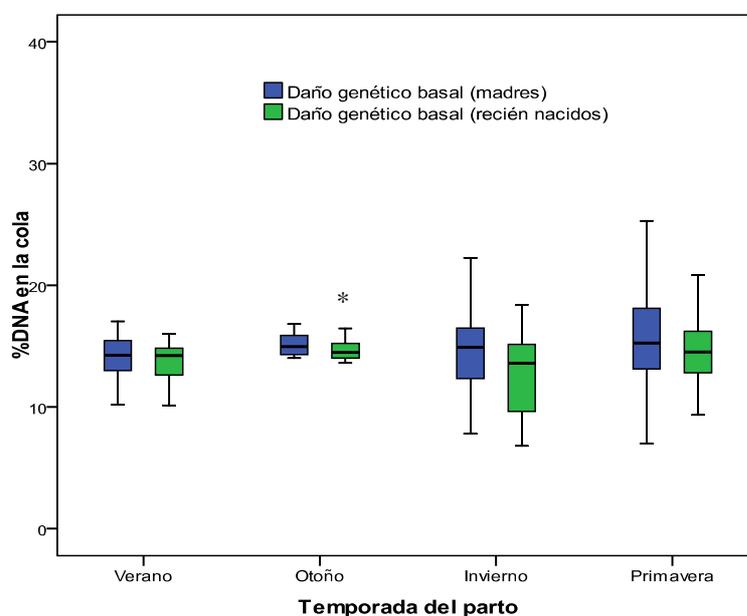


Figura 23. Distribución del daño genético en el DNA de las madres y sus recién nacidos según la temporada del parto. Los valores son medias \pm ET.

Al analizar el papel de PEG se observó que existen diferencias significativas en los niveles de daño genético basal entre las madres y también entre los recién nacidos. Un PEG bajo se caracterizó por unos niveles de daño genético basal estadísticamente inferior ($P < 0,05$), tanto en madres como en sus hijos, respecto a un peso óptimo (Figura 24).

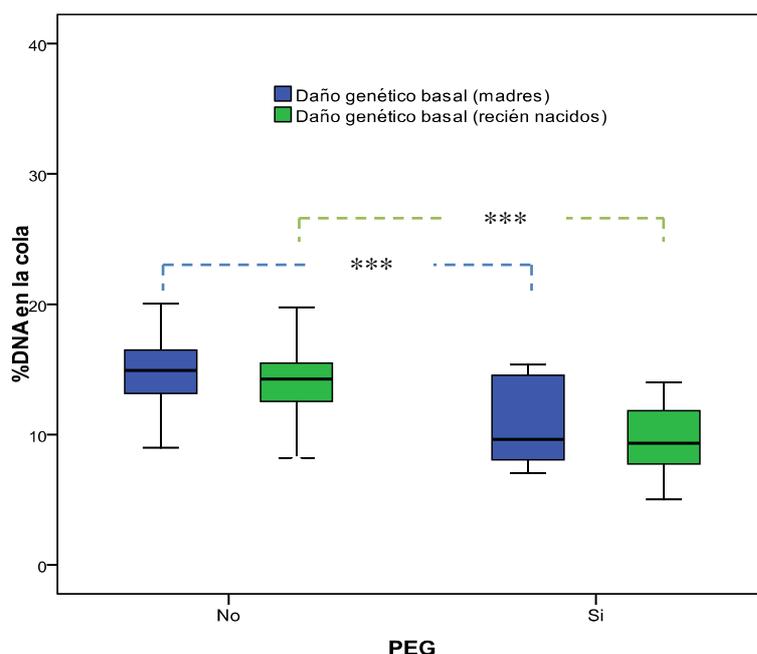


Figura 24: Distribución del daño genético basal en las madres y sus recién nacidos según el PEG. Los valores son medias \pm ET. * Diferencias significativas, prueba no paramétrica de Mann Whitney ($P < 0,05$).

Por otra parte, respecto al número de partos previos, no se observó ninguna diferencia en los niveles de daño genético entre las madres. Sin embargo se constataron diferencias significativas ($P = 0,04$) en los niveles de daño genético basal entre los recién nacidos respecto a este factor (Figura 25). Se puede suponer que el ser el primer hijo, el nivel de daño genético basal es mayor comparado con los demás.

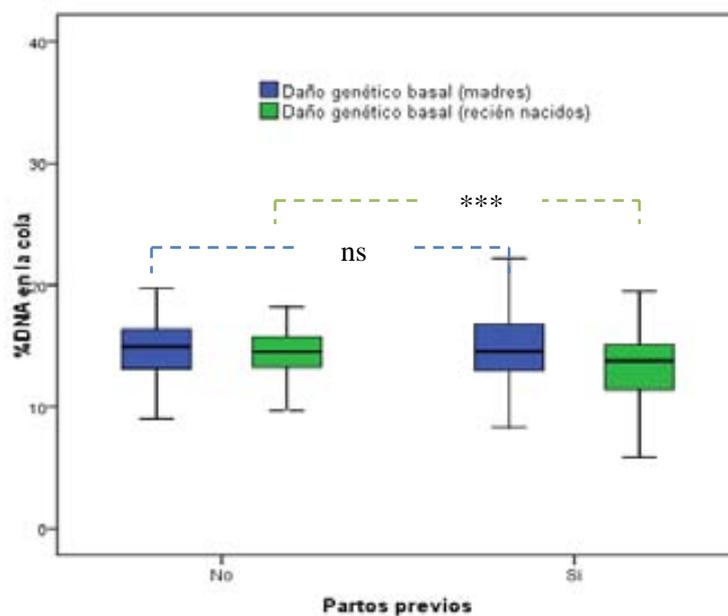


Figura 25: Distribución del daño genético basal en los recién nacidos según partos previos. Los valores son medias \pm ET. * Diferencias significativas, prueba no paramétrica de *Mann Whitney* $P < 0,05$). *ns* Diferencias no significativas.

Después del análisis de los factores de confusión relacionados con las características de las madres, independientemente, y para averiguar los factores de confusión moduladores del daño genético se ha llevado a cabo un análisis de regresión lineal univariante. En este modelo se consideraron los factores de confusión analizados anteriormente.

Dado que el número de madres fumadoras es muy pequeño, este factor se ha excluido de este análisis. Los resultados del análisis quedan reflejados en la Tabla 15, donde se aprecia que, a pesar de las diferencias observadas, el *pre-IMC* es un factor que puede afectar los niveles de daño genético en las madres ($B = -1,80$; $P = 0,022$). Por otra parte, la edad de las madres está relacionada con el daño genético basal en los recién nacidos.

Tabla 15. Análisis de regresión lineal univariante para el daño genético basal en el DNA de las madres y sus recién nacidos

Variable dependiente		B (ET)	P
Daño genético basal (madres)	<i>pre-IMC (Kg/m²)</i>	-1,805 (0,779)	0,022
Daño genético basal (recién nacidos)	Edad	0,95 (0,32)	0,004

4.5.2. Daño oxidativo y distintas características de la población

4.5.2.1. Edad de las madres

En la Tabla 16, se representan los valores del daño oxidativo en el DNA de las madres y de sus hijos, según la edad de las madres. Comparando los grupos entre sí, respecto a los niveles de daño oxidativo, se ha observado que el nivel de daño oxidativo detectado con la EndoIII (pirimidinas oxidadas) es significativamente mayor en madres de edad superior a 27 años ($P < 0,01$). Mientras que no hay diferencias significativas entre las madres en el daño oxidativo detectado con la FPG (purinas oxidadas).

Tabla 16. Daño oxidativo en el DNA de las madres y sus recién nacidos según la edad de las madres. Los datos se expresan como % DNA en la cola \pm ET.

	Madres		Recién nacidos	
	Purinas oxidadas	Pirimidinas oxidadas	Purinas oxidadas	Pirimidinas oxidadas
Edad (años)				
≤27	24,04 \pm 1,38	7,14 \pm 2,45*	20,26 \pm 1,04*	4,58 \pm 2,32*
27-33	26,28 \pm 1,84	8,23 \pm 1,75	20,45 \pm 1,58	6,33 \pm 1,76
>33	24,77 \pm 1,59	8,99 \pm 0,88	17,75 \pm 1,23	5,92 \pm 0,68

* Diferencias significativas respecto a las características de las madres (prueba no paramétrica de Wilcoxon $P < 0,05$).

Respecto a los neonatos, se han observado, diferencias significativas en los niveles de daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) entre los recién nacidos respecto a la edad de sus madres.

Por otro lado, comparando los niveles de daño oxidativo entre madres y sus recién nacidos, se observó que las madres poseen una media significativamente más alta en el nivel de daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) que los recién nacidos.

Según el análisis de regresión lineal se observa una asociación positiva, aunque modesta, entre la edad de las madres y su nivel de pirimidinas oxidadas ($B= 0,139$ $R= 0,178$ $P=0,021$). Por otra parte, se observa una asociación negativa entre la edad de las madres y el daño oxidativo de los recién nacidos, detectado con la FPG (purinas oxidadas) ($B= -0,156$ $R= 0,165$ $P=0,02$).

4.5.2.2. Índice de masa corporal (*pre-IMC*)

Al igual que el análisis anterior, realizado para estudiar la relación entre el IMC y el daño genético basal en las madres y sus hijos, se realizó un análisis para averiguar la relación entre el *pre-IMC* de las madres y sus niveles de daño oxidativo al igual que en sus recién nacidos. En la Tabla 17, se representan los valores del daño oxidativo detectado por la FPG y la EndoIII en las madres y sus recién nacidos según el *pre-IMC* de las madres.

Tabla 17. Daño oxidativo en el DNA de las madres y sus recién nacidos según la edad y el *pre-IMC* de las madres. Los datos se expresan en % DNA en la cola \pm ET.

	Madres		Recién nacidos	
	Purinas oxidadas	Pirimidinas oxidadas	Purinas oxidadas	Pirimidinas oxidadas
<i>pre-IMC</i> (Kg/m²)				
$\leq 24,12$	25,25 \pm 1,27	8,03 \pm 1,23	19,72 \pm 1,04*	5,85 \pm 1,30*
$> 24,12$	23,79 \pm 1,36	7,67 \pm 2,43	18,25 \pm 1,16	4,40 \pm 2,09

* Diferencias significativas respecto a las características de las madres (prueba no paramétrica de Wilcoxon $P < 0,05$).

Comparando los niveles de daño oxidativo entre las madres y sus hijos en cada grupo, se constata que en las madres los niveles de daño oxidativo son más elevados que en los recién nacidos.

Al observar los valores del daño oxidativo en las madres con un *pre-IMC* superior a 24,12 Kg/m² se puede constatar que éste es inferior al daño oxidativo observado en las madres con un *pre-IMC* inferior a dicho valor; sin embargo, esta diferencia resulta no ser significativa.

En los recién nacidos, la comparación de las medias ha mostrado diferencias significativas en su daño oxidativo, tanto en purinas como en pirimidinas oxidadas, con una asociación negativa entre este último parámetro (pirimidinas oxidadas) de los recién nacidos y el *pre-IMC* de sus madres ($B= -0,216 R =0,186 P= 0,021$).

4.5.2.3. Exposición al tabaco

En la Figura 26 se muestra la distribución de los niveles del daño oxidativo en madres según su exposición ambiental al humo del tabaco (fumadoras pasivas).

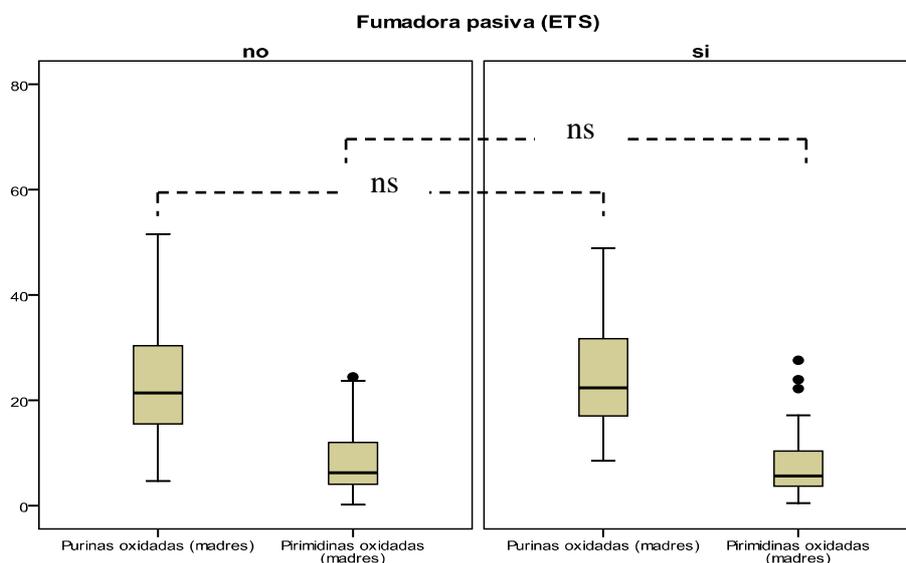


Figura 26. Distribución del daño oxidativo en las madres según la exposición al humo del tabaco (ETS). Los valores son medias \pm ET. ^{ns} Diferencias no significativas respecto a las características de las madres (prueba no paramétrica de *Wilcoxon* para muestras relacionadas ($P < 0,05$)).

La comparación de medias no ha mostrado diferencias significativas entre las madres en los niveles de su daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) ($P > 0,05$). Mientras que la comparación de medias entre los recién nacidos expuestos y no expuestos, a través de sus madres al humo del tabaco, ha mostrado ser significativa (purinas oxidadas) ($P = 0,035$) (Figura 27).

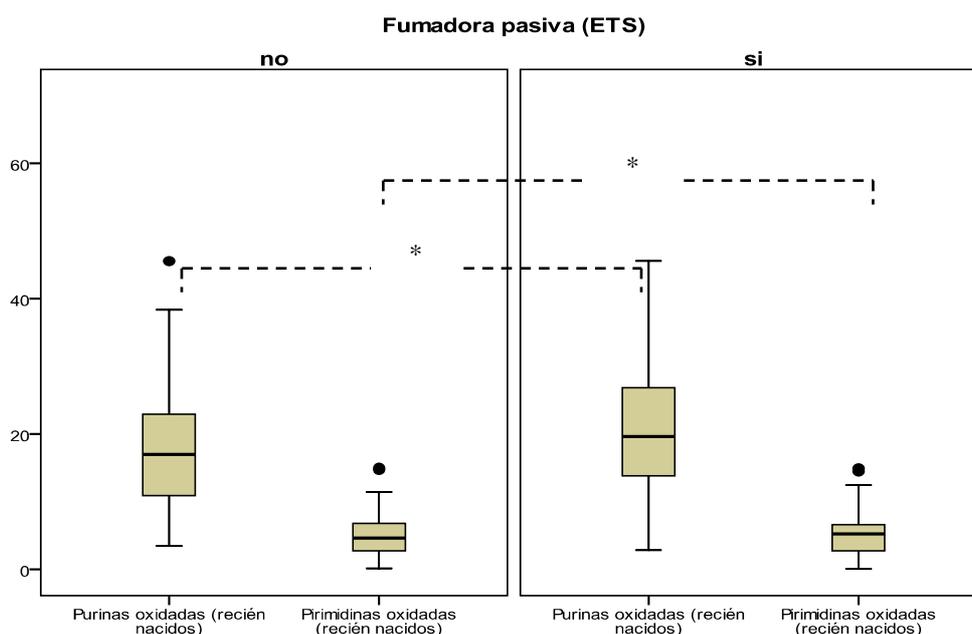


Figura 27: Distribución del daño oxidativo en los recién nacidos según la exposición al humo del tabaco (ETS). Los valores son medias \pm ET. * Diferencias significativas respecto a las características de las madres (prueba no paramétrica de *Wilcoxon* para muestras relacionadas ($P < 0,05$)).

De la misma manera, y a pesar del pequeño tamaño de la población de las fumadoras activas y el bajo número de cigarrillos consumidos por día, se analizó el nivel de daño oxidativo en el grupo de fumadoras activas durante el embarazo. Los resultados indican que las madres fumadoras no tienen un nivel de daño oxidativo más elevado que las madres no fumadoras. Lo mismo sucede cuando se analiza el daño oxidativo presente en sus recién nacidos.

4.5.2.4. Otros factores de confusión

Analizando el efecto de la temporada del parto, parece que hay diferencias significativas en lo que respecta al daño oxidativo entre las madres (purinas oxidadas $P= 0,04$ y pirimidinas oxidadas $P= 0,001$) según la temporada del parto. Los niveles del daño oxidativo en madres (purinas oxidadas) es más elevado en verano y otoño que en las otras estaciones, mientras que únicamente en verano el nivel de purinas oxidadas es más elevado en los recién nacidos. Respecto a las pirimidinas oxidadas, las madres presentan un nivel de oxidación muy elevado en otoño comparando con las otras estaciones, mientras que no se observó ninguna diferencia significativa entre sus recién nacido respecto al mismo (Figura 28).

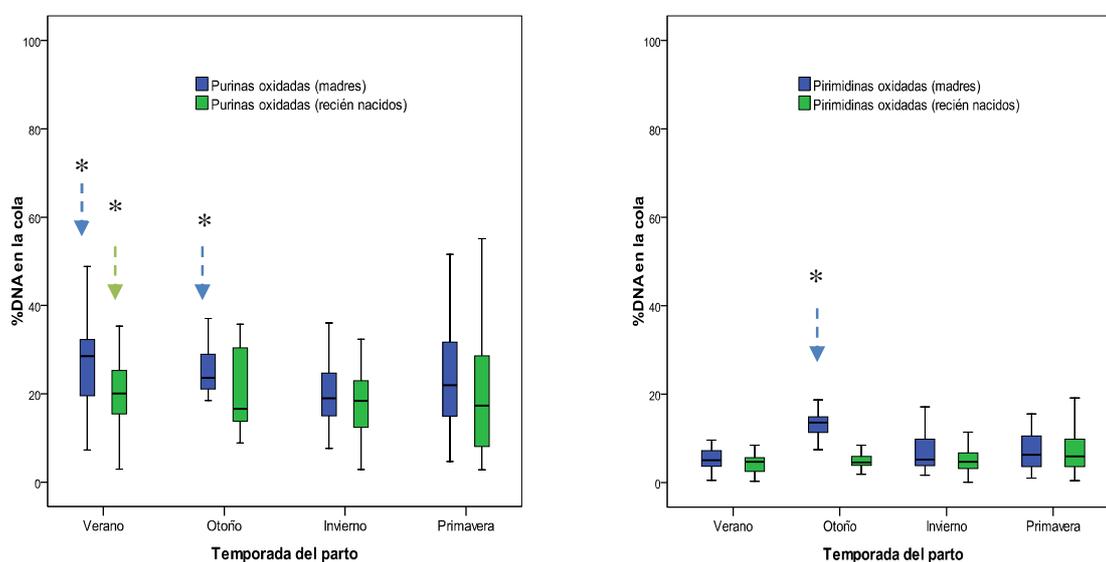


Figura 28. Distribución del daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) en las madres según la temporada del parto. Los valores son medias (ET). * Diferencias significativas ($P<0,05$) respecto a las otras estaciones.

Por otra parte, hemos constatado que el tiempo de gestación parece tener una relación con los niveles de daño oxidativo (purinas oxidadas) en los neonatos (Figura 29). Los recién nacidos prematuros (<37 semanas) presentan un nivel de daño oxidativo (purinas oxidadas) significativamente inferior al encontrado en los recién nacidos a término ($P<0,05$) al igual que en sus madres. No se ha observado ninguna diferencia en los niveles de pirimidinas oxidadas respecto a este factor en las madres-hijos.

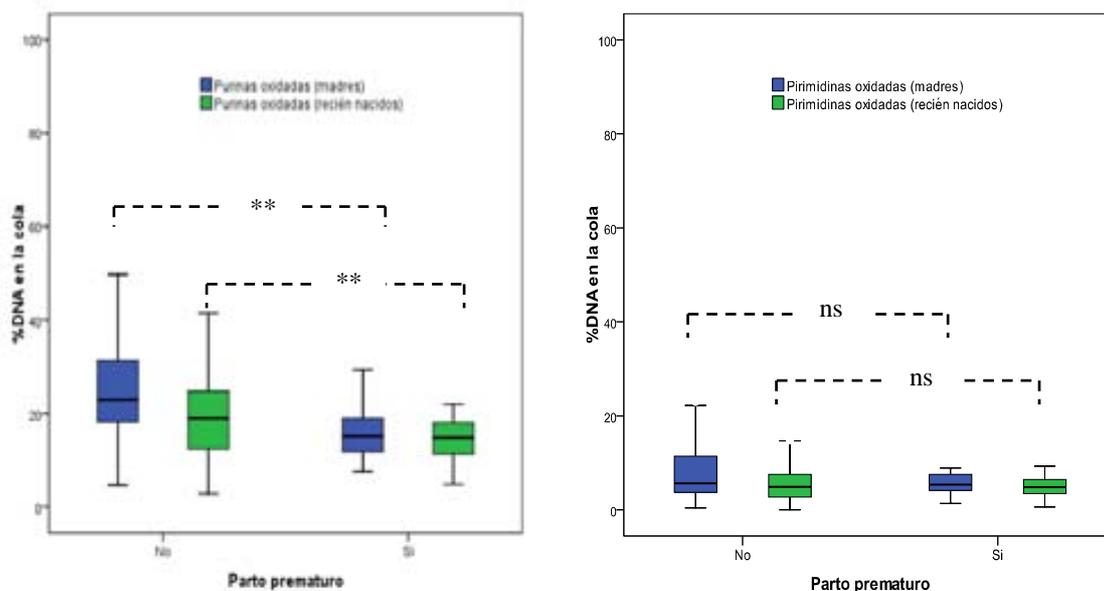


Figura 29. Distribución del daño oxidativo en los recién nacidos prematuros y a término. Los valores son medias \pm ET. * Diferencias significativas ($P < 0,05$).

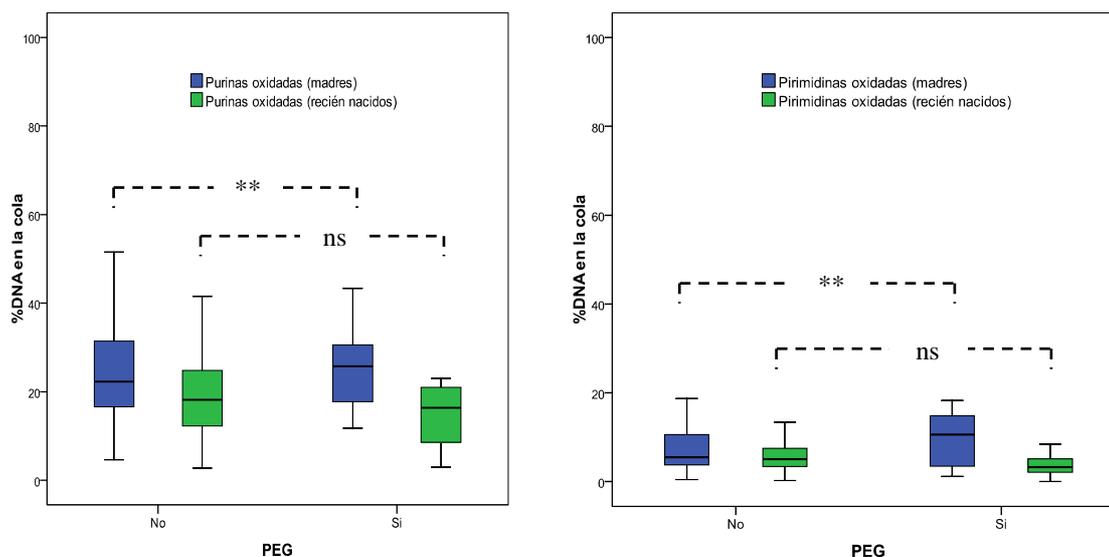


Figura 30: Distribución del daño oxidativo en las madres y sus recién nacidos según el PEG. Los valores son medias \pm ET. * Diferencias significativas ($P < 0,05$).

Las madres de los recién nacidos con un peso pequeño para su edad gestacional tienen un nivel de oxidación de purinas más elevado que las madres de recién nacidos con un peso óptimo. Lo mismo se ha observado respecto a las pirimidinas oxidadas en madres. Sin embargo, no se ha observado ninguna diferencia significativa entre los recién nacidos (Figura 30).

Después de analizar estos factores de confusión uno a uno, hemos construido un modelo estadístico para un análisis de regresión lineal múltiple con estos factores para poder destacar aquellos que efectivamente tienen un efecto sobre el daño genético analizado.

Según la Tabla. 18, la temporada del parto y la edad de las madres son dos factores de confusión que pueden afectar al nivel del daño oxidativo (purinas oxidadas) en las madres. Por otra parte la edad y el número de partos previos resultan ser un factor que puede afectar al nivel del daño oxidativo (pirimidinas oxidadas) en las mismas. Por lo tanto, la temporada del parto, partos prematuros, edad de la madre y el número de partos previos están relacionados con el daño oxidativo encontrado en las madres de la población estudiada.

Tabla 18. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño oxidativo en las madres.

Variable dependiente (Madres)		<i>B (SE)</i>	<i>P</i>	<i>R</i> ²
Purinas oxidadas	Temporada del parto	-0,08 (0,03)	0,007	0,116
	Parto prematuro	-0,33 (0,15)	0,019	
Pirimidinas oxidadas	Edad (madres)	0,22 (0,08)	0,005	0,104
	Parto previo	-0,27(0,12)	0,037	

Respecto a los recién nacidos, según el análisis de regresión lineal múltiple (Tabla 19), se observó que la edad y la temporada del parto son posibles factores que influyen en el daño oxidativo; purinas oxidadas ($B=-0,16$, $P=0,003$) ($B=-0,13$; $P=0,003$), mientras que sólo la edad es el posible factor que afecta al daño oxidativo (pirimidinas oxidadas) ($B = 0,14$; $P= 0,026$). Por lo tanto, los factores moduladores del daño oxidativo en los recién nacidos son la edad de la madre y la temporada del parto.

Tabla 19. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño oxidativo en los recién nacidos.

Variable dependiente (recién nacidos)		<i>B (SE)</i>	<i>P</i>	<i>R</i> ²
Purinas oxidadas	Edad madres	-0,16 (0,06)	0,003	0,167
	Temporada del parto	-0,13 (0,04)	0,003	
Pirimidinas oxidadas	Edad (madre)	0,14 (0,07)	0,026	0,109

4.5.3. Capacidad de reparación y distintas características de la población

Se sabe que la capacidad en reparar el daño en el DNA es distinta de un individuo respecto a otro, y esto es el resultado de muchos factores, tanto genéticos como ambientales.

Al analizar la capacidad de reparar el daño oxidativo, respecto a las características de las madres, no se detectó diferencias significativas en el grupo de madres y tampoco en los neonatos. Sin embargo, se ha observado que tanto entre los recién nacidos como entre las madres, la capacidad de reparar el daño oxidativo varía según la temporada del parto.

Para detectar la existencia de posibles factores moduladores de esa capacidad de reparación, tanto en los recién nacidos como en sus madres, hemos llevado a cabo un análisis de regresión lineal múltiple.

En la Tabla 20, se muestra que el *pre*-IMC de las madres, es un factor que está relacionado con la alta capacidad de reparación del daño oxidativo en el DNA detectada en los recién nacidos, mientras que un parto prematuro puede tener una relación con la capacidad de reparación en las madres.

Tabla 20. Análisis de regresión lineal múltiple para la capacidad de reparación en las madres y sus recién nacidos.

VARIABLES DEPENDIENTES		<i>B (EE)</i>	<i>P</i>	<i>R</i> ²
Capacidad de reparación (madres)	Parto prematuro	0,60 (0,21)	0,006	0,132
Capacidad de reparación (recién nacidos)	<i>pre-IMC</i>	-0,23 (0,09)	0,015	0,116

4.6. Modelos generales de regresión lineal múltiple

Para determinar los factores de confusión, incluyendo los factores dietéticos, que podrían modular el daño genético basal y oxidativo, así como la capacidad en reparar los daños en el DNA tanto en madres como en sus hijos, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal. Una vez descartadas las covariables que estaban altamente correlacionadas entre sí, y/o que no ejercían ninguna influencia significativa sobre las variables dependientes estudiadas, se llegó a un modelo para cada una de las variables analizadas en la población de madres (Tablas 21, 22, 23 y 24) y la de sus hijos (Tablas 25, 26, 27 y 28).

Como se muestra en la Tabla 21, el daño genético basal en las madres se vio fuertemente influenciado por el *pre-IMC*, el consumo de folato, los niveles de vitamina C y el consumo de proteínas totales.

Tabla 21. Análisis de regresión múltiple lineal para el daño genético basal en las madres.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
<i>Pre-IMC</i>	-1,73	0,71	-0,214	-2,42	0,017
Proteínas (g/día)	0,018	0,007	0,86	2,50	0,014
Omega 6	-0,20	0,10	-0,68	-1,93	0,056
VitC	0,01	0,003	0,93	3,61	0,001
Folato ($\mu\text{g}/\text{día}$)	-0,006	0,002	-0,92	-3,33	0,001

a. Variable dependiente: Daño genético basal (madres), R^2 corregido 0,08. En el modelo: *pre-IMC*, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC.

Según la Tabla 22, y respecto al daño oxidativo (purinas oxidadas), éste parece estar influenciado por la temporada del parto, mientras que la edad de las madres está relacionada con el nivel de las pirimidinas oxidadas (Tabla 23).

Tabla 22. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño oxidativo (purinas oxidadas) en las madres.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
Temporada del parto	-0,094	0,034	-0,242	-2,648	0,009
Proteínas (g/día)	0,010	0,001	-0,174	-1,905	0,059

a. Variable dependiente: neto FPG $\text{Ln}(x+1)$ (madres), R^2 corregido 0,056. En el modelo: *pre-IMC*, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC.

Tabla 23. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño oxidativo (pirimidinas oxidadas) en las madres.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
Edad de las madres	0,168	0,207	0,204	2,101	0,038

a. Variable dependiente: neto Endo III Ln(x+1) (madres), R^2 corregido 0,058. En el modelo: *pre-IMC*, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC.

El análisis de la capacidad para reparar el daño oxidativo por parte de las madres, y después de la inclusión de los parámetros dietéticos en el modelo estadístico, ha mostrado que este parámetro está influenciado por el número de partos previos (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis de regresión lineal múltiple para la capacidad de reparación en las madres.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
Partos previos	0,43	0,084	0,202	2,018	0,046

a. Variable dependiente: capacidad de reparación (madres), R^2 corregido 0,039. En el modelo: *pre-IMC*, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC, parto prematuro, género y PEG.

En la población de los recién nacidos, y como se muestra en la Tabla 25, el daño genético basal encontrado está influenciado por la edad de la madre, el género y el PEG.

Tabla 25. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño genético basal en los recién nacidos.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
Edad de las madres	0,896	0,381	0,194	2,35	0,020
Género	1,231	0,584	0,173	2,30	0,037
PEG	-4,123	1,43	-0,241	-2,87	0,005

a. Variable dependiente: Daño genético basal (recién nacidos), R^2 corregido 0,136. En el modelo: *pre*-IMC, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC, parto prematuro, género y PEG.

Respecto al daño oxidativo en los recién nacidos, según el análisis estadístico, la edad de las madres, la temporada del parto, el consumo de omega 6 y de proteínas mostraron una fuerte influencia sobre el nivel de purinas oxidadas (Tabla 26) y el consumo de proteínas, VitC, folato y Omega 6, sobre pirimidinas oxidadas (Tabla 27).

Tabla 26. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño oxidativo (purinas oxidadas) en los recién nacidos.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
Edad de las madres	-0,209	0,067	-0,63	-3,13	0,002
Temporada del parto	-0,125	0,043	-0,239	-2,921	0,003
Omega 6	0,036	0,015	0,764	2,39	0,015
Proteínas (g/día)	-0,003	0,001	-0,863	-2,87	0,004

a. Variable dependiente: neto FPG $\ln(x+1)$ (recién nacidos), R^2 corregido 0,165. En el modelo: *pre*-IMC, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC, parto prematuro, género y PEG.

Tabla 27. Análisis de regresión lineal múltiple para el daño oxidativo (pirimidinas oxidadas) en los recién nacidos.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
Omega 6	-0,031	0,015	-0,73	-2,05	0,043
Proteínas (g/día)	0,002	0,001	0,696	2,031	0,045
VitC	0,001	0,000	0,672	2,43	0,015
Folato	0,000	0,001	0,62	2,09	0,039

a. Variable dependiente: neto EndoIII Ln(x+1) (recién nacidos), R^2 corregido 0,177. En el modelo: *pre*-IMC, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC, parto prematuro, género y PEG.

Respecto a la capacidad de reparación en los recién nacidos, la inclusión de los factores dietéticos en el modelo no resultó cambiar el resultado y, por lo tanto, el *pre*-IMC sigue siendo el factor que modula la capacidad de reparación en los recién nacidos (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis de regresión lineal múltiple para la capacidad de reparación en los recién nacidos.

Capacidad de reparación (recién nacidos)	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P
	B	(ET)	β		
<i>pre</i> -IMC Kg/m ²	-0,277	0,098	-0,285	-2,832	0,006

a. Variable dependiente: capacidad de reparación (recién nacidos), R^2 corregido 0,078. En el modelo: *pre*-IMC, edad, folato, café, temporada del parto, partos previos, Omega 6, proteínas, vitC, parto prematuro, género y PEG.

En este trabajo, se ha observado que los distintos contaminantes analizados ingeridos en la dieta están correlacionados entre si y, por lo tanto, no se pueden incluir en el mismo modelo estadístico. Al analizar cada contaminante por separado, no se ha encontrado ningún modelo estadístico donde se pueda observar algún efecto sobre los niveles del daño genético analizado tanto en madres como en sus recién nacidos o con sus características somatométricas. Esto nos lleva a concluir que los niveles de exposición a estos contaminantes a través de la dieta materna durante el periodo de embarazo están probablemente por debajo de los valores de riesgo. Además, el efecto observado podría ser el resultado de un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes ingeridos por las madres, por lo que, la dieta como factor probable tendería a anular los posibles efectos genotóxicos de los contaminantes estudiados.

4.7. Asociaciones entre características de las madres y los contaminantes ingeridos a través de la dieta

En este apartado, hemos analizado las asociaciones existentes entre las características de las madres y los contaminantes ingeridos a través de la dieta. Para ello se construyó un modelo estadístico y se llevó a cabo un análisis de regresión logística multinomial.

En las Tablas 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36 se resumen las asociaciones que se han encontrado entre las características maternas y los cuartiles de la ingestión dietética de PAHs, acrilamida, nitratos, nitritos, NDMA, DON, ENOCs y Meiqx respectivamente, también se presentan las *odds ratio* cruda para las variables significativas en el modelo.

Los cuartiles para cada variable dependiente son: PAHs ($\leq 0,099$; 0,010-0,129; 0,130-0,168; $> 0,169$), acrilamida ($\leq 9,78$; 9,79-16,94; 16,95-30,96; $> 30,97$), nitritos ($\leq 0,94$; 0,95-1,37; 1,38-1,85; $> 1,86$), nitratos ($\leq 19,60$; 19,61- 38,31; 38,32-67,39; $> 67,40$), NDMA ($\leq 0,060$, 0,061-0,089; 0,090-0,130; $> 0,131$), DON ($\leq 4,45$; 4,46- 8,48; 8,49- 12,27; $> 12,28$), ENOCs ($\leq 67,22$; 67,23-101,05; 101,06- 145,88; $> 145,89$) y Meiqx ($\leq 0,050$; 0,051-0,10; 0,11-0,18; $> 0,19$).

4.7.1. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Según la Tabla 29, la etnia de las madres, la actividad física, la ingesta diaria de folato y la ingesta diaria de grasa total están significativamente ($P < 0,05$) asociadas a la ingesta de PAHs. También, se observa que éstas son variables independientes importantes para diferenciar el cuartil 1 del cuartil 4 de la variable dependiente estudiada.

Las madres categorizadas como caucásicas tienen un probabilidad de 0,04 veces menor (95%CI 0,004-0,442) de consumir PAHs en el cuartil más alto del consumo, en comparación con las categorizadas como otras etnias. Las madres cuya ingesta de folato en la dieta diaria es menor que 432,82 $\mu\text{g}/\text{día}$, tenían menos probabilidades a ingerir PAHs en el cuartil más alto de consumo que las madres cuya ingesta diaria de folato es superior a dicho valor. Las madres cuya ingesta diaria de grasa total en la dieta es menor que 105,66 $\mu\text{g}/\text{día}$ tenían menos probabilidades de consumir PAHs en el cuartil más alto del consumo que las madres con una ingesta diaria de grasa total en dieta superior a dicho valor. Finalmente, las madres activas tienen una probabilidad 0,28 veces menor (95%CI 0,20-0,65) de consumir PAHs en el cuartil más alto de consumo que las madres categorizadas como sedentarias.

4.7.2. Acrilamida

En la Tabla 30, se observa que tanto la etnia de las madres como la ingesta diaria de grasa total son factores que se asocian significativamente ($P < 0,05$) con la ingesta de acrilamida.

Así, las madres categorizadas como caucásicas tienen una probabilidad 0,81 veces menor (95%CI 0,66-0,92) de consumir acrilamida en el cuartil más alto del consumo que las categorizadas como otras etnias. De igual manera, las madres cuya ingesta diaria de grasa total en la dieta es menor que 105,66 $\mu\text{g}/\text{día}$ presentan una probabilidad menor de consumir acrilamida en el cuartil más alto de consumo, en comparación con las madres cuya ingesta diaria de grasa total en la dieta es superior a dicho valor.

4.7.3. Nitritos

En la Tabla 31, se indica que la etnia de las madres, el hábito de fumar, la ingesta diaria de folato y la ingesta diaria de grasa total son parámetros que se asocian significativamente ($P < 0,05$) con la ingesta de nitritos.

De los valores indicados en la tabla, se desprende que las madres categorizadas como caucásicas tienen una probabilidad 0,03 veces menor de consumir nitritos en el cuartil más alto del consumo que las categorizadas como otras etnias. Las madres cuya ingesta diaria de folato en la dieta es menor que 43,82 $\mu\text{g}/\text{día}$, tienen también una probabilidad 38 veces menor de consumir nitritos en el cuartil más alto del consumo, que las madres cuya ingesta diaria de folato en la dieta es superior a dicho valor. Finalmente, las madres cuya ingesta diaria de grasa total en la dieta es menor que 105,66 $\mu\text{g}/\text{día}$ tenían una probabilidad 32,12 veces menor de consumir nitritos en el cuartil más alto de consumo, en comparación con las madres cuya ingesta diaria de grasa total en la dieta es superior a dicho valor.

4.7.4. Nitratos

Por lo que hace referencia al consumo de nitratos, se observó que únicamente la ingesta diaria de folato está asociada significativamente ($P < 0,05$) con la ingesta de nitratos. Las madres cuya ingesta diaria de folato en la dieta es menor a 432,82 $\mu\text{g}/\text{día}$, presentan una probabilidad menor (95%CI 7,82-219,17) de consumir nitritos en el cuartil más alto de consumo que las madres cuya ingesta diaria de folato en la dieta es superior a dicho valor (Tabla 32).

4.7.5. NDMA

En la tabla 33, se indica que tanto la etnia de las madres, como el hábito de fumar y la ingesta diaria de grasa total son características que se asocian significativamente ($P < 0,05$) con la ingesta de NDMA.

En particular, se observa que las madres categorizadas como caucásicas muestran una probabilidad 0,64 veces menor (95%CI 0,091-0,89) de consumir

NDMA en el cuartil más alto del consumo, que las categorizadas como otras etnias. De la misma manera, las madres que no fuman tienen una probabilidad menos de consumir NDMA que las madres que fuman. Finalmente, las madres cuya ingesta diaria de folato es menor a 432,82 $\mu\text{g}/\text{dia}$, tienen una probabilidad 49,9 veces (95%CI 7,28-341,83) menor de consumir NDMA en el cuartil más alto de consumo, en comparación con las madres cuya ingesta diaria de folato es superior a dicho valor.

4.7.6. DON

Por lo que respecta a los estudios de asociación con la exposición a DON, se observa que la ingesta diaria de grasa total está significativamente asociada con la ingesta de DON. Así, las madres cuya ingesta diaria de grasa total es menor de 105,66 $\mu\text{g}/\text{día}$ muestran una probabilidad 7,05 veces menor de consumir DON en el cuartil más alto de consumo, que las madres cuya ingesta diaria superior a dicho valor (Tabla 34).

4.7.8. ENOCs

La ingesta de ENOCs, a través de la dieta se encuentra asociada con el hábito de fumar durante el embarazo. Así, las madres que no fuman presentan una probabilidad 0,04 veces menor de consumir ENOCs diariamente en el cuartil más alto que las madres que fumaban (Tabla 35).

4.7.9. Meiqx

Del análisis sobre que factores se asocian con la ingesta de Meiqx, se observa que tan solo la edad materna y la actividad física están significativamente asociadas con su ingesta (Tabla 36). Las madres de edad inferior a 27 años muestran una probabilidad menor de consumir Meiqx en el cuartil más alto de consumo que las madres de edad superior a 27 años. De la misma manera, las madres activas tienen una probabilidad menor de consumir este contaminante en el cuartil más alto de consumo que las madres sedentarias.

Hay que señalar que este mismo tipo de análisis se realizó para ver los factores asociados con la ingesta de Dimeix pero no se obtuvo ningún tipo de asociación significativa con las características de las madres. En general, se observa que las madres que consumen estos contaminantes en el cuartil bajo son caucásicas, consumen menos grasa total y menos folato, no fumaban y se consideran más activas.

Como resumen general podemos decir que los resultados de este estudio indican que la ingesta de PAH, nitritos, nitratos, NDMA, DON, ENOCs y Meixq varían considerablemente según la etnia, el consumo de folato, el consumo de grasa total y otras características. La falta de resultados que nos indiquen una asociación entre la ingesta de estos compuestos y la aparición de efectos genotóxicos, nos indican que se necesitan más estudios sobre cómo el consumo de alimentos ricos en estos contaminantes y/o sus precursores podrían relacionarse con el riesgo de resultados adversos del embarazo y las enfermedades crónicas.

Tabla 29: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de PAH ($\mu\text{g}/\text{día}$)

Ingesta diaria de PAHs ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,138E2	0,000			
Etnia (madres)	227,718	13,929	0,003		
Caucásica				0,04	0,004-0,442
Otras ^b				-	-
Educación	218,938	5,149	0,161		
Bajo				2,27	0,280-18,330
Alto ^b				-	-
Edad (madres)	218,240	4,451	0,616		
≤ 27				0,15	0,015-1,580
27-33				0,273	0,031-2,502
> 33 ^b				-	-
<i>pre</i> -IMC (kg/m^2)	214,846	1,057	0,787		
$\leq 24,12$				0,42	0,06-2,89
$> 24,1$ ^b				-	-
Actividad física	228,450	14,662	0,023		
Si				0,28	0,20-0,65
No ^b				-	-
Fumadoras activas	218,468	4,680	0,197		
Si				0,17	0,017-1,86
No ^b				-	-
Fumadoras pasivas	216,943	3,155	0,36		
Si				4,43	0,69-28,47
No ^b				-	-
Folato	247,463	33,674	0,000		
$\leq 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$)				55,95	37,43-81117,8
$> 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^b				-	-
Grasa total	258,487	44,699	0,000		
$\leq 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$)				74,03	38,51-14456,7
$> 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$) ^b				-	-

^a La categoría de referencia es el PAHs en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 30: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{día}$).

Ingesta diaria de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,571E2	0,000			
Etnia (madres)	272,334	15,280	0,002		
Caucásica				0,81	0,66-0,92
Otras ^b					
Educación	261,441	4,386	0,223		
Bajo				0,71	0,14-3,48
Alto ^b					
Edad (madres)	261,103	4,049	0,670		
≤ 27				0,39	0,07-2,11
27-33				1,23	0,28-5,39
> 33 ^b					
pre-IMC (kg/m^2)	263,304	6,250	0,100		
$\leq 24,12$				0,57	0,151-2,20
$> 24,1$ ^b					
Actividad física	259,722	2,668	0,849		
Si				1,67	0,34-8,20
No ^b					
Fumadoras activas	258,640	1,585	0,663		
Si				1,16	0,23-5,85
No ^b					
Fumadoras pasivas	261,593	4,538	0,209		
Si				0,79	0,21-2,91
No ^b					
Folato	262,787	5,733	0,125		
$\leq 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$)				1,33	0,29-6,03
$> 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^b					
Grasa total	292,002	34,947	0,000		
$\leq 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$)				28,55	5,78-140,95
$> 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$) ^b					

^a La categoría de referencia es la acrilamida en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 31: Características maternas asociadas con la ingesta diaria nitritos (mg/día)

Ingesta diaria de nitritos (mg /día) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,571E2	0,000	.		
Etnia (madres)	262,868	18,018	0,000		
Caucásica				0,030	0,028-0,55
Otras ^b					
Educación	249,315	4,466	0,215		
Bajo				3,05	0,57-16,13
Alto ^b					
Edad (madres)	251,143	6,293	0,391		
≤27				0,32	0,04-2,23
27-33				0,34	0,05-2,20
>33 ^b					
pre-IMC (kg/m ²)	249,354	4,504	0,212		
≤24,12				1,04	0,18-5,99
>24,1 ^b					
Actividad física	250,092	5,242	0,513		
Si				2,93	0,42-20,48
No ^b					
Fumadoras activas	255,721	10,872	0,012		
Si				0,27	0,03-0,38
No ^b					
Fumadoras pasivas	246,840	1,990	0,574		
Si				2,35	0,49-11,13
No ^b					
Folato	287,620	42,770	0,000		
≤432,82 (μg/día)				38,2	2,44-651,41
>432,82 (μg/día) ^b					
Grasa total	263,073	18,223	0,000		
≤ 105,68 (g/día)				32,12	4,69-219,95
> 105,68 (g/día) ^b					

^a La categoría de referencia es el nitrito en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parametro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 32: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de nitratos (mg/día).

Ingesta diaria de nitratos (mg/día) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,782E2	0,000			
Etnia (madres) Caucásica Otras ^b	280,925	2,760	0,430	0,53	0,119-2,42
Educación Bajo Alto ^b	279,330	1,165	0,761	0,58	0,143-2,39
Edad (madres) ≤27 27-33 >33 ^b	285,885	7,720	0,259	6,55 3,58	1,23-34,88 0,72-17,86
pre-IMC (kg/m ²) ≤24,12 >24,1 ^b	280,311	2,146	0,548	1,47	0,38-5,64
Actividad física Si No ^b	282,068	3,903	0,640	0,96	0,20-4,65
Fumadoras activas Si No ^b	280,013	1,848	0,605	0,95	0,118-4,90
Fumadoras pasivas Si No ^b	282,479	4,314	0,230	0,47	0,131-1,71
Folato ≤432,82 (µg/día) >432,82 (µg/día) ^b	305,282	27,116	0,000	41,41	7,82-219-17
Grasa total ≤ 105,68 (g/día) > 105,68 (g/día) ^b	284,134	5,969	0,113	0,96	0,23-4,00

^a La categoría de referencia es el nitrato en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 33: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de NDMA ($\mu\text{g}/\text{día}$).

Ingesta diaria de NDMA ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,242E2	0,000	.		
Etnia (madres)	232,315	8,090	0,044		
Caucásica				0,64	0,091-0,89
Otras ^b					
Educación	227,028	2,803	0,423		
Bajo				0,32	0,059-17,48
Alto ^b					
Edad (madres)	230,339	6,113	0,411		
≤ 27				0,69	0,102-4,78
27-33				1,26	0,182-8,81
> 33 ^b					
pre-IMC (kg/m^2)	228,370	4,144	0,246		
$\leq 24,12$				3,68	0,772-17,57
$> 24,1$ ^b					
Actividad física	232,981	8,755	0,188		
Si				0,93	0,163-5,38
No ^b					
Fumadoras activas	233,048	8,822	0,032		
Si				0,149	0,02-0,107
No ^b					
Fumadoras pasivas	230,932	6,707	0,082		
Si				3,48	0,762-15,91
No ^b					
Folato	229,325	42,770	0,165		
$\leq 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$)				2,98	0,58-15,26
$> 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^b					
Grasa total	247,327	23,101	0,000		
$\leq 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$)				49,91	7,28-341,83
$> 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$) ^b					

^a La categoría de referencia es el NDMA en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 34: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de DON ($\mu\text{g}/\text{día}$).

Ingesta diaria de DON ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,968E2	0,000			
Etnia (madres) Caucásica Otras ^b	304,451	7,673	0,053	1,96	0,50-7,71
Educación Bajo Alto ^b	297,371	0,593	0,898	0,95	0,26-3,42
Edad (madres) ≤ 27 27-33 > 33 ^b	305,459	8,681	0,192	4,05 3,06	0,91-17,99 0,73-12,88
pre-IMC (kg/m^2) $\leq 24,12$ $> 24,1$ ^b	300,232	3,454	0,327	0,65	0,197-2,14
Actividad física Si No ^b	302,135	5,357	0,497	0,69	0,167-2,85
Fumadoras activas Si No ^b	300,204	3,426	0,331	0,93	0,217-4,01
Fumadoras pasivas Si No ^b	297,106	,328	0,955	1,12	0,35-3,61
Folato $\leq 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) $> 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^b	300,783	4,005	0,261	3,11	0,84-11,49
Grasa total $\leq 105,68$ (g/día) $> 105,68$ (g/día) ^b	307,267	10,489	0,015	7,05	1,81-27,41

^a La categoría de referencia es el DON en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 35: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de ENOCs ($\mu\text{g}/\text{día}$).

Ingesta diaria de ENOCs ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,382E2	0,000			
Etnia (madres) Caucásica Otras ^b	241,799	3,612	0,306	0,47	0,084-2,68
Educación Bajo Alto ^b	241,961	3,774	0,287	0,503	0,107-2,36
Edad (madres) ≤ 27 27-33 > 33 ^b	244,432	6,245	0,396	0,305 0,86	0,055-1,68 0,162-4,59
<i>pre</i> -IMC (kg/m^2) $\leq 24,12$ $> 24,1$ ^b	242,317	4,130	0,248	1,17	0,303-4,58
Actividad física Si No ^b	250,480	12,293	0,056	0,31	0,064-1,49
Fumadoras activas Si No ^b	256,147	17,960	0,000	0,043	0,006-0,281
Fumadoras pasivas Si No ^b	238,573	,386	0,943	1,28	0,352-4,72
Folato $\leq 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) $> 432,82$ ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^b	242,098	3,911	0,271	1,59	0,36-7,01
Grasa total $\leq 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$) $> 105,68$ ($\text{g}/\text{día}$) ^b	243,023	4,836	0,184	4,79	1,06-21,52

^a La categoría de referencia es el ENOCs en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

Tabla 36: Características maternas asociadas con la ingesta diaria de Meiqx ($\mu\text{g}/\text{día}$).

Ingesta diaria de Meiqx ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^a	Pruebas de razón de verosimilitud (<i>likelihood ratio tests</i>)			OD	IC 95% (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil)
	-2 Log de probabilidad del modelo reducido	Chi-cuadrado	P		
Intercept	2,470E2	0,000			
Etnia (madres) Caucásica Otras ^b	251,277	4,265	0,234	3,89	0,94-16,10
Educación Bajo Alto ^b	251,530	4,518	0,211	0,27	0,06-1,22
Edad (madres)	267,314	20,302	0,002		
≤27 27-33 >33 ^b				0,56 0,31	0,117-0,74 0,064-1,54
pre-IMC (kg/m^2) ≤24,12 >24,1 ^b	250,170	3,158	0,368	2,68	0,73-9,86
Actividad física	265,534	18,521	0,005		
Si No ^b				0,40	0,081-0,61
Fumadoras activas Si No ^b	252,855	5,842	0,120	0,21	0,044-1,00
Fumadoras pasivas Si No ^b	250,218	3,206	0,361	0,50	0,138-1,86
Folato ≤432,82 ($\mu\text{g}/\text{día}$) >432,82 ($\mu\text{g}/\text{día}$) ^b	253,521	6,509	0,089	1,28	0,138-5,19
Grasa total ≤ 105,68 ($\text{g}/\text{día}$) > 105,68 ($\text{g}/\text{día}$) ^b	254,062	7,050	0,760	6,51	1,47-28,68

^a La categoría de referencia es el Meiqx en el cuartil más alto de consumo. ^b Este parámetro se establece en cero porque es redundante. IC: Intervalo de confianza. P: grado de significación. OD: *odds ratio*.

La estadística de chi-cuadrado es la diferencia de 2 log-verosimilitud entre el modelo final y un modelo reducido. El modelo reducido se forma por omisión de un efecto en el modelo final. La hipótesis nula es que todos los parámetros de ese efecto son 0.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Actualmente se viene percibiendo una preocupación creciente en relación con el riesgo que supone la exposición a los agentes genotóxicos, por su relación directa con el riesgo de padecer enfermedades inmunes y cáncer. Esto es especialmente cierto en la población de niños, a quienes se les considera como grupo vulnerable. En estos estudios de biomonitorización de grupos expuestos a agentes genotóxicos es fundamental la utilización de biomarcadores sensibles, con el fin de evaluar de manera precisa el riesgo genético de dichas exposiciones, para poder explicar la etiología de muchas alteraciones en salud humana.

En nuestro estudio de biomonitoreo, hemos utilizado el ensayo del cometa como biomarcador específico que nos permite evaluar los niveles de daño basal y oxidativo, así como la capacidad de reparación del DNA. Esto lo hemos podido aplicar a una población de madres y sus hijos recién nacidos. Por otra parte, en nuestra investigación epidemiológica se han utilizado los patrones dietéticos de las madres durante el embarazo para evaluar tanto los alimentos ingeridos en la dieta, como para estimar la exposición a distintos contaminantes ambientales ingeridos a través de la dieta. Por lo tanto, toda esta información nos ha permitido evaluar las posibles asociaciones entre exposiciones a través la dieta y biomarcadores de daño genético en las dos poblaciones madres-hijos.

5.1. El ensayo del cometa: biomarcador de exposición transplacentaria

Cabe señalar que el ensayo del cometa como biomarcador de efecto genotóxico ha sufrido un gran desarrollo en su metodología, a lo largo de los años que van desde su primera optimización por Singh *et al.* (1988). La popularidad de este ensayo comenzó a principios de 1990 y, hoy en día, se considera que la técnica se encuentra en su máximo apogeo ya que es una de las más utilizadas para la evaluación de daño y reparación en el DNA, debido a que ha mostrado poseer una gran sensibilidad frente a una amplia variedad de agentes y tipos celulares, en comparación con los obtenidos utilizando otras técnicas. Además de su sensibilidad, su éxito se debe considerar fruto de la simplicidad de su protocolo. La técnica del cometa, a diferencia de lo que sucede con otras técnicas alternativas propuestas, posee grandes ventajas que van desde el material biológico utilizado

hasta el tiempo requerido para obtener resultados. En primer lugar, el ensayo se realiza a nivel de células individuales, pudiéndose detectar múltiples respuestas dentro de una población celular heterogénea. Además, sólo se necesita un pequeño número de células para realizar un ensayo completo y cualquier población celular eucariota puede ser analizada.

Después de que McNamee *et al.* (2000) utilizaron por primera vez el soporte de *Gelbond*, y después de demostrar su fiabilidad utilizando tanto células TK6 expuestas a bajas dosis de H₂O₂ (0-10 µM) como linfocitos aislados expuestos a bajas dosis de radiación ionizante (0-50 cGy), este soporte se puede considerar como una herramienta práctica para la realización del ensayo del cometa. A pesar de su poco uso, nuestros resultados muestran que éste es extremadamente estable y manipulable durante todas las etapas del ensayo. También hemos demostrado que facilita el proceso de visualización ya que se pueden colocar en el microscopio 48 muestras sin necesidad de cambiar de portaobjetos después de contabilizar cada muestra, como ocurre en la versión convencional de una muestra por portaobjeto.

Aparte de las consideraciones metodológicas, la inclusión de enzimas específicas para reconocer lesiones particulares y transformarlas en roturas (Collins *et al.*, 1993) ha mostrado ser una arma especialmente poderosa ya que nos permite poder profundizar en distintas cuestiones específicas, como puede ser el caso del estrés oxidativo en humanos, proceso inducido bien por efecto de la exposición a la radiación ionizante o a compuestos químicos o, simplemente, como consecuencia de procesos normales endógenos como puede ser la respiración celular. Esta modificación puede ser utilizada para la detección de diferentes tipos de daño, ya que toda lesión en el DNA que sea reconocida y reparada por alguna enzima, podría ser analizada utilizando la enzima adecuada. Por lo tanto, esta estrategia promete ser una herramienta muy buena para este tipo de estudios (Collins *et al.*, 2001; Dusinská y Collins, 2008).

La 8-oxodG probablemente fue escogida como el primer biomarcador del daño oxidativo, tanto por que puede ser medida por HPLC como porque parece estar más estrechamente vinculada con los procesos mutagénicos que otras

alteraciones como, por ejemplo, las lesiones oxidativas de la adenina y la timina, de las que se supone que no son lesiones que generan procesos de mutagénesis (Möller *et al.*, 1998).

Existen varias metodologías para detectar la 8-oxodG que van desde las técnicas de cromatografía, incluyendo HPLC con detección electroquímica y la espectrometría de masas (MSMS, GC-MS), la cromatografía con marcaje con ^{32}P , y los inmuno-ensayos (Loft *et al.*, 2008). Pero también, cabe destacar que existe una gran variación entre los diferentes ensayos respecto a las concentraciones medidas de 8-oxodG. Estas variaciones de sensibilidad entre técnicas pueden ser debidas a la generación artificial de 8-oxodG en las condiciones en las que se llevan a cabo estos ensayos ; en particular la metodología de GC-MS, por ejemplo, produce altos niveles de artefactos (ESCODD, 2000).

Recientemente, se ha llevado a cabo un esfuerzo conjunto de varios laboratorios, principalmente de Europa, con la finalidad de evaluar el rango de los niveles de 8-oxodG obtenidos por los diversos métodos (ESCODD, 2000), tratando de establecer un sistema de estandarización de los distintos ensayos entre laboratorios.

La estandarización del ensayo del cometa fue uno de éstos y, para ello, ha sido necesario en primer lugar establecer una curva de calibración utilizando linfocitos humanos irradiados con una serie de dosis crecientes de radiación ionizante. Por otra parte, la inclusión de los controles estándar negativos y tratados en las láminas de los *Gelbonds* para la realización del ensayo del cometa en condiciones alcalinas, ha sido un procedimiento que ha mostrado ser valioso para la estandarización y la reducción de la variación que suele ocurrir debido a las condiciones del ensayo. Cabe destacar que, para otros tipos de daño oxidativo en el DNA, la estandarización de los procedimientos de laboratorio y la identificación de los valores basales, todavía hay que determinarlos.

La inclusión de enzimas específicas para detectar bases oxidadas (purinas y pirimidinas) en el ensayo del cometa han convertido a éste en un buen biomarcador de estrés oxidativo para ser utilizado en biomonitorización humana y en epidemiología molecular, entre otros campos (Collins *et al.*, 1993; Pool-Zobel *et*

al., 1994, 1997; Duthie *et al.*, 1996). En nuestro trabajo, nosotros lo hemos propuesto como una buena herramienta para analizar los niveles del daño oxidativo en madres y en sus recién nacidos. La sensibilidad del ensayo del cometa es tal que se ha propuesto que puede medir el daño oxidativo en el DNA producido por diversos productos de la peroxidación lipídica (indicada por el malondialdehído plasmático) de manera mas precisa que utilizando los aductos de DNA como marcadores (Risom *et al.*, 2005).

Son muchos los estudios que han utilizado el ensayo del cometa alcalino en biomonitorización, tanto ambiental como laboral (Kassie *et al.*, 2000; Møller *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2005; Møller, 2006) evaluando daño en los linfocitos de personas expuestas a genotóxicos. Los resultados obtenidos son generalmente positivos y, además, suelen concordar con los obtenidos mediante otras metodologías como los micronúcleos y las aberraciones cromosómicas (Kruszewski y Szumiel, 1994; Wojewodzka *et al.*, 1999; Somorovska *et al.*, 1999; Cavallo *et al.*, 2002; Vodicka *et al.*, 2004). Sin embargo, son pocos los estudios llevados a cabo en poblaciones no expuestas, con la finalidad de obtener datos de los niveles basales de daño, no ligados a exposición alguna. En vista de su sensibilidad, el ensayo del cometa puede ser utilizado para evaluar posibles diferencias en los niveles de daño entre hombres y mujeres, adultos y niños, fumadores y no fumadores, o en función de la edad, entre otros múltiples aspectos.

Estudios recientes, al igual que nuestro trabajo, han estudiado poblaciones de madres y sus hijos, con el objetivo de investigar si el nivel de daño basal y oxidativo de las mujeres embarazadas se corresponde con el de sus hijos al momento de dar a luz. Para ello se han estudiado los niveles de daño en el DNA y su capacidad de reparación, tanto en linfocitos aislados de sangre materna como de cordón umbilical (Knudsen y Hansen, 2007; de Assis *et al.*, 2009). De los resultados publicados, un estudio relativamente reciente no ha encontrado diferencias entre madres y recién nacidos por lo que respecta a la susceptibilidad al daño en el DNA inducido *in vitro* por el H₂O₂, y tampoco en la capacidad de reparación del mismo, sin embargo, mediante el ensayo de micronúcleos han podido constatar una alta frecuencia de MN en comparación con sus hijas recién nacidas, debido al factor de la edad (Decordier *et al.*, 2007).

Al igual, en nuestro estudio se han detectado mayores niveles de daño genético basal y oxidativo en el DNA de las madres que en el de los cordones umbilicales. Estos resultados concuerdan con lo observado en varios estudios, al igual que sucede con las asociaciones observadas entre madres y sus hijos. Así, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos tanto utilizando aductos en el DNA entre madre-recién nacidos (Arab *et al.*, 2009; Pedersen *et al.*, 2010), el ensayo del cometa (de Assis *et al.*, 2009) como utilizando el ensayo de micronúcleos (Decordier *et al.*, 2007).

La gran variabilidad inter-individual observada tanto en las madres como en sus recién nacidos puede ser debida a muchos factores como puede ser el tiempo de colección de la sangre materna, los protocolos para el aislamiento de los linfocitos o del DNA, los procedimientos de cuantificación, el tratamiento de las muestras negativas, así como las características de la población estudiada (etnia, IMC, susceptibilidad genética, estado de salud, edad, estado socio-económico y dieta, entre otras). Así, son varios los estudios que han observado que las alteraciones detectadas en los recién nacidos se asocian con ciertas características de las madres y su estilo de vida. Esto hace interesante conocer que factores pueden influir en los niveles de daño presente en madres/hijos, así como en la capacidad reparadora de dicho daño genético.

5.2. Factores de confusión

En la búsqueda de factores que puedan influir sobre la respuesta observada se han identificado diversos ejemplos que pueden, o no, ser relevantes en la determinación del daño basal en el DNA. El problema al que se han enfrentado numerosos investigadores es que los efectos de un factor de confusión específico normalmente se han evaluado en estudios especialmente diseñados para ese propósito, por lo que el mismo factor puede no tener efectos aparentes en otros estudios. Esto supone un fuerte obstáculo a la hora de proponer un factor como obligatorio en el diseño de un estudio.

En su trabajo, Møller *et al.* (2000) conscientes de lo difícil que es proponer factores de confusión que pueda influir en los resultados de biomonitorización utilizando el ensayo del cometa, consideran que entre los que deben ser

contemplados y discutidos hay que tener en cuenta la edad, el género y el hábito de fumar, así como información acerca del nivel de actividad física, infecciones y dieta. Estos datos pueden ser de gran importancia ya que permiten la identificación de influencias que modulan la respuesta del DNA, evitando confusiones al interpretar los resultados obtenidos.

Siguiendo estas recomendaciones, en este trabajo de Tesis hemos considerado pertinente tener en cuenta como factores de confusión en las madres la edad, la etnia, la exposición al humo del tabaco y el consumo de alcohol, así como algunos aspectos de la dieta. En los niños, los factores a considerar comprenden el género, las semanas de gestación al nacer, el tipo del parto, así como diversas características somatométricas.

5.2.1. La edad

Varios estudios han asociado el riesgo de padecer leucemia infantil con la edad de las madres (Shu *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002), indicando que muchos cánceres que aparecen en la niñez tienen un origen intrauterino.

La edad es uno de los factores que más se incluye en los estudios de biomonitorización; sin embargo, en menos del 50% de los trabajos publicados se han encontrado asociaciones positivas entre la edad y los niveles de daño medidos con el ensayo del cometa.

Entre los estudios que muestran asociación positiva, Grover *et al.* (2003) sólo detectaron efectos significativos en el grupo control. Aunque es razonable especular acerca de una influencia positiva de la edad, como se ha demostrado utilizando otros biomarcadores, la mayoría de los estudios con el ensayo del cometa no ponen énfasis en este factor, a diferencia de lo que sucede con otros biomarcadores, como los micronúcleos, que han mostrado una clara asociación con la edad. De hecho, los primeros estudios que han utilizado el ensayo del cometa como biomarcador no han sido capaces en detectar asociaciones con la edad.

Es posible que las respuestas negativas sean debidas a que en la mayoría de los estudios no existe una gran variabilidad en cuanto a la edad de los donantes, por lo que faltan estudios diseñados específicamente para descubrir un posible

efecto de este factor. Por lo tanto un estudio debería incluir grupos numerosos de todas las edades para que los posibles efectos de este factor puedan ser visualizados de manera clara.

En nuestro estudio, después del análisis del efecto de la edad de las madres respecto a los niveles de daño basal y oxidativo observados, tanto en la población de madres como en la de sus hijos, se ha demostrado una asociación positiva aunque modesta entre la edad de las madres y su nivel de pirimidinas oxidadas. Sin embargo, si que se ha observado una asociación negativa entre la edad de las madres y el daño oxidativo detectado con FPG (purinas oxidadas) en los recién nacidos. Al categorizar nuestra población de madres en 3 grupos de edades diferentes con tamaños equivalentes (<27, 27-33 y >33), hemos obtenido un abanico de edades de las participantes lo suficientemente amplio que nos ha permitido detectar dicho efecto de la edad. Por lo tanto, según nuestros resultados, la edad de las madres en el momento del parto podría ser un factor de riesgo para sus hijos.

5.2.2. El índice de masa corporal

El IMC es un parámetro al que últimamente se le está prestando atención debido a que éste es un factor de riesgo para enfermedades crónicas como enfermedades cardiovascular (ECV), diabetes y algunos tipos de cáncer como el de mama y de colon (OMS, 2006). Por lo tanto, es un parámetro que se toma en cuenta para la evaluación de los riesgos durante el embarazo.

Estudios hechos con animales han indicado la posibilidad de que tanto la grasa misma como el exceso de calorías intervengan como promotores del cáncer. Según la literatura, cuando una persona consume más calorías que las necesarias para conservar una salud óptima, estimula su actividad metabólica haciendo que las células se dividan más rápidamente. Esto incrementa el riesgo de que algo pueda salir mal, dando como resultado células con DNA dañado o incorrectamente reparado.

Las diferencias observadas en los niveles de daño oxidativo entre las mujeres, en función de su IMC, indica que una persona con un IMC muy bajo podría

generar unos niveles de estrés oxidativo mas elevado que en personas normales, ya sea en las mismas madres o en sus hijos.

Se ha investigado en un estudio longitudinal la posible asociación entre el índice de masa corporal (IMC) y los niveles de 8-oxodG en orina como un marcador de daño oxidativo del DNA, utilizando los datos de 174 empleados sanos que participaron en un estudio de intervención sobre el estilo de vida. En este estudio se detectó una asociación inversa estadísticamente significativa entre el IMC y los niveles de 8-oxodG ($P=0,003$). Estos resultados sugieren que la pérdida de peso se asocia con un aumento del daño oxidativo en el DNA, un estado presuntamente relacionado con un mayor riesgo de cáncer (Mizoue *et al.*, 2007).

Una relación inversa entre el índice de masa corporal (IMC) y el riesgo de cáncer también se ha encontrado de manera consistente para distintos órganos, incluyendo los pulmones y el esófago. Esto se podría asociar con los estudios anteriores que mostraron que cambios en el índice de masa corporal se asociaba negativamente con los cambios en los niveles de 8-oxodG.

De acuerdo con los anteriores estudios, que encontraron una asociación inversa entre el IMC y los niveles de 8-oxodG en orina, nuestro estudio, ha mostrado que el daño genético basal en madres con un *pre*-IMC igual o inferior a 24,12 es significativamente superior al de aquellas con un *pre*-IMC superior a dicho valor. Esta asociación negativa entre el *pre*-IMC y el daño genético en las madres concuerda con lo encontrado en el estudio de Mizoue *et al.* (2007), aunque no estaria de acuerdo con otros estudios que indican que son los IMC elevados los que se asocian con su elevado riesgo de cancer (Stein *et al.*, 2010). Respecto a la capacidad de reparación, el modelo estadístico analizado ha mostrado que el *pre*-IMC está negativamente asociado con la capacidad de reparación en los recién nacidos.

En otros estudios sobre población expuesta al tabaco, también se ha observado una asociación inversa entre el peso corporal y el daño oxidativo en el DNA. La posible explicación es que la exposición a sustancias como la nicotina, aumenta el metabolismo celular con una elevación en la producción mitocondrial

de especies reactivas del oxígeno, lo que conduce a mayores niveles de estrés oxidativo.

5.2.3. Exposición al tabaco

Varios estudios epidemiológicos muestran claramente que los factores ambientales son la causa principal de los cánceres humanos; entre ellos el tabaco es el ejemplo más paradigmático de carcinógeno sistémico (Montesano y Hall, 2001; DeMarini, 2004). El humo del cigarrillo contiene más de 4700 sustancias y por lo menos 60 de ellas son potencialmente cancerígenas (Hecht, 2003). La relación entre el tabaco y el cáncer se demostró por primera vez por Roffo (1931) y Müller (1939) según Doll *et al.* (2004), quienes presentaron evidencias epidemiológicas de que el consumo de tabaco está relacionado con el cáncer de pulmón. Posteriormente, otros estudios han confirmado estas observaciones y han mostrado asociación entre el consumo de tabaco y otros tipos de cáncer (boca, esófago, faringe, laringe, páncreas, riñón, pelvis y vejiga), aunque con un menor riesgo relativo que el de pulmón (Montesano y Hall, 2001). Otros estudios también han indicado una posible asociación entre el tabaquismo parental durante el embarazo y la incidencia de tumores cerebrales infantiles (Norman *et al.*, 1996; Shu *et al.*, 2002), así como con leucemia y linfomas (Mucci *et al.*, 2004). Los niveles de daño en el DNA también se han asociado con el hábito de fumar, al igual que una mayor incidencia de abortos espontáneos.

El mecanismo por el cual el humo del tabaco provoca efectos en la salud, incluyendo el cáncer se han estudiado intensamente durante las últimas décadas, y mucho se ha aprendido de ellos. El humo del tabaco contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos, aldehídos y nitrosaminas (Hecht, 2003), que son compuestos que generan especies reactivas de oxígeno (ROS), asociándose con los mecanismos de genotoxicidad y de mutagenicidad. Una revisión de estos últimos trabajos relacionando el daño en el DNA y el tabaquismo se puede obtener en los trabajos de Husgafvel-Pursiainen (2004).

Algunos investigadores han descrito que tanto, en los fumadores pasivos como activos, el tabaco provoca estrés oxidativo y aductos en el DNA (Ayaori *et al.*, 2000; Ellahuene *et al.*, 2004), aunque este efecto se puede reducir después de la

suplementación con antioxidantes (Ayaori *et al.*, 2000). Son interesante los estudios de Lee *et al.* (1999) quienes han observado que el humo del tabaco induce daño oxidativo en el DNA (8-oxodG) tanto en leucocitos de sangre periférica como en células de los pulmones, siendo el DNA mitocondrial más susceptible al daño que el DNA nuclear. Aunque hay pocos datos sobre la genotoxicidad del humo del cigarrillo en mujeres embarazadas y en sus recién nacidos, se han detectado mayores niveles de aductos en el DNA de muestras de placenta de madres fumadoras (Everson *et al.*, 1986; Autrup *et al.*, 1995), y en los embriones de madres fumadoras, tanto activas como pasivas (Zenzes *et al.*, 1999). De igual manera, también se ha observado una mayor frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas en recién nacidos de madres fumadoras (Sardas *et al.*, 1995).

El ensayo del cometa, se ha utilizado en numerosos estudios que se han diseñado con el fin de investigar la capacidad del humo del tabaco para inducir lesiones en el DNA (Piperakis *et al.*, 1998; Gontijo *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002). En el presente estudio, se ha utilizado el ensayo del cometa para evaluar el efecto genotóxico del tabaco en los linfocitos de sangre periférica de las mujeres embarazadas fumadoras (tanto activas como pasivas) y en sus recién nacidos. Sin embargo, no se ha demostrado que las fumadoras activas tengan un nivel de daño genético más elevado que las madres no fumadoras o fumadoras pasivas. Lo mismo se ha observado en sus recién nacidos.

A pesar de no observar daño a nivel basal, si que se han observado diferencias significativas en los niveles de daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) entre los recién nacidos respecto a la exposición materna al humo del tabaco.

En un artículo reciente (de Assis *et al.*, 2009) se ha llevado a cabo un estudio sobre un grupo de madres y sus recién nacidos, concluyéndose que las fumadoras activas presentan un incremento significativo en el daño al DNA cuando se compararon con madres no fumadoras o fumadoras pasivas. Sin embargo, en dicho estudio no se observaron diferencias significativas entre no-fumadoras y fumadoras pasivas; además, no se detectaron diferencias significativas entre los recién nacidos de madres no fumadoras y de fumadores pasivas.

Por lo tanto, el tabaco en nuestro estudio no ha mostrado estar estrechamente relacionado con los niveles de daño basal en el DNA, aunque si con el daño oxidativo en los recién nacidos. Esto se podría explicar por el hecho de que en nuestra población, el número de embarazadas fumadoras es muy pequeño y, además, la media de cigarrillos fumados por día es de tan sólo 4,22 cigarrillos por día, un número bajo que puede no suponer un riesgo. No obstante, teniendo en cuenta que el tabaco se considera un factor de confusión con relevancia estadística en los análisis que incluyen los SCE como biomarcador (Lazutka *et al.*, 1994), este factor se incluyó en el modelo final.

5.2.4. El alcohol

Es ampliamente conocido que el alcohol etílico es un potente agente genotóxico cuando se consume en exceso y algunos estudios han mostrado que el ensayo del cometa es una herramienta capaz de detectar sus efectos de acuerdo con los niveles basales de daño observado en los que lo consumen (Peluso *et al.*, 2008; Rekhadevi *et al.*, 2009; Rombaldi *et al.*, 2009). Asimismo, se ha visto que la ingesta de alcohol puede tener consecuencias perjudiciales para los recién nacidos de madres que mantuvieron una ingesta de alcohol elevada durante el embarazo (Brooks *et al.*, 2004). Sin embargo, hay que señalar que también hay estudios que han obtenido resultados negativos acerca de los efectos del alcohol sobre los recién nacidos de madres que lo consumen (Pluth *et al.*, 2000). Esto sugiere que, posiblemente, el alcohol tenga efectos sobre otros factores no identificados y lo que se observa es el resultado de esta interacción.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias entre los grupos de mujeres que consumieron alcohol durante el embarazo y las que no lo hicieron. Así pues, el ensayo del cometa ha mostrado en nuestro estudio resultados negativos respecto al consumo del alcohol. Esta observación puede ser debida a que al igual que el hábito del tabaco, el consumo del alcohol durante el periodo de la gestación es un hábito que se ha evitado casi por el 75% de las mujeres embarazadas, mientras que el otro 25% restante restringe su ingesta a valores de 9,96 (g/día). Tampoco, se observaron efectos en lo que respecta a los valores observados en los

recién nacidos. Lo que concuerda con distintos estudios que no mostraron ningún tipo de asociación (Palli *et al.*, 2000).

5.2.5. Características del recién nacido

La mayoría de los bebés en el mundo nacen por parto vaginal, pero la tasa de parto por cesárea (CS) ha aumentado en todo el mundo (Buhimschi y Buhimschi, 2006). Infecciones, cirugía y el dolor después del parto son algunos ejemplos de los efectos de la salud materna asociada con CS, mientras que el parto vaginal puede causar por ejemplo la rotura del esfínter anal de la madre.

Los mecanismos sobre riesgos para la salud fetal y materna asociada con el tipo de parto son diversos, pero el mecanismo biológico influenciado por el tipo de parto no está claro y no es fácil de estudiar ya que los resultados del parto pueden verse afectados por múltiples factores, por ejemplo, la edad gestacional del niño, así como las condiciones fisiológicas de la madre, de la placenta y del feto.

El estrés oxidativo inducido por el parto se ha detectado evaluando las importantes concentraciones de glutatión plasmático en sangre arterial. Esto se ha visto en un estudio con 140 muestras de sangre del cordón umbilical después de un parto natural, donde los niveles de glutatión eran muy altos, en comparación con las concentraciones observadas en sangre materna (Raijmakers *et al.*, 2003). Una disminución significativa en la concentración de enzimas antioxidantes, un incremento en la peroxidación lipídica y un aumento del recuento de glóbulos blancos se ha encontrado en la sangre del cordón umbilical de los recién nacidos de 56 partos por vía vaginal, en comparación con 50 recién nacidos por CS (Inanc *et al.*, 2005).

En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas en los niveles de daño genético entre las madres que eligieron un parto por cesárea o un parto natural. Por el contrario, en un estudio en el que se compararon 22 partos naturales vs CS, se concluye que el parto por CS puede desempeñar un importante papel protector contra el estrés oxidativo (Buhimschi y Buhimschi, 2006). Estudios, realizados por Vakilian *et al.* (2009), analizando el efecto del tipo del parto sobre los parámetros de estrés oxidativo en madres y recién nacidos, han

mostrado que el nivel de peroxidación lípidica en el plasma del cordón umbilical de los hijos nacidos por parto natural (VD) es mayor que en los nacidos por cesárea; probablemente este estrés oxidativo ocurrió durante la fase del parto (Mongelli *et al.*, 1997).

En otros estudios no se han observado diferencias respecto al nivel de daño basal en el DNA causado por el estrés oxidativo detectado en la sangre de cordón de 16 recién nacidos por parto vaginal y 16 recién nacidos por CS. Sin embargo, si que se registraron niveles de daño basal significativamente mayores en los linfocitos de sangre de cordón umbilical, recogidos después de una CS, que fueron expuestos a etilmetanosulfonato (EMS) (Whyatt *et al.*, 2007), lo que podría indicar una respuesta diferencial de los linfocitos en función del tipo de parto.

El parto induce efectos apoptóticos según algunos autores (Cindrova-Davies *et al.*, 2007) y, además, se han encontrado estudios que indican que el parto induce alteraciones en las composiciones de los glóbulos blancos (Blackburn, 2007); aunque estas alteraciones no suponen efectos sobre la distribución de los inmunofenotipos de los linfocitos, tal y como se ha observado en un estudio con 472 muestras del cordón y 484 muestras de sangre materna (Hertz-Picciotto *et al.*, 2002).

Muchas mujeres eligen CS sin una razón médica. Entre las razones por las que una mujer puede optar por una CS es el miedo al dolor y por la imagen corporal, entre otros. En cuestión de política de salud, la CS no se debe realizar si no es médicamente necesaria porque puede contribuir a un creciente número de recién nacidos prematuros (<37,2 semanas de gestación). Distintos trabajos muestran que los bebés nacidos antes de las 39 semanas a través de CS son 3-4 veces más susceptibles a tener problemas respiratorios en comparación con los recién nacidos a término (Tita *et al.*, 2009). Este hallazgo también indica que las mujeres que optan por una CS pueden estar bajo presión psicológica y bajo experiencia de emociones negativas y asocian la posibilidad de tener bebés con reacciones adversas fisiológicas.

Por otra parte, según estudios previos se ha observado que aproximadamente el 2-7% de las mujeres pueden desarrollar trastornos de estrés postraumático (PTSD) algún tiempo después del parto (Olde *et al*, 2006; White *et al*, 2006; Leeds y Hargreaves, 2008). Las mujeres que reciben cesáreas de emergencia (EmCS) y partos vaginales instrumentales (IVD) se encuentran en mayor riesgo de desarrollar PTSD, en comparación con las mujeres que tenían partos vaginales normales (NVD) o la cesárea electiva (ELC). Lo que también puede explicar los niveles de daño oxidativo observados en las madres.

La administración de medicamentos durante el proceso del parto ha generado un debate sobre posibles asociaciones con defectos en el nacimiento, al igual que con la aparición de ciertas enfermedades cardiovasculares y alergias. El estudio de Wen *et al.* (2002), ha mostrado que la administración de antihistamínicos está asociada con alergias en los futuros individuos; por su parte, Robison *et al.* (1989) han mostrado una relación entre el uso de este tipo de medicamentos y la incidencia de leucemia (AML).

Hasta el momento, sólo unos pocos estudios se han centrado en examinar la relación entre la temporada del parto y los trastornos en las madres, y los resultados de esos estudios no son consistentes (Yang *et al.*, 2011). Por lo tanto, es importante investigar más a fondo si la temporada y el tipo de parto se asocian con trastornos en las madres. Según se sugiere, aquellas mujeres que tienen sus hijos en otoño e invierno presentan una mayor tendencia a presentar trastornos afectivos, que las que los tienen en primavera y verano (Hiltunen *et al.*, 2004). Estos trastornos pueden suponer apatía, tristeza, una hipersomnia y comer de forma compulsiva (Magnusson, 2000; Lurie *et al*, 2006). Sin embargo, otros estudios no han confirmado estos resultados (Panthangi *et al.*, 2009). En nuestro estudio, se ha observado que en las madres que dieron a luz en otoño, su nivel de daño oxidativo es más elevado que en el observado en las otras madres, lo que podría explicarse por el estado y hábitos de las madres en esta temporada del año. Esto también se observó en los recién nacidos por lo que respecta a los niveles de purinas oxidadas.

Son diversos los estudios que han asociado un mayor peso al nacer con un aumento del riesgo de ciertas patologías, incluidas la leucemia (ALL) (Hjalgrim *et al.*, 2003), particularmente en los niños varones (Dorak *et al.*, 2007). En otros estudios, el mayor o menor suministro de nutrientes y de oxígeno durante la gestación se ha considerado un factor clave en la regulación del crecimiento fetal (Harding y Johnston 1995).

En los neonatos estudiados en nuestra población, el género no ha presentado asociación con los niveles de daño. Así, después de incluirlo en el modelo aplicado, el género no mostró influir de manera significativa ni en los niveles de daño genético basal ni en los niveles de daño oxidativo. En los estudios donde se ha investigado la modulación del daño en el DNA por el género, sólo Lam *et al.* (2002), han encontrado que ser varón es un factor que predispone a un incremento del daño genético; pero, en general, la mayoría de estudios muestran resultados negativos, sin una tendencia clara en ninguna de las dos direcciones (Møller *et al.*, 2000).

Otra característica del neonato que se ha tenido en cuenta es el hecho de ser el primer niño nacido, lo que se ha asociado con un mayor riesgo de sufrir ALL (Dockerty *et al.*, 2001), aunque lo contrario también se ha observado (Shu *et al.*, 2002). En nuestra población este factor no parece tener ningún efecto sobre los niveles de daño genético en los neonatos; sin embargo, en las madres, se observaron diferencias significativas en el nivel de daño oxidativo (pirimidinas oxidadas) con respecto a este factor.

Hay que resaltar que los factores que han mostrado alguna influencia son diferentes y dependen de muchas situaciones, lo que estaría confirmando lo difícil que es encontrar factores de confusión “universales” en el ensayo del cometa, y que puedan ser aplicables, independientemente de la población analizada. Pero de todas maneras, podríamos concluir que el ensayo del cometa ha sido capaz de confirmar la influencia de algunos factores de confusión mencionados en la literatura, aunque al analizar cada uno por si solo, ninguno de ellos ha mostrado asociaciones claras, tanto con respecto a los niveles de daño obtenidos, como con respecto a la capacidad de reparación.

5.3. Los patrones dietéticos en la investigación epidemiológica

Dado que los alimentos se consumen juntos y muchos tipos de nutrientes pueden contribuir de forma similar sobre el mismo efecto, la evaluación de los patrones alimentarios surgió como una forma de consolidar la dieta como parámetro, en lo que se puede considerar como un método válido para evaluar la asociación entre la ingesta diaria y la enfermedad (Slattery *et al.*, 1998).

Así, los patrones dietéticos se han utilizado en investigación epidemiológica para sintetizar el consumo de la dieta y para evaluar como una determinada dieta se asocia con las enfermedades. Sin embargo, todavía quedan muchos aspectos a dilucidar por lo que respecta al uso e interpretación de los patrones de la dieta. Estos aspectos incluyen la manera de recopilar, resumir y clasificar los hábitos alimentarios, así como la forma de interpretar los resultados. La arbitrariedad en la definición de los patrones de la dieta a menudo supone inconsistencias entre los resultados obtenidos en distintos estudios. Es por esto, que la utilización de los patrones de la dieta como una herramienta para estudios de salud pública es un tema conflictivo, con distintos frentes abiertos.

Uno de los objetivos de nuestro estudio al examinar la ingesta dietética ha sido la caracterización de la dieta de las madres para determinar si existe algún tipo de asociación entre la dieta y los biomarcadores utilizados para medir daño en el DNA. Obviamente, las conclusiones obtenidas si los estudios se realizan de manera rigurosa pueden ser útiles para dictar recomendaciones de salud pública y sugerir vías de prevención. Cabe recordar que según Slattery *et al.* (2010), la dieta es un factor de riesgo modificable y, por lo tanto, es importante entender las asociaciones de la dieta y diversas patologías para poder hacer recomendaciones sobre salud pública.

La interpretación de los datos de los estudios de los patrones alimentarios ha ido mejorando con el tiempo y en la actualidad algunos cuestionarios de frecuencia alimentaria permiten un amplio examen de los alimentos ingeridos y, por lo tanto, hasta una evaluación completa de los nutrientes ingeridos. El cuestionario de frecuencia alimentaria utilizado en nuestro estudio, presenta varias entradas y llega a incorporar hasta 400 items incluyendo alimentos, bebidas,

suplementos y métodos de preparación de los alimentos ingeridos por las madres durante los últimos meses del embarazo. Este elevado número de entradas da un valor especial a la información recolectada en nuestro estudio, en comparación con otros CFA que tienen menos alimentos listados informando, por tanto, de cantidades proporcionalmente menores de nutrientes.

Respecto a la evolución de los estudios que han utilizado la información recolectada en los CFA, los primeros estudios se centraron en los alimentos consumidos, mientras que los estudios más recientes evalúan los nutrientes. Los avances en la computación y el mejor conocimiento de la composición de los alimentos han posibilitado un análisis más amplio de los nutrientes ingeridos. Sin embargo, tanto para los alimentos como para los nutrientes, los resultados a veces inconsistentes han dado lugar a una importante confusión en cuanto a sus verdaderas asociaciones con las enfermedades y han dejado a los epidemiólogos y a los profesionales de la salud con las preguntas de por qué existen tales diferencias en las asociaciones de la dieta y la enfermedad entre las poblaciones. A pesar de que algunas diferencias podrían atribuirse a los cuestionarios específicos utilizados para determinar la ingesta dietética, otras diferencias en las asociaciones con la enfermedad pudieran derivarse de cómo se han analizado los datos.

Aunque la decisión de que tipo y que número de alimentos deben entrar en el análisis factorial en un aspecto delicado del estudio; así, en el caso de que un CFA contenga más de 100 alimentos individuales, generalmente no es práctico que todos los alimentos se analicen independientemente, por lo que se suele aconsejar como etapa inicial que estos se estructuren en grupos de alimentos para simplificar el análisis.

El número de grupos de alimentos a establecer es variable; así, aunque 35 grupos de alimentos se han llegado a utilizar para obtener patrones dietéticos (Slattery *et al.*, 1998; Dalvi *et al.*, 2007), otros números de grupos de alimentos como 42 (Fung *et al.*, 2001) y 52. (Murtaugh *et al.*, 2007) también se ha utilizado. Todavía existen muchas preguntas que no tienen respuestas adecuadas. En este contexto y para tratar de resolver algunas dudas, en la Tabla 26 se indican algunas

preguntas que surgen a la hora de establecer patrones dietéticos, junto con las posibles repuestas ante tales cuestiones (Slattery *et al.*, 2010).

Tabla 26. Problemas y posibles soluciones para el uso de los patrones dietéticos	
Cuestiones	Possible soluciones
¿La calidad del patrón de la dieta depende de la buena calidad de los datos ?	Uso de cuestionarios robustos para determinar el consumo individual.
¿Cuántos grupos de alimentos se deben incluir en el análisis?	Agrupar los alimentos para mantener las características únicas que pueden distinguir a los individuos.
¿Las etiquetas del patrón dietéticos son arbitrarias ?	Proporcionar datos para las puntuaciones de los factores para que la gente puede ver que alimentos han contribuido en el patrón
¿Cómo se debe interpretar los resultados de los estudios, teniendo en cuenta las diferentes etiquetas?	Considerar los alimentos de interés que contribuyen en el patrón de la dieta.
¿Cómo se puede determinar si se obtiene más información adquirida por un patrón frente a los alimentos o nutrientes individuales ingeridos?	Considerar los alimentos que contribuyen en el modelo como factores de riesgo independientes.

En nuestro caso, la agrupación de los productos lácteos en productos lácteos ricos en grasa y bajos en grasa; granos integral y refinado; de la carne en los tipos de carnes roja y blanca, etc. nos ayuda a conservar las características dietéticas que pueden llegar a describir un patrón dietético determinado. En este contexto, Downs y Willows (2008) han establecido una pirámide para la dieta mediterránea, indicando los alimentos y su frecuencia de consumo para un adulto sano. En esta dieta, las frutas y verduras, ricas a su vez en fibra, aseguran las suficientes fuentes vitamínicas y minerales, mientras que las grasas o lípidos aportan aproximadamente el 35% del aporte energético total. El análisis del patrón dietético de nuestra población de madres indica que se corresponde con este patrón dietético.

Un estudio parecido al nuestro sobre la ingesta diaria de alimentos de madres embarazadas en Dinamarca (Pedersen *et al.*, 2009), utilizando un CFA muy detallado, ha mostrado que el patrón dietético de esta población de madres es muy diferente al nuestro. Lo que también podría confirmar que los hábitos alimentarios de una población, se pueden definir fácilmente con el uso de un CFA. Es quizás por esto que los patrones dietéticos se han aplicado con éxito en estudios que relacionan a diferentes poblaciones con distintas enfermedades y con indicadores de salud. Sin embargo, existen todavía demasiadas preguntas sin respuestas, tales como, ¿es más fácil para las personas mejorar sus dietas si piensan más en general, en lo que comen? ¿estamos mirando a los amplios niveles de consumo en busca de una varita mágica? ¿son los patrones de la dieta lo suficientemente específicos para ser útiles? ¿será más fácil hacer recomendaciones si se obtienen resultados más consistentes para una determinada enfermedad, así como para muchas enfermedades crónicas?

La incidencia de la dieta se visualiza en los estudios que indican que las personas que seguían la denominada dieta occidental tenían un riesgo mayor del 80% de desarrollar cáncer de colon, en comparación con los que siguen otros tipos de dieta que son menos propensos a desarrollar este tipo de cáncer (Terry *et al.*, 2001; Kolaheoos *et al.*, 2009).

En resumen, podemos decir que los patrones de la dieta son herramientas útiles para evaluar asociaciones con la salud y la enfermedad. Aunque los patrones alimentarios basados en los alimentos son fáciles de entender por el público, dado que muchos de los componentes que los integran y la interpretación de los patrones dietéticos son arbitrarios, es necesaria una constante reevaluación de las mismas para entender lo que representan antes de hacer recomendaciones generales a la sociedad. En la Tabla 27, se han seleccionado algunos de las ventajas e inconvenientes que suponen la utilización de un patrón dietético.

Tabla 27. Ventajas e inconvenientes de la utilización de los patrones alimentarios en las recomendaciones de salud pública y las decisiones políticas de salud.

Ventajas	Inconvenientes
La gente come muchos alimentos y no tiene sentido centrarse en unos pocos alimentos y nutrientes.	Si un solo nutriente es importante, es posible pasarlo por alto si enfocamos el tema a nivel global.
La gente debe acercarse a su dieta de manera más holística. No sabemos cuál es la fórmula ideal.	Tenemos que mirar internamente en los patrones para determinar si un alimento o nutriente es más importante que los otros.
No hay una sola fórmula mágica para los factores alimenticios que prevengan las enfermedades crónicas, mientras que los patrones dietéticos dan el mensaje consistente para múltiples enfermedades.	Las etiquetas son arbitrarias y por lo tanto pueden generar errores a la hora de establecer patrones.
Las fórmulas ideales pueden llevar a tomar suplementos sin tener en cuenta la dieta.	
Debido a que la gente come muchos alimentos que tienen nutrientes similares, puede ser más fácil comer una dieta más saludable si la enfocamos más a nivel global.	

5.4. Asociaciones entre daño y exposición a contaminantes a través de la dieta

Existen evidencias de que las partículas derivadas de la combustión o los metales de transición (e.g., hierro, cobre, cromo, y vanadio) pueden generar estrés oxidativo en las madres expuestas y afectar negativamente al embrión en sus primeras fases de crecimiento (Mohorovic, 2003; 2004). Según la propuesta de Topinka *et al.* (1997), la exposición transplacentar a éstos, y otros agentes, podría dar lugar a daño en el DNA, alterando la expresión de distintos genes y aumentando el número de aductos en el DNA de la placenta.

Esta propuesta se apoya en las observaciones de otro estudio en el que se encuentran elevados niveles de aductos en el DNA de la placenta en mujeres que viven en áreas con niveles altos de contaminación atmosférica (Topinka *et al.*, 1997).

Además, la exposición a los PAHs en la madre puede conducir a un aumento de aductos en el DNA (Perera *et al.*, 1998), y a un bajo peso al nacer en sus hijos, así como retraso en el crecimiento intrauterino (Dejmek *et al.*, 2000). La exposición a genotóxicos también se asocia con la inflamación sistémica (Brooks *et al.*, 2004) que conduce al estrés oxidativo. En el estudio de Bobak (2000) se vió que la inhalación de partículas de azufre durante el embarazo puede provocar una inflamación aguda de la placenta y también pulmonar. Esta inflamación puede estar asociada con una perfusión inadecuada de la placenta (Knottnerus *et al.*, 1990), que puede provocar en la misma respuestas inflamatorias y secuelas biológicas, que conducen a un deterioro en el intercambio de nutrientes transplacentarios. Una perfusión placentaria inadecuada puede causar retraso en el crecimiento en el útero debido a la interferencia con algunos procesos que afectan, por ejemplo, a la nutrición del feto, la oxigenación reducida de la sangre materna, o ambas cosas. Por ejemplo, se puede esperar una rápida disminución de la expulsión de la placenta de los ácidos grasos esenciales y el ácido araquidónico (Crawford, 2000).

Otros investigadores han destacado la importancia de la nutrición como un factor de modulación de los efectos producidos por la exposición a contaminantes. Esto se ha observado con aquellos agentes que causarían problemas cardiovasculares (Schwartz, 2001; Ostro *et al.*, 2006).

Utilizando datos del Third National Health and Nutrition Examination Survey, (NHANES III), Schwartz (2001) examinó el papel de la nutrición en la asociación entre la exposición a partículas de dióxido de azufre en el aire y eventos de incidentes isquémicos. Tomando en cuenta un conjunto limitado de factores de la dieta (grasas saturadas, fibra, alcohol, caféina, pescados y mariscos), este autor concluye que los factores seleccionados no modificaron la asociación con los biomarcadores seleccionados; sin embargo, los biomarcadores utilizados se

limitaron a fibrinógeno, recuento de glóbulos blancos y plaquetas, presión arterial sistólica, colesterol total, colesterol y lipoproteínas de colesterol. Es por este motivo, que estos estudios deberían ampliarse utilizando tanto una lista más amplia de los componentes de la dieta como biomarcadores más sensibles al daño genético.

Respecto a los recién nacidos, en un estudio se ha detectado, después de una exposición materna a diversos contaminantes atmosféricos, un aumento de los aductos en el DNA y en la frecuencia de MN en sangre del cordón umbilical, lo que demuestra que estas exposiciones ambientales transplacentarias inducen daño en el DNA de los recién nacidos (Pedersen *et al.*, 2009). En otro estudio, llevado a cabo en Alemania, se evaluaron los niveles basales de daño en madres e hijos (de aproximadamente 6 años) expuestos a hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en el lugar de residencia, comparándolos con los resultados obtenidos en madres e hijos de zonas rurales, demostrando un incremento en los niveles de daño en el DNA en el grupo expuesto. Aunque este incremento mostró una débil asociación entre la exposición y los niveles de daño medidos con el ensayo del cometa, se detectó una fuerte correlación positiva entre los niveles de daño en el DNA de las madres con los de sus hijos (Wilhelm *et al.*, 2008). De las observaciones de este trabajo se desprende la idea de que el sinergismo con otros potenciales agentes genotóxicos y una predisposición genética compartida, podrían desempeñar un papel importante.

En nuestro estudio, se ha estimado la ingesta diaria de distintos contaminantes utilizando los CFA confirmando la exposición materna a este tipo de contaminantes a través la dieta; sin embargo, no se ha demostrado ningún tipo de asociación con nuestro biomarcador analizado. Estos contaminantes (Tabla 2) están descritos en la literatura y clasificados según las Monografías del IRAC para ser investigados individualmente. Lo que se puede sugerir es que la ingesta de contaminantes a través de la dieta en general durante el embarazo está por debajo del límite de riesgo. Esto puede ser cierto ya que las madres, sobre todo durante el embarazo, suelen seguir una dieta bastante sana.

Según, los estudios epidemiológicos no se ha demostrado, por ejemplo, ninguna asociación directa entre el riesgo de cáncer y la ingesta de acrilamida, aunque los estudios sobre todo su relación con el cáncer en el Programa de Toxicología Nacional de EE.UU, aun no se han completado. La finalización de este estudio podría probar por métodos epidemiológicos que un compuesto como la acrilamida en los alimentos puede suponer un riesgo de cáncer. Las dudas acerca de la interpretación de los resultados se deben a que estas exposiciones se dan simultáneamente a otras, lo que puede hacer difícil "separar" los efectos. En la etapa actual de conocimiento, no se puede descartar que la acrilamida en los alimentos constituya un riesgo de cáncer de magnitud no-aceptable aunque será difícil de probar.

Respecto a la ingesta de micotoxinas y su asociación con el riesgo de cáncer u otras enfermedades, se ha confirmado en muchos estudios *in vitro* la contribución del deoxinivalenol en el estrés oxidativo en células HepG2 (Zhang *et al.*, 2009). Aunque en la revisión de Ma y Guo (2008) se llegó a concluir que el DON como contaminante del trigo, no puede ser clasificado como carcinogénico, dado que los resultados de diversos estudios realizados *in vitro* son contradictorios es importante hacer más investigaciones sobre la carcinogénesis del DON, considerando la exposición crónica o aguda en los humanos. En este contexto, Schothorst y Emond (2004) mostraron en su trabajo que la ingesta media de DON en una población europea de adultos está por debajo del IST (Ingesta Semanal Tolerable), aunque en los niños pequeños esta media está muy cerca de dicho límite.

5.5. La dieta y su papel modulador del daño genético

La privación de micronutrientes es uno de los factores de estrés materno más frecuente en todo el mundo, sobre todo en sub-poblaciones que experimentan diferentes perfiles de exposición ambiental.

Según Kant y Schatzkin (1999), se pueden establecer distintas vías biológicas asociadas con la nutrición: la primera se basa en la ingesta de nutrientes, la segunda se basa en el consumo de grupos de alimentos y una tercera que combina ambos enfoques.

En las últimas dos décadas, la comprensión de los nutrientes cardioprotectores y otros alimentos ha aumentado considerablemente, debido a los estudios sobre los mecanismos moleculares y los efectos metabólicos. Los investigadores suelen estimar la ingesta de nutrientes utilizando cuestionarios de frecuencia alimentaria (Block *et al.*, 2001), los registros de alimentos y/o la dieta de 24 horas. Los valores de los nutrientes pueden ser determinados usando bases de datos existentes, complementados con la información suministrada por los fabricantes y los análisis bioquímicos.

Por ejemplo un estudio sugiere que existe un fuerte efecto protector del consumo de vitamina C y de potasio en la vida temprana de los niños (Kwan *et al.*, 2004). Alrededor del año 1970 se descubrió que la vitamina C inhibe la formación de nitrosaminas debido a sus propiedades de oxidación-reducción. En consecuencia, la adición de 550 ppm de ácido ascórbico es ahora un requisito en la fabricación de embutidos en los EE.UU. En el caso del folato, se ha sugerido que los suplementos de ácido fólico durante el embarazo protegen contra la ALL infantil (Thompson *et al.*, 2001). Sin embargo, hay que destacar que existen diferencias en la forma en que las personas metabolizan el ácido fólico y esto puede ser importante en el papel atribuido a una determinada del mismo (Wiemels *et al.*, 2001). Una deficiencia en el ácido fólico, por lo tanto, puede llevar a una incorporación del uracilo en el DNA y a la expresión inadecuada de genes hipometilados. Ambos efectos posiblemente podrían conducir a la transformación celular (Wei *et al.*, 2003), sobre todo durante el embarazo y el desarrollo fetal.

En un estudio europeo con adultos (n= 1086) se ha observado una asociación significativa entre una elevada ingesta de fibras y unos niveles de aductos en el DNA muy bajos (Peluso *et al.*, 2008), también se ha observado una correlación inversa entre el consumo de frutas y verduras y los niveles de aductos en el DNA (Palli *et al.*, 2000). Por el contrario, en una población danesa (n=375), no se observó ninguna asociación entre la ingesta de antioxidantes o de suplementos y los aductos en el DNA como biomarcador de daño genético (Eriksen *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, la ingesta de vitamina C, folato, omega 6 y proteínas, parece estar asociada con los niveles de daño genético basal y oxidativo detectados

en madres y en sus recién nacidos, pero no con la capacidad de reparación. Esta asociación se puede observar después de una ingesta de varios alimentos con un alto contenido en antioxidantes.

Hay que señalar que en los estudios de biomonitorización es importante contar con datos relacionados con el modo de acción de los agentes evaluados. En este sentido, el ensayo del cometa ha aportado información fundamental sobre los mecanismos de genotoxicidad y respuestas celulares. Esto es crucial cuando se trata de interpretar los datos de biomonitorización en términos de riesgo de cáncer.

De hecho nuestros datos constituyen una pequeña parte de un gran proyecto europeo (NewGeneris) en el que participan epidemiólogos, quienes manejan complejas bases de datos considerando múltiples factores de confusión en diferentes cohortes europeas. Es posible que de este estudio surjan resultados relevantes acerca del papel que ejercen los distintos factores de confusión en los niveles de daños cuantificados por el ensayo del cometa.

Respecto al estudio de los patrones dietéticos de esta población, en general, los beneficios para la salud de una dieta de estilo mediterráneo se han convertido en un patrón dietético muy famoso desde que Keys (1980) lo marcó en siete países. La adherencia a la dieta mediterránea se asocia con una reducción significativa de la mortalidad total, de la enfermedad coronaria y de la mortalidad por cáncer. En nuestro estudio se ha observado que los niveles de daño genético de las poblaciones de madres e hijos analizadas por nosotros, no resultaron ser diferentes de los niveles considerados normales; de hecho, los niveles de daño de las madres, tanto basal como oxidativo, concuerdan con los valores observados en los 125 estudios revisados por Møller (2006).

Por último, podemos decir que la utilización de este ensayo en todas sus versiones y modificaciones, puede llegar a desempeñar un papel muy importante en los estudios de biomonitorización. La versión que incluye el uso de enzimas específicas, que permiten la detección de diferentes tipos de lesiones en las bases del DNA, convierte al ensayo del cometa en una buena herramienta para detectar mecanismos específicos de acción de los agentes/exposiciones evaluados. Además

de las enzimas que detectan daño oxidativo, que han sido las utilizadas en este estudio, esta herramienta puede llegar a tener un futuro importante si se pueden encontrar/utilizar otras enzimas que detecten otros tipos específicos de lesiones. Además, varias modificaciones del ensayo diseñado para medir la capacidad de reparación, permiten el estudio de este importante marcador, a la vez que el estatus antioxidante puede ser medido evaluando *in vitro* el daño inducido en linfocitos por el H₂O₂. Así, la introducción de un marcador de estrés oxidativo y defensas antioxidantes, especialmente en los estudios de biomonitorización humana, se considera como necesaria y esencial (Mayne, 2003).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados, y como fruto de la discusión de los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que la versión del ensayo del cometa utilizada en este trabajo ha sido muy eficiente en la manipulación de múltiples muestras, incluyendo muestras de madres y de sus recién nacidos en el mismo experimento aumentado, por lo tanto, el rendimiento y la eficacia del ensayo sin afectar a su sensibilidad.
2. Los niveles del daño genético basal detectados en los linfocitos de sangre periférica de las madres se encuentran correlacionados con los niveles de daño de sus recién nacidos. Esto puede suponer que existe una predisposición genética compartida.
3. Al incorporar las enzimas FPG y EndoIII, para detectar las bases oxidadas en el DNA de las madres y de sus recién nacidos, se ha observado que los niveles de oxidación en el DNA de las madres están correlacionados con los de sus recién nacidos.
4. La asociación positiva observada entre el daño genotóxico en el DNA de los linfocitos del cordón umbilical y el de las madres, sugiere la existencia de intercambios transplacentarios de los agentes involucrados en la inducción de lesiones en el DNA.
5. La capacidad de reparación detectada en los extractos proteicos de los linfocitos de las madres está correlacionada con la observada en sus hijos, aunque, en éstos es más elevada que en sus madres. Esto indicaría una mejor capacidad de reparación de los recién nacidos respecto a sus madres.
6. El análisis de los cuestionarios CFA del estudio, muestra que nuestra población sigue un patrón de alimentación mediterráneo. Este análisis también nos ha permitido determinar la exposición de las madres a diversos contaminantes ambientales vía la dieta y, por lo tanto, una posible exposición de los fetos a través de la placenta.

7. Los resultados muestran que los recién nacidos de mujeres expuestas a contaminantes potencialmente inductores de estrés oxidativo no presentan un mayor nivel de daño oxidativo en su DNA.

8. Nuestros resultados, apoyan la hipótesis de que la exposición materna y los intercambios transplacentarios son eventos biológicos medibles que se pueden detectar en el cordón umbilical, demostrando una posible exposición *in utero*. Así, estas exposiciones transplacentarias pueden ejercer efectos adversos durante el desarrollo fetal.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams S.A. 2007. *In utero* physiology: role in nutrient delivery and fetal development for calcium, phosphorus, and vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.*, 85: 6045–6075.
- Addis A., S. Sharabi, M. Bonati. 2000. Risk classification systems for drug use during pregnancy: are they a reliable source of information? *Drug Saf.*, 23: 245–253.
- Ahnström G., K.A. Edvardsson. 1974. Letter: Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxylapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 26: 493-497.
- Ala-Kokko T.I., P. Myllynen, K. Vähäkangas. 2000. *Ex vivo* perfusion of the human placental cotyledon: implications for anesthetic pharmacology. *Int. J. Obstet. Anesth.*, 9: 26-38.
- Albertini R.J., J.A. Nicklas, J.P. O'Neill. 1996. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.*, 104: 503-510.
- Aldridge J.E., A. Meyer, F.J. Seidler, T.A. Slotkin. 2005. Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ. Health Perspect.*, 113: 1027-1031.
- Almeida G.M., T.L. Duarte, P.B. Farmer, W.P. Steward, G.D. Jones. 2008. Multiple end-point analysis reveals cisplatin damage tolerance to be a chemoresistance mechanism in a NSCLC model: implications for predictive testing. *Int. J. Cancer*, 122: 1810-1819.
- Ames B.N., M.K. Shigenaga, T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 7915-7922.

- Arab K., M. Pedersen, J. Nair, M. Meerang, L.E. Knudsen, H. Bartsch. 2009. Typical signature of DNA damage in white blood cells: a pilot study on etheno adducts in Danish mother-newborn child pairs. *Carcinogenesis*, 30: 282-285.
- Aragonés N., B. Pérez-Gómez, J. Astray, E. Gil, A.M. Pérez-Meixeira, C. de Paz, A. Iriso, *et al.* 2008. Biomonitoring of exposure to environmental pollutants in newborns and their parents in Madrid, Spain (BioMadrid): study design and field work results. *Gac. Sanit.*, 22: 483-491.
- Audus K.L. 1999. Controlling drug delivery across the placenta: *Eur. J. Pharm. Sci.*, 8: 161-165.
- Autrup H., A.B. Vestergaard, H. Okkels. 1995. Transplacental transfer of environmental genotoxins: polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin in non-smoking women, and the effect of maternal *GSTM1* genotype. *Carcinogenesis*, 16: 1305-1309.
- Ayaori M., T. Hisada, M. Suzukawa, H. Yoshida, M. Nishiwaki, T. Ito, K. Nakajima, *et al.* 2000. Plasma levels and redox status of ascorbic acid and levels of lipid peroxidation products in active and passive smokers. *Environ. Health Perspect.*, 108: 105-108.
- Barbieri R.L., J. Gochberg, K.J. Ryan. 1986. Nicotine, cotinine, and anabasine inhibit aromatase in human trophoblast *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 77: 1727-1733.
- Barker D.J, P.M. Clark. 1997. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.*, 2: 105-112.
- Benetou V., A. Trichopoulou, P. Orfanos, A. Naska, P. Lagiou, P. Boffetta, D. Trichopoulos, Greek EPIC cohort. 2008. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *Br. J. Cancer*, 99: 191-195.

- Benirschke K. 1990. The placenta in the litigation process. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 162: 1445-1448.
- Bentley S., A. Hermes, D. Phillips, Y.A. Daoud, S. Hanna. 2011. Comparative effectiveness of a prenatal medical food to prenatal vitamins on hemoglobin levels and adverse outcomes: a retrospective analysis. *Clin. Ther.*, 33: 204-210.
- Bhatnagar A., M. Deutsch. 2006. The role for intensity modulated radiation therapy (IMRT) in pediatric population. *Technol. Cancer. Res. Treat.*, 5: 591-595.
- Bjelland S., E. Seeberg. 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.*, 531: 37-80.
- Blackburn S. 2007. *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective (Maternal Fetal and Neonatal Physiology)*. (3rd edition). WB Saunders Co.
- Blanpain C., M. Mohrin, P.A. Sotiropoulou, E. Passegue. 2011. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell. Stem. Cell.*, 8: 16-29.
- Błasiak J. 2001. Ethanol and acetaldehyde impair the repair of bleomycin-damaged DNA in human lymphocytes. *Cytobios*, 106: 141-149.
- Block G. 1992. Vitamin C status and cancer. Epidemiologic evidence of reduced risk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 669: 280-290.
- Block G., E. Norkus, M. Hudes, S. Mandel, K. Helzlsouer. 2001. Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption?. *Am. J. Epidemiol.*, 154: 1113-1118.
- Bobak M. 2000. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ. Health Perspect.*, 108: 173-176.

- Boiteux S. 1993. Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 19: 87-96.
- Bonassi S, A. Znaor, H. Norppa, L. Hagmar. 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet. Genome Res.*, 104: 376-382.
- Bostrom C.E, P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernström, C. Johansson, T Kyrklund, A Rannug, *et al.* 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.*, 110: 451-488.
- Bourget P., I. Broise, V. Quinquis-Desmaris, J.C. Gabilan. 1995. Pharmacokinetics of clofibrate in jaundiced newborn infants at term. *Arch. Pediatr.*, 2: 722-728.
- Brooks D.R., L.A. Mucci, E.E. Hatch, S. Cnattingius. 2004. Maternal smoking during pregnancy and risk of brain tumors in the offspring. A prospective study of 1.4 million Swedish births. *Cancer Causes Control*, 15: 997-1005.
- Buhimschi C.S., I.A. Buhimschi. 2006. Advantages of vaginal delivery. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 49: 167-183.
- Bui Q.Q., M.B. Tran, W.L. West. 1986. A comparative study of the reproductive effects of methadone and benzo[a]pyrene in the pregnant and pseudopregnant rat. *Toxicology*, 42: 195-204.
- Burdge G.C., K.A. Lillycrop, A.A. Jackson. 2009. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease. Alternative endings in an epigenetic tale?. *Br. J. Nutr.*, 101: 619-630.
- Cadet J., M. Berger, T. Douki, B. Morin, S. Raoul, J.L. Ravanat, S. Spinelli. 1997. Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol. Chem.*, 378: 1275-1286.

- Campalans A., S. Marsin, Y. Nakabeppu, T.R. O'connor, S. Boiteux, J.R. Radicella. 2005. XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 12: 826-835.
- Canfield R.L., C.R. Henderson, D.A. Cory-Slechta, C. Cox, T.A. Jusko, B.P. Lanphear. 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per decilitre. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1517-1526.
- Caporaso N. 2003. The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95: 1263-1265.
- Catov J.M., A.B. Newman, J.M. Roberts, K.C. Sutton-Tyrrell, S.F. Kelsey, T. Harris, R. Jackson, *et al.* 2007. Association between infant birth weight and maternal cardiovascular risk factors in the health, aging, and body composition study. *Ann. Epidemiol.*, 17: 36-43.
- Cavallo D., P. Tomao, A. Marinaccio, B. Perniconi, A. Setini, S. Palmi, S. Iavicoli. 2002. Evaluation of DNA damage in flight personnel by comet assay. *Mutat. Res.*, 516: 148-152.
- Chatzi L., M. Mendez, R. Garcia, T. Roumeliotaki, J. Ibarluzea, A. Tardón, P. Amiano, *et al.* 2011. Mediterranean diet adherence during pregnancy and fetal growth: INMA (Spain) and RHEA (Greece) mother-child cohort studies. *Br. J. Nutr.*, 29: 1-11.
- Chen L., W. Yang, B.L. Jennison, A. Goodrich, S.T. Omaye. 2002. Air pollution and birth weight in northern Nevada, 1991-1999. *Inhal. Toxicol.*, 14: 141-57.
- Cindrova-Davies T., H.W. Yung, J. Johns, O. Spasic-Boskovic, S. Korolchuk, E. Jauniaux, G.J. Burton, *et al.* 2007. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am. J. Pathol.*, 171: 1168-1179.

- Collins A.R. 1999. Oxidative DNA damage antioxidants and cancer. *Bioessays*, 21: 238-246.
- Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles applications and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26: 249-261.
- Collins A.R. 2010. The use of bacterial repair endonucleases in the comet assay. *Methods Mol. Biol.*, 691: 137-147.
- Collins A.R., E. Horvathova. 2001. Oxidative DNA damage antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.*, 29: 337-341.
- Collins A.R., S.J. Duthie, V.L. Dobson. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1733-1735.
- Collins A.R., D.L. Mitchell, A. Zunino, J. de Wit, D. Busch. 1997. UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environ. Mol. Mutagen.*, 29: 152-160.
- Collins A.R., M. Dusinska, E. Horvathova, E. Munro, M. Savio, R. Stetina. 2001. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay. *Mutagenesis*, 16: 297-301.
- Cook P., I. Brazell, E. Jos. 1976. Characterization of nuclear structure containing superhelical DNA. *J. Cell. Sci.*, 22: 303-324.
- Crawford M. 2000. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71: 2755-2845.
- Crinnion W.J. 2009. Maternal levels of xenobiotics that affect fetal development and childhood health. *Altern. Med. Rev.*, 14: 212-222.

- Dalvi T.B., A.J. Canchola, P.L. Horn-Ross. 2007. Dietary patterns, Mediterranean diet, and endometrial cancer risk. *Cancer Cause Control*, 18: 957-966.
- Daston G., E. Faustman, G. Ginsberg, P. Fenner-Crisp, S. Olin, B. Sonawane, J. Bruckner, *et al.* 2004. A framework for assessing risks to children from exposure to environmental agents. *Environ. Health. Perspect.*, 112: 238-256.
- de Assis K.R., M.S. Ladeira, R.C. Bueno, B.F. Dos Santos, I. Dalben, D.M. Salvadori. 2009. Genotoxicity of cigarette smoking in maternal and newborn lymphocytes. *Mutat. Res.*, 679: 72-78.
- de la Chica R.A, I. Ribas, J. Giraldo, J. Egozcue, C. Fuster. 2005. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA.*, 293: 1212-1222.
- DeCaprio A.P, 1997. Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ. Sci. Tech.*, 31: 1837-1848.
- Decordier I., K. De Bont, K. De Bock, R. Mateuca, M. Roelants, R. Ciardelli, D. Haumont, *et al.* 2007. Genetic susceptibility of newborn daughters to oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, 172: 68-84.
- Dejmek J., I. Solansky, I. Benes, J. Lenicek, R.J. Sram. 2000. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ. Health Perspect.*, 108: 1159-1164.
- Delany C., R. McDonnell, M. Robson, S. Corcoran, C. Fitzpatrick, D. De la Harpe. 2011. Folic acid supplement use in the prevention of neural tube defects. *Ir. Med. J.*, 104: 12-15.
- DeMarini D.M. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.*, 567: 447-474.

- Díaz-Sánchez D. 1997. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy*, 52: 52-56.
- Dizdaroglu M. 2003. Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, 531: 109-126.
- Dockerty J.D., G. Draper, T. Vincent, S.D. Rowan, K.J. Bunch. 2001. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. *Int. J. Epidemiol.*, 30: 1428-1437.
- Doll R., R. Peto. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 66: 1191-1308.
- Doll R., R. Peto, J. Boreham, I. Sutherland. 2004. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ.*, 328: 1519.
- Dorak M.T., M.S. Pearce, D.M. Hammal, R.J. McNally, L. Parker. 2007. Examination of gender effect in birth weight and miscarriage associations with childhood cancer (United Kingdom). *Cancer Causes Control*, 18: 219-228.
- Downs S.M., N.D. Willows. 2008. Should Canadians eat according to the traditional Mediterranean diet pyramid or Canada's food guide?. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 33: 527-535.
- Dusinská M., A.R. Collins. 1996. Detection of oxidized purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *ATLA*, 24: 405-411.
- Dusinská M., A.R. Collins. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23: 191-205

- Duthie S.J., A. Ma, M.A. Ross, A.R. Collins. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.*, 56: 1291-1295.
- Einarsdóttir K., T. Rylander-Rudqvist, K. Humphreys, S. Ahlberg, G. Jonasdóttir, E. Weiderpass, K.S. Chia, *et al.* 2005. CYP17 gene polymorphism in relation to breast cancer risk: a case-control study. *Breast Cancer Res.*, 7: 890-896.
- Ellahuene M.F., L.P. Pérez-Alzola, M. Farfan-Urzuá, P. González-Hormazabal, M. Garay, M.I. Olmedo, J.A. Last. 2004. Preliminary evaluation of DNA damage related with the smoking habit measured by the comet assay in whole blood cells. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.*, 13: 1223-1229.
- El-Zein R.A. C.M. Monroy, A. Cortes, M.R. Spitz, A. Greisinger, C.J. Etzel, 2010, Rapid method for determination of DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes amongst smokers. *BMC Cancer*, 10: 439.
- Enders A.C., T.N. Blankenship. 1999. Comparative placental structure. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 38: 3-15.
- Eriksen K.T., M. Sørensen, H. Autrup, U. Vogel, K. Overvad, A. Tjønneland, S. Loft, O. Raaschou-Nielsen. 2010. Lifestyle, environmental, and genetic predictors of bulky DNA adducts in a study population nested within a prospective Danish cohort. *J Toxicol. Environ. Health A.*, 73: 583-595.
- Erkekoglu P., T. Baydar. 2010. Evaluation of the protective effect of ascorbic acid on nitrite- and nitrosamine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatoma line. *Toxicol. Mech. Methods*, 20: 45-52.
- ESCODD. 2000. Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). *Free. Radic. Res.*, 32: 333-341.

- Evans M.D., M. Dizdaroglu, M.S. Cooke. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.*, 567: 1-61.
- Everson R.B., E. Randerath, R.M. Santella, R.C. Cefalo, T.A. Avitts, K. Randerath. 1986. Detection of smoking-related covalent DNA adducts in human placenta. *Science*, 231: 54-57.
- Faust F., F. Kassie, S. Knasmuller, R.H. Boedecker, M. Mann, V. Mersch-Sundermann. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 566: 209-229.
- Forestier F., F. Daffos, M. Capella-Pavlovsky. 1984. Low molecular weight heparin (PK 10169) does not cross the placenta during the second trimester of pregnancy study by direct fetal blood sampling under ultrasound. *Thromb. Res.*, 34: 557-560.
- Frankenberg-Schwager M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells *in vitro* by ionizing radiation. *Radiother. Oncol.*, 14: 307-320.
- Fung T.T., E.B. Rimm, D. Spiegelman, N. Rifai, G.H. Tofler, W.C. Willett, F.B. Hu. 2001. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 61-67.
- Gajecka M., M. Rydzanicz, R. Jaskula-Sztul, M. Wierzbicka, W. Szyfter, K. Szyfter. 2005. Reduced DNA repair capacity in laryngeal cancer subjects. A comparison of phenotypic and genotypic results. *Adv. Otorhinolaryngol*, 62: 25-37.
- García A., A.I. Haza, N. Arranz, J. Rafter, P. Morales. 2008. Protective effects of isothiocyanates alone or in combination with vitamin C towards N-nitrosodibutylamine or N-nitrosopiperidine-induced oxidative DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *J. Appl. Toxicol.*, 28: 196-204.

- Ginsberg G., D. Hattis, B. Sonawane, A. Russ, P. Banati, M. Kozlak, S. Smolenski, *et al.* 2002. Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicol. Sci.*, 66: 185-200.
- Godschalk R.W., J.C. Kleinjans. 2008. Characterization of the exposure-disease continuum in neonates of mothers exposed to carcinogens during pregnancy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 102: 109-117.
- Gontijo A.M., F.N. Elias, D.M. Salvadori, M.L. de Oliveira, L.A. Correa, J. Goldberg, J.C. Trindade, J.L. de Camargo. 2001. Single-cell gel (comet) assay detects primary DNA damage in nonneoplastic urothelial cells of smokers and ex-smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.*, 10: 987-993.
- Grandjean P. 1997. Mercurial uncertainties in environmental health. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 837: 239-245.
- Grandjean P., J.J. Heindel. 2008. In utero and early-life conditions and adult health and disease. *N. Engl. J. Med.*, 359: 1523.
- Graves R., J. Laval, A.E. Pegg. 1992. Sequence specificity of DNA repair by *Escherichia coli* Fpg protein. *Carcinogenesis*, 13: 1455-1459.
- Grover P., K. Danadevi, M. Mahboob, R. Rozati, B.S. Banu, M.F. Rahman. 2003. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis*, 18: 201-205.
- Guldner L., C. Monfort, F. Rouget, R. Garlantezec, S. Cordier. 2007. Maternal fish and shellfish intake and pregnancy outcomes: a prospective cohort study in Brittany, France. *Environ. Health*, 6: 33.
- Hagmar L., E. Wirfalt, B. Paulsson, M. Tornqvist. 2005. Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender. *Mutat. Res.*, 580: 157-165.

- Hansen W.K., M.R. Kelley. 2000. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295: 1-9.
- Harding J.E., B.M. Johnston. 1995. Nutrition and fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 539-547.
- Harrington-Brock K., M. Cabrera, D.D. Collard, C.L. Doerr, R. McConnell, M.M. Moore, H. Sandoval, *et al.* 1999. Effects of arsenic exposure on the frequency of *HPRT*-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: a pilot study. *Mutat. Res.*, 431: 247-257.
- Hayes J.D., L.I. McLellan. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 31: 273-300.
- Hecht S.S. 2003. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3: 733-744.
- Heikkilä A., P. Myllynen, L. Keski-Nisula, S. Heinonen, K. Vähäkangas, S. Ylä-Herttuala. 2002. Gene transfer to human placenta *ex vivo*: a novel application of dual perfusion of human placental cotyledon. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 186: 1046-1051.
- Hemminki K., C. Dickey, S. Karlsson, D. Bell, Y. Hsu, W.Y. Tsai, L.A. Mooney, *et al.* 1997. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and *CYP1A1* and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, 18: 345-350.
- Hemstreet G.P., R.B. Bonner, R.E. Hurst, D. Bell, B.L. Bane. 2000. Abnormal G-actin content in single prostate cells as a biomarker of prostate cancer. *Cancer Detect. Prev.*, 24: 464-472.
- Hertz-Picciotto I., M. Dostal, J. Dejmek, S.G. Selevan, G. Wegienka, A. Gomez-Camirero, R.J. Sram. 2002. Air pollution and distributions of lymphocyte immunophenotypes in cord and maternal blood at delivery. *Epidemiology*, 13: 172-183.

- Hiltunen P., J. Jokelainen, H. Ebeling, N. Szajnberg, I. Moilanen. 2004. Seasonal variation in postnatal depression. *J. Affect. Disord.*, 78: 111–118.
- Hjalgrim L.L., T. Westergaard, K. Rostgaard, K. Schmiegelow, M. Melbye, H. Hjalgrim, E.A. Engels. 2003. Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *Am. J. Epidemiol.*, 158: 724-735.
- Hoffmann K., B.C. Zyriax, H. Boeing, E. Windler. 2004. A dietary pattern derived to explain biomarker variation is strongly associated with the risk of coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 633-640.
- Hoffmann H., J. Hogel, G. Speit. 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*, 20: 455-466.
- Hughes M.F. 2006. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ. Health Perspect.*, 114: 1790-1796.
- Husgafvel-Pursiainen K. 2004. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat. Res.*, 567: 427-445.
- Inanc F., M. Kilinc, G. Kiran, A. Guven, E.B. Kurutas, I.G. Cikim, O. Akyol. 2005. Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery: *Fetal Diagn. Ther.*, 20: 450-453.
- IARC. 2004. International Agency for Research on cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- Jägerstad M., K. Skog. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat. Res.*, 574: 156-172.
- Jakszyn P., C.A. Gonzalez. 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol.*, 12: 4296-303.

- Jansson T., T.L. Powell. 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin. Sci.*, 113: 1-13.
- Jauniaux E., B. Gulbis. 2000. *In vivo* investigation of placental transfer early in human pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 92: 45-49.
- Jensen C.D., G. Block, P. Buffler, X. Ma, S. Selvin, S. Month. 2004. Maternal dietary risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia (United States). *Cancer Cause Control*, 15: 559-570.
- Jones K.L., D.W. Smith. 1975. The fetal alcohol syndrome. *Teratology*, 12: 1-10.
- Kakiuchi Y., Y. Kohda, M. Miyabe, Y. Momose. 1999. Effect of plasma alpha1-acid glycoprotein concentration on the accumulation of lidocaine metabolites during continuous epidural anesthesia in infants and children: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 37: 493-498.
- Kannan S., D.P. Misra, J.T. Dvornch, A. Krishnakumar. 2006. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition. *Environ. Health Perspect.*, 114: 1636-1642.
- Kannan S., E. Menotti, H.K. Scherer, J. Dickinson, K. Larson. 2007. Folic acid and the prevention of neural tube defects: A survey of awareness among Latina women of childbearing age residing in southeast Michigan. *Health Promot. Pract.*, 8: 60-68.
- Kant A.K. 2010. Dietary patterns: biomarkers and chronic disease risk. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 35: 199-206.
- Kant A.K., A.Schatzkin. 1999. Relation of age and self-reported chronic medical condition status with dietary nutrient intake in the US population. *J. Am. Coll. Nutr.*, 18: 69-76.

- Kasai H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 387: 147-163.
- Kassie F., W. Parzefall, S. Knasmüller. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 463: 13-31.
- Kaufmann P. 1985. Influence of ischemia and artificial perfusion on placental ultrastructure and morphometry. *Contrib. Gynecol. Obstet.*, 13: 18-26.
- Kazeto Y., A.R. Place, J.M. Trant. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of *CYP19* genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat. Toxicol.*, 69: 25-34.
- Keating G.A., D.W. Layton, J.S. Felton. 1999. Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat. Res.*, 443: 149-156.
- Keshava C., R.L. Divi, D.L. Whipkey, B.L. Frye, E. McCanlies, M. Kuo, *et al.* 2005. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 and formation of carcinogen-DNA adducts in normal human mammary epithelial cells treated with benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.*, 221: 213-224.
- Keys A. 1980. Wine, garlic and CHD in seven countries. *Lancet*, 19: 145-146.
- Kim A.S., D.A. Eastmond, R.J. Preston. 2006. Childhood acute lymphocytic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures. *Mutat. Res.*, 613: 138-160.
- King J.C. 2006. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu. Rev. Nutr.*, 26: 271-291.
- Klaude M., S. Eriksson, J. Nygren, G. Ahnström. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 363: 89-96.

- Knottnerus J.A., L.R. Delgado, P.G. Knipschild, G.G. Essed, F. Smits, 1990, Haematologic parameters and pregnancy outcome. A prospective cohort study in the third trimester. *J. Clin. Epidemiol.*, 43: 461-466.
- Knudsen L.E., A.M. Hansen, 2007, Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 210: 461-470.
- Knudsen V.K., I.M. Orozova-Bekkevold, T.B. Mikkelsen, S. Wolff, S.F. Olsen. 2008. Major dietary patterns in pregnancy and fetal growth. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 62: 463-470.
- Kolahdooz F., T.I. Ibiebele, J.C. van der Pols, P.M. Webb. 2009. Dietary patterns and ovarian cancer risk: *Am. J. Clin. Nutr.*, 89: 297-304.
- Kramer W.B., G. Saade, C.N. Ou, C. Rognerud, K. Dorman, M. Mayes, K.J. Moise. 1995. Placental transfer of sulindac and its active sulfide metabolite in humans. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172: 886-890.
- Kruszewski M., I. Szumiel. 1994. DNA damage induced by hydrogen peroxide treatment at 4 degrees C and 37 degrees C in murine lymphoma L5178Y sublines. *Acta Biochim. Pol.*, 41: 120-121.
- Kubota Y., R.A. Nash, A. Klungland, P. Schär, D. Barnes, T. Lindahl. 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *EMBO J.*, 15: 6662-6670.
- Kwan M.L., G. Block, S. Selvin, S. Month, P.A. Buffler. 2004. Food consumption by children and the risk of childhood acute leukemia. *Am. J. Epidemiol.*, 160: 1098-1107.
- Kyllerman M., M. Aronson, K.G. Sabel, E. Karlberg, B. Sandin, R. Olegård. 1985. Children of alcoholic mothers. Growth and motor performance compared to matched controls. *Acta Paediatr. Scand.*, 74: 20-26.

- Lagiou P., L. Mucci, R. Tamimi, C.C. Hsieh, D. Trichopoulos. 2005. Micronutrient intake during pregnancy in relation to birth size. *Eur. J. Nutr.*, 44: 52–59.
- Lam T.H., C.Q. Zhu, C.Q. Jiang. 2002. Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat. Res.*, 515: 147-157.
- Lazutka J.R., V. Dedonyte, D. Krapavickaite. 1994. Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat. Res.*, 306: 173-180.
- Lee H.C., M.L. Lim, C.Y. Lu, V.W. Liu, H.J. Fahn, C. Zhang, P. Nagley, *et al.* 1999. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging-smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 362: 309-316.
- Lee K.W., H.J. Lee, Y.J. Surh, C.Y. Lee. 2003. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78: 1074-1078.
- Leeds L., I. Hargreaves. 2008. The psychological consequences of childbirth. *J. of Reprod. Infant Psychol.*, 26: 108–122.
- Lillycrop K.A., E.S. Phillips, A.A. Jackson, M.A. Hanson, G.C. Burdge. 2005. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J. Nutr.*, 135: 1382-1386.
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715.
- Liu C.Y., Y.H. Hsu, M.T. Wu, P.C. Pan, C.K. Ho, L. Su, X. Xu, *et al.* 2009. Cured meat, vegetables, and bean-curd foods in relation to childhood acute leukemia risk: a population based case-control study. *BMC Cancer*, 13: 9-15
- Loft S., H. E. Poulsen. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, 74: 297-312.

- Loft S., D.P. Hogg, L. Mikkelsen, L. Risom, L. Forchhammer, P. Moller. 2008. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem. Soc. Trans.*, 36: 1071-1076.
- Lorenzo Y., A. Azqueta, L. Luna, F. Bonilla, G. Dominguez, A.R. Collins. 2009. The carotenoid beta-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis*, 30: 308-314.
- Lurie S.J., B. Gawinski, D. Pierce, S.J. Rousseau. 2006. Seasonal affective disorder. *American Family Physician*, 74: 1521–1524.
- Ma Y.Y., H.W. Guo. 2008. Mini-review of studies on the carcinogenicity of deoxynivalenol. *Iron Toxicol. Pharmacol.*, 25: 1-9.
- Magee P.N., Barnes J.M. 1956. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer*, 10: 114-122.
- Magee P.N., J.M. Barnes. 1967. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.*, 10: 163-246.
- Magnusson A., 2000. An overview of epidemiological studies on seasonal affective disorder. *Acta Psychiatr. Scand.*, 101: 176–184.
- Mahata J., M. Chaki, P. Ghosh, L.K. Das, K. Baidya, K. Ray, A.T. Natarajan, *et al.* 2004. Chromosomal aberrations in arsenic-exposed human populations: a review with special reference to a comprehensive study in West Bengal, India. *Cyto. Genet. Genome Res.*, 104: 359-364.
- Mardones-Santander D.F., D.P. Rosso, D. Uiterwaal, D.G. Marshall. 1999. Nutritional interventions to prevent intrauterine growth retardation: evidence from randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53: 970-972.
- Marsin S., A.E. Vidal, M. Sossou, J. Ménissier-de Murcia, F. Le Page, S. Boiteux, G. de Murcia, *et al.* 2003. Role of *XRCC1* in the coordination and

- stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase *hOGG1*. *J. Biol. Chem.*, 278: 44068-44074.
- Martin J.A. 2011. Preterm births - United States 2007. *MMWR. Surveill. Summ.*, 60: 78-79.
 - Martínez-González M.A., C. De la Fuente-Arrillaga, J.M. Nunez-Córdoba, F.J. Basterra-Gortari, J.J. Beunza, Z. Vázquez, S. Benito, *et al.* 2008. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ*, 336: 1348-1351.
 - Mathiesen L., T. Mose, T.J. Morck, J.K. Nielsen, L.K. Nielsen, L.L. Maroun, M.H. Dziegiel, *et al.* 2010. Quality assessment of a placental perfusion protocol: *Reprod. Toxicol.*, 30: 138-146.
 - Mayne, S. 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarker of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.*, 133: 933-940.
 - McHugh P.J., V.J. Spanswick, J.A. Hartley. 2001. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol.*, 2: 483-490.
 - McNamee J.P., J.R. McLean, C.L. Ferrarotto, P.V. Bellier. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat. Res.*, 466: 63-69.
 - Menzi C.A., B.B. Potock, J. Santodonato. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 1278-1283.
 - Mihailović M., M. Cvetković, A. Ljubić, M. Kosanović, S. Nedeljković, I. Jovanović, O. Pesut. 2000. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol. Trace Elem. Res.*, 73: 47-54.
 - Mikkelsen T.B., M.L. Osterdal, V.K. Knudsen, M. Haugen, H.M. Meltzer, L. Bakketeig, S.F. Olsen. 2008. Association between a Mediterranean-type diet

- and risk of preterm birth among Danish women: a prospective cohort study. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 87: 325–330.
- Mizoue T., S. Tokunaga, H. Kasai, K. Kawai, M. Sato, T. Kubo. 2007. Body mass index and oxidative DNA damage: a longitudinal study. *Cancer Sci.*, 98: 1254-1258.
 - Mohorovic L. 2003. The level of maternal methemoglobin during pregnancy in an air-polluted environment. *Environ. Health Perspect.*, 111: 1902-1905.
 - Mohorovic L. 2004. First two months of pregnancy--critical time for preterm delivery and low birthweight caused by adverse effects of coal combustion toxics. *Early. Hum. Dev.*, 80: 115-123.
 - Møller P. 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 96: 1-42.
 - Møller P. 2006. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat. Res.*, 612: 84-104.
 - Møller P., L.E. Knudsen, S. Loft, H. Wallin. 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.*, 9: 1005-1015.
 - Möller L., T. Hofer, M. Zeisig. 1998. Methodological considerations and factors affecting 8-hydroxy-2-deoxyguanosine analysis. *Free Radic. Res.*, 29: 511-524.
 - Mongelli M., C.C. Wang, W. Wang, C.C. Pang, M.S. Rogers. 1997. Oxygen free radical activity in the second stage of labor. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 76: 765-768.
 - Montesano R., J. Hall. 2001. Environmental causes of human cancers. *Eur. J. Cancer*, 37: 567-587.
 - Moore K., T.V.N. Persaud. 2007. *Embriología Clínica*. Elsevier, 7ª Edición.

- Moriya M. 1993. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 1122-1126.
- Mottier P., V. Parisod, R.J. Tursky. 2000. Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1160-1166.
- Mucci L.A., F. Granath, S. Cnattingius. 2004. Maternal smoking and childhood leukemia and lymphoma risk among 1,440,542 Swedish children. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.*, 13: 1528-1533.
- Murtaugh M.A., J.S. Herrick, C. Sweeney, K.B. Baumgartner, A.R. Guiliano, T. Byers, M. L. Slattery. 2007. Diet composition and risk of overweight and obesity in women living in the southwestern United States. *J. Am. Diet. Assoc.*, 107: 1311-1321.
- Myatt L. 2006. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.*, 572: 25-30.
- Nakabeppu Y. 2001. Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 68: 75-94.
- Norman M.A., E.A. Holly, S. Preston-Martin. 1996. Childhood brain tumors and exposure to tobacco smoke. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, 5: 85-91.
- O'Brien P.J, B.F. Hales, P.D. Josephy, A. Castonguay, Y. Yamazoe, F.P. Guengerich. 1996. Chemical carcinogenesis, mutagenesis, and teratogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 74: 565-571.
- Olde E., O. van der Hart, R. Kleber, M. van Son. 2006. Posttraumatic stress following childbirth: a review. *Clin. Psychol. Rev.*, 26: 1-16.

- Olive P.L., J.P. Banáth, R.E. Durand. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.*, 22: 86-94.
- Omarini D., M.M. Barzago, J. Aramayona, A. Bortolotti, G. Lucchini, M. Bonati. 1992. Theophylline transfer across human placental cotyledon during *in vitro* dual perfusion. *J. Med.*, 23: 101-116.
- OMS. 2006. Índice de Masa Corporal en Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.
- Orjuela M.A, X. Liu, D. Warburton, A.L. Siebert, C. Cujar, D. Tang, V. Jobanputra, F.P. Perera. 2010. Prenatal PAH exposure is associated with chromosome-specific aberrations in cord blood. *Mutat. Res.*, 703: 108-114.
- Östling O., K.J. Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.
- Ostro B., R. Broadwin, S. Green, W.Y.Lipsett. 2006. Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ. Health. Perspect.*, 114: 29-33.
- Pacifici G.M., R. Nottoli. 1995. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin. Pharmacokinet.*, 28: 235-269.
- Palli D., P. Vineis, A. Russo, F. Berrino, V. Krogh, G. Masala, A. Munnia, *et al.*, 2000. Diet, metabolic polymorphisms and DNA adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. *Int. J. Cancer*, 87: 444-451.
- Panthangi V., P. West, R.T. Savoy-Moore, M. Geeta, E. Reickert. 2009. Is seasonal variation another risk factor for postpartum depression? *J. Am. Board Fam. Med.*, 22: 492-497.
- Pedersen M., J. Wichmann, H. Autrup, D.A. Dang, I. Decordier, M. Hvidberg, R. Bossi, *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.
- Pedersen M., T.I. Halldorsson, L. Mathiesen, T. Mose, A. Brouwer, M. Hedegaard, S. Loft, *et al.* 2010, Dioxin-like exposures and effects on estrogenic and androgenic exposures and micronuclei frequency in mother-newborn pairs. *Environ. Int.*, 36: 344-351.
 - Peluso M., L. Airoidi, A. Munnia, A. Colombi, F. Veglia, H. Autrup, A. Dunning, *et al.* 2008. Bulky DNA adducts, 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts and diet in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) prospective study. *Br. J. Nutr.*, 100: 489-495.
 - Perera F.P. 2000. Molecular epidemiology: on the path to prevention?. *J. Natl. Cancer Inst.*, 19: 602-612.
 - Perera F.P. 2011. Cancer: the big questions to address in coming years. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.*, 20: 571-573.
 - Perera F.P., R.M. Whyatt, W. Jedrychowski, V. Rauh, D. Manchester, R.M. Santella, R. Ottman. 1998. Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am J Epidemiol.*, 147: 309-314.
 - Perera F.P., W. Jedrychowski, V. Rauh, R.M. Whyatt. 1999. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect.* 107: 451-460.
 - Perera F.P., V. Rauh, R.M. Whyatt, D. Tang, W.Y. Tsai, J.T. Bernert, Y.H. Tu, *et al.* 2005. A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. *Neurotoxicology*, 26: 573-587.
 - Perera F.P., V. Rauh, R.M. Whyatt, W.Y. Tsai, D. Tang, D. Diaz, L. Hoepner, *et al.* 2006. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic

- hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ. Health Perspect.*, 114: 1287-1292.
- Pfau W., F.L. Martin, K.J. Cole, S. Venitt, D.H. Phillips, P.L. Grover, H. Marquardt. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20: 545-51.
 - Pienimäki P. 1996. Pharmacokinetics of carbamazepine and oxcarbazepine with special reference to placental transfer and metabolism. *Acta Univ. Oul. D.*, 396.
 - Pienimäki P., S. Fuchs, J. Isojarvi, K. Vahakangas. 1995a. Improved detection and determination of carbamazepine and oxcarbazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 673: 97-105.
 - Pienimäki P., A.L. Hartikainen, P. Arvela, T. Partanen, R. Herva, O. Pelkonen, K. Vähäkangas. 1995b. Carbamazepine and its metabolites in human perfused placenta and in maternal and cord blood. *Epilepsia*, 36: 241-248.
 - Pienimäki P., E. Lampela, J. Hakkola, P. Arvela, H. Raunio, K. Vähäkangas. 1997. Pharmacokinetics of oxcarbazepine and carbamazepine in human placenta. *Epilepsia*, 38: 309- 316.
 - Piperakis S.M., E.E. Visvardis, M. Sagnou, A.M. Tassiou. 1998. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 19: 695-698.
 - Pitarque M., A. Vaglenov, M. Nosko, A. Hirvonen, H. Norppa, A. Creus, R. Marcos. 1999. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat. Res.*, 441: 115-127.
 - Pluth J.M., M.J. Ramsey, J.D. Tucker. 2000. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat. Res.*, 465: 101-111.

- Polanska K., W. Hanke, J. Gromadzinska, D. Ligocka, E. Gulczynska, W. Sobala, W. Wasowicz. 2009. Polish mother and child cohort study-defining the problem, the aim of the study and methodological assumption. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 22: 383-391.
- Pons G. 1991. Parasympatholytic agents. Principles and rules of usage. *Rev. Prat.*, 41: 2801-2804.
- Pool-Zobel B.L., N. Lotzmann, M. Knoll, F. Kuchenmeister, R. Lambertz, U. Leucht, H.G. Schröder, P. Schmezer. 1994. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ. Mol. Mutagen*, 24: 23-45.
- Pool-Zobel B.L, A. Bub, H. Müller, I. Wollowski, G. Rechkemmer. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18: 1847-1850.
- Popkin B.M. 2007. The world is fat. *Sci. Am.*, 297: 88-95.
- Raijmakers M.T., E.M. Roes, E.A. Steegers, B. van der Wildt, W.H. Peters. 2003. Umbilical glutathione levels are higher after vaginal birth than after cesarean section. *J. Perinat. Med.*, 31: 520-522.
- Rauh V.A., R.M. Whyatt, R. Garfinkel, H. Andrews, L. Hoepner, A. Reyes, *et al.* 2004. Developmental effects of exposure to environmental tobacco smoke and material hardship among innercity children. *J. Neurotoxicol. Teratol.*, 26: 373-385.
- Rekhadevi P.V., M. Mahboob, M.F. Rahman, P. Grover. 2009. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis*, 24: 59-65.
- Reynolds F., C. Knott. 1989. Pharmacokinetics in pregnancy and placental drug transfer: *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, 11: 389-449.
- Reynolds P., J. Von Behren, E.P. Elkin. 2002. Birth characteristics and leukemia in young children. *Am. J. Epidemiol.*, 155: 603-613.

- Richards M., R. Hardy, D. Kuh, M.E. Wadsworth. 2002. Birthweight, postnatal growth and cognitive function in a national UK birth cohort. *Int. J. Epidemiol.*, 31: 342-348.
- Ringler G.E., J.F. Strauss 3rd. 1990. *In vitro* systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr. Rev.*, 11: 105-123.
- Risom L., P. Moller, S. Loft. 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.*, 592: 119-137.
- Robison L.L., J.D. Buckley, A.E. Daigle, R. Wells, D. Benjamin, D.C. Arthur, G.D. Hammond. 1989. Maternal drug use and risk of childhood nonlymphoblastic leukemia among offspring. An epidemiologic investigation implicating marijuana (a report from the Childrens Cancer Study Group). *Cancer*, 63: 1904-1911.
- Roffo A.H. 1931. Tobacco and Bladder Cancer. *Bol. Inst. Med. Exper. para Estud. Trat. Cancer*, 8: 273-324.
- Rombaldi F., C. Cassini, M. Salvador, J. Saffi, B. Erdtmann. 2009. Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis*, 24: 143-148.
- Salam M.T., J. Millstein, Y.F. Li, F.W. Lurmann, H.G. Margolis, F.D. Gilliland. 2005. Birth outcomes and prenatal exposure to ozone, carbon monoxide, and particulate matter: results from the Children's Health Study. *Environ. Health Perspect.*, 113: 1638-1644.
- Sanaei-Zadeh H., N. Zamani, S. Shadnia. 2011. Outcomes of visual disturbances after methanol poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila)*, 49: 102-107.
- Sardas S., B. Karahalil, D. Akyol, S. Kukner, A.E. Karakaya. 1995. The effect of smoking on sister chromatid exchange rate of newborn infants born to smoking mothers. *Mutat. Res.*, 341: 249-253.
- Sastry B.V.R. 1999. Techniques to study human placental transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38: 17-39.

- Saul R.L., B.N. Ames. 1986. Background levels of DNA damage in the population. *Basic Life Sci.*, 38: 529-535.
- Schabath M.B, H.B. Grossman, G.L. Delclos, L.M. Hernandez, R.S. Day, B.R. Davis, S.P. Lerner, *et al.* 2004. Dietary carotenoids and genetic instability modify bladder cancer risk. *J. Nutr.* 134: 3362-3369.
- Schothorst R.C., H.P. van Egmond. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states". Subtask: trichothecenes. *Toxicol. Lett.*, 153: 133-143.
- Schmitt W. 1922. Untersuchungen zur physiologie der Porentargefäße. *Z Biol.* 75: 19-78.
- Schwartz J. 2001. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ. Health Perspect.*, 109 (Suppl 3): 405-409.
- Sepai O., C. Collier, B. Van Tongelen, L. Casteleyn. 2008. Human biomonitoring data interpretation and ethics; obstacles or surmountable challenges? *Environ. Health*, 7: 13.
- Sexton M., N.L. Fox, J.R. Hebel. 1990. Prenatal exposure to tobacco: II. Effects on cognitive functioning at age three. *Int. J. Epidemiol.*, 19: 72-77.
- Sexton K., L. Needham, J. Pirkle 2004. Human biomonitoring of environmental chemicals: measuring chemicals in human tissues is the "gold standard" for assessing exposure to pollution. *Am. Sci.*, 92: 38-42.
- Shannon T.A. 1998. Remaking ourselves? The ethics of stem-cell research. *Commonweal*, 125: 9-10.
- Shaposhnikov S., A. Azqueta, S. Henriksson, S. Meier, I. Gaivão, N.H. Huskisson, A. Smart, *et al.* 2010. Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent *in situ* hybridisation. *Toxicol. Lett.*, 195: 31-34.

- Shu H., D. Paustenbach, F.J. Murray, L. Marple, B. Brunck, D.D. Rossi, P. Teitelbaum. 1988. Bioavailability of soil-bound TCDD: Oral bioavailability in the rat. *Fund. Appl. Toxicol.*, 10: 648–654.
- Shu X.O., D. Han, R.K. Severson, Z. Chen, J.P. Neglia, G.H. Reaman, J.D. Buckley, *et al.* 2002. Birth characteristics, maternal reproductive history, hormone use during pregnancy and risk of childhood acute lymphocytic leukemia by immunophenotype (United States). *Cancer Cause Control*, 13: 15-25.
- Silbergeld E.K., D.L. Davis. 1994. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin. Chem.*, 40: 1363-1367.
- Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 175: 184-191.
- Singh N.P., D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brant, E.L. Schneider. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 237: 123-130.
- Singh N.P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslink and apoptosis. *Mutat. Res.*, 455: 111-127.
- Slattery M.L., K.M. Boucher, B.J. Caan, J.D. Potter, K.N. Ma. 1998. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 148: 4-16.
- Slattery M.L., R.K. Wolff, J.S. Herrick, K. Curtin, B.J. Caan, W. Samowitz. 2010. Alcohol consumption and rectal tumor mutations and epigenetic changes. *Dis. Colon Rectum*, 53: 1182-1189.
- Slikker W.Jr., R.K. Miller. 1994. Placental metabolism and transfer. Role in developmental toxicology. En: *Developmental Toxicology*. Raven Press, pp 245-283.

- Slupphaug G., B. Kavli, H.E. Krokan. 2003. The interacting pathway for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mut. Res.*, 531: 231-251.
- Smart D.J., J.K. Chipman, N.J. Hodges. 2006. Activity of *OGG1* variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *DNA Repair (Amst)*, 5: 1337-1345.
- Sobrova P., V. Adam, A. Vasatkova, M. Beklova, L. Zeman, R. Kizek. 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip. Toxicol.*, 3: 94-99.
- Somorovska M., E. Szabová, P. Vodicka, J. Tulinská, M. Barancoková, R. Fábry, A. Lísková, *et al.* 1999. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat. Res.*, 445: 181-192.
- Sood B., V. Aney-Black, C. Covington, B. Nordstrom-Klee, J. Ager, T. Templin, J. Janisse, *et al.* 2001. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years: I. dose-response effect. *Pediatrics*, 108: 134.
- Srám R.J., B. Binková. 2000. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. *Environ. Health Perspect.*, 108: 57-70.
- Stein P.T, Scholl TO, Schluter MD, Leskiw MJ, Chen X, Spur BW, Rodriguez A. 2008. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic. Res.*, 42: 841-848.
- Stein B., J.C. Anderson, R. Rajapakse, Z.A. Alpern, C.R. Messina, G. Walker. 2010. Body mass index as a predictor of colorectal neoplasia in ethnically diverse screening population. *Dig. Dis. Sci.*, 55: 2945-2952.
- St-Pierre M.V., B. Hagenbuch, B. Ugele, P. J. Meier, T. Stallmach. 2002. Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 1856-1863.

- Stumpe-Vīksna, I., V. Bartkevičs, A. Kukāre, A. Morozovs. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry*, 110: 794-797.
- Tang D., T.Y. Li, J.J. Liu, Y.H. Chen, L. Qu, F. Perera. 2006. PAH-DNA adducts in cord blood and fetal and child development in a Chinese cohort. *Environ. Health. Perspect.*, 114: 1297-1300.
- Tapio S., B. Grosche. 2006. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat. Res.*, 612: 215-246.
- Terasaka S., Y. Aita, A. Inoue, S. Hayashi, M. Nishigaki, K. Aoyagi, H. Sasaki, *et al.* 2004. Using a customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. *J. Med. Chem.*, 47: 2728-2731.
- Terry P., F.B. Hu, H. Hansen, A. Wolk. 2001. Prospective study of major dietary patterns and colorectal cancer risk in women. *Am. J. Epidemiol.*, 154: 1143-1149.
- Thompson J.R., P.F. Gerald, M.L. Willoughby, B.K. Armstrong. 2001. Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. *Lancet*, 358: 1935-1940.
- Tice R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, *et al.* 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221.
- Tita A.T., Landon, M.B. Spong, C.Y. Lai, Y. Leveno, K.J. Varner, M.W. Moawad, A.H. *et al.* 2009. EuniceKennedy Shriver NICHD Maternal-FetalMedicine Units Network. Timing of elective repeat cesarean delivery at term and neonatal outcomes. *New England Journal of Medicine*. 360: 111–120.
- Tompsett S.L., A.B. Anderson. 1935. The lead content of human tissues and excreta. *Biochem J.* 29: 1851-1864.

- Topinka J., B. Binkova, G. Mrackova, Z. Stavkova, I. Benes, J. Dejmek, J. Lenicek, R.J. Sram. 1997. DNA adducts in human placenta as related to air pollution and to *GSTM1* genotype. *Mutat. Res.*, 390: 59-68.
- Torbergesen A.C., A.R. Collins. 2000. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur. J. Nutr.*, 39: 80-85.
- Trichopoulou A., C. Bamia, P. Lagiou, D. Trichopoulos. 2010. Conformity to traditional Mediterranean diet and breast cancer risk in the Greek EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, 92: 620-625.
- Tucker K.L. 2010. Dietary patterns, approaches, and multicultural perspective. *Appl. Physiol Nutr. Metab.*, 35: 211-218.
- Vakilian K., A. Ranjbar, A. Zarganjfard, M. Mortazavi, S. Vosough-Ghanbari, S. Mashaiee, M. Abdollahi. 2009. On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. *Toxicol. Mech. Methods.*, 19: 94-99.
- Vanden Heuvel J.P., G.C. Clark, C.L. Thompson, Z. McCoy, C.R. Miller, G.W. Lucier, D.A. Bell. 1993. *CYP1A1* mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure *CYP1A1* expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, 14: 2003-2006.
- Vanhaecke L., N. Van Hoof, W. Van Brabant, B. Soenen, A. Heyerick, N. De Kimpe, D. De Keukeleire, *et al.* 2006. Metabolism of the food-associated carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human intestinal microbiota. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3454-3461.
- Vardavas C.I., L. Chatzi, E. Patelarou, E. Plana, K. Sarri, A. Kafatos, A.D. Koutis, M. Kogevinas. 2010. Smoking and smoking cessation during early pregnancy and its effect on adverse pregnancy outcomes and fetal growth. *Eur. J. Pediatr.*, 169: 741-748.

- Veglia F., S. Loft, G. Matullo, M. Peluso, A. Munnia, F. Perera, D.H. Phillips, *et al.* 2008. DNA adducts and cancer risk in prospective studies: a pooled analysis and a meta-analysis. *Carcinogenesis*, 29: 932-936.
- Verdoux H., A.L. Sutter, E. Glatigny-Dallay, A. Minisini. 2002. Obstetrical complications and the development of postpartum depressive symptoms: a prospective survey of the MATQUID cohort. *Acta Psychiatr. Scand.*, 106: 212-219.
- Vidal A.E, S. Boiteux, I.D. Hickson, J.P. Radicella. 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.*, 20: 6530-6539.
- Vineis P. 2004. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene*, 23: 6477-6483.
- Vineis P., F. Perera. 2007. Molecular epidemiology and biomarkers in etiologic cancer research: the new in light of the old. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.*, 16: 1954-1965.
- Vodicka P., M. Koskinen, R. Stetina, P. Soucek, L. Vodickova, Z. Matousu, M. Kuricova, K. Hemminki. 2003. The role of various biomarkers in the evaluation of styrene genotoxicity. *Cancer Detect. Prev.*, 27: 275-284.
- Vodicka P., R. Kumar, R. Stetina, L. Musak , P. Soucek, V. Haufroid, M. Sasiadek, *et al.* 2004, Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant. *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 283-292.
- Walker C.H. 1998. The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40: 65-70.
- Walsh S.W. 1994. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypertens. Pregnancy*, 13: 1-31.

- Wang T.S., J.M. Links, J.D. Groopman. 2001. Molecular epidemiology and biomarkers. En: Genetic Toxicology and Cancer. WN Choy (Ed). New Jersey, Marcel Dekker, Inc: 271-298.
- Wasowicz W., J. Gromadzińska, K. Szram, K. Rydzyński, P. Wolkanin, *et al.* 2000. Relationship between trace elements, activities of antioxidant enzymes in maternal and umbilical cord blood in Poland. Trace Elements in Man and Animals, Edition 10. pp 369–372.
- WCRF/AICR. 2007. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research Washington DC.
- Wei Q., H. Shen, L.E. Wang, C.M. Duphorne, P.C. Pillow, Z. Guo, Y. Qiao, *et al.* 2003. Association between low dietary folate intake and suboptimal cellular DNA repair capacity. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 12: 963-969.
- Weisel C.P., W.K. Jo, P.J. Liroy. 1992. Utilization of breath analysis for exposure and dose estimates of chloroform. J. Expo. Anal Environ. Epidemiol., (Suppl 1): 55-70.
- Wen W., X.O. Shu, J.D. Potter, R.K. Severson, J.D. Buckley, G.H. Reaman, L.L. Robison. 2002. Parental medication use and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer, 95: 1786-1794.
- White T., S. Matthey, K. Boyd, B. Barnett. 2006. Postnatal depression and posttraumatic stress after childbirth: prevalence, course and co-occurrence. J. Reprod. Infant Psychol., 24: 107–120.
- Whyatt R.M., F.P. Perera. 1995. Application of biologic markers to studies of environmental risks in children and the developing fetus. Environ. Health Perspect., 103: 105–110.
- Whyatt R.M., R. Garfinkel , L.A. Hoepner , D. Holmes , M. Borjas, M.K. Williams , A. Reyes *et al.* 2007. Within- and between-home variability in

- indoor-air insecticide levels during pregnancy among an inner-city cohort from New York City. *Environ. Health Perspect.*, 115: 383-389.
- Wiemels J.L., R.N. Smith, G.M. Taylor, O.B. Eden, F.E. Alexander, M.F. Greaves. 2001. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 4004-4009.
 - Wilffert B., J. Altena, L. Tijink, M.M. van Gelder, L.T. de Jong-van den Berg. 2011. Pharmacogenetics of drug-induced birth defects: what is known so far?. *Pharmacogenomics*, 12: 547-558.
 - Wilhelm M., J. Hardt, C. Schulz, J. Angerer. 2008. New reference value and the background exposure for the PAH metabolites 1-hydroxypyrene and 1- and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 211: 447-453.
 - Wilson K.M., K. Balter, H.O. Adami, H. Gronberg, A.C. Vikstrom, B. Paulsson, M. Tornqvist, *et al.* 2009. Acrylamide exposure measured by food frequency questionnaire and hemoglobin adduct levels and prostate cancer risk in the Cancer of the Prostate in Sweden Study. *Int. J. Cancer*, 124: 2384-2390.
 - Windham G.C., A. Eaton, B. Hopkins. 1999. Evidence for an association between environmental tobacco smoke exposure and birthweight: a meta-analysis and new data. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, 13: 35-57.
 - Wojewodzka M., M. Kruszewski, T. Iwanenko, A.R. Collins, I. Szumiel. 1999. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay. *Mutat. Res.*, 440: 19-25.
 - Wong H.L., S.E. Murphy, S.S. Hecht. 2003. Preferential metabolic activation of nitrosopiperidine as compared to its structural homologue N-nitrosopyrrolidine by rat mucosal microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, 16: 1298-1305.

- Wynne P., C. Newton, J.A. Ledermann , A. Olaitan , T.A. Mould , J.A. Hartley. 2007. Enhanced repair of DNA interstrand crosslinking in ovarian cancer cells from patients following treatment with platinum-based chemotherapy. *Br. J. Cancer*, 97: 927-933.
- Yang S.N., L.J. Shen, T. Ping, Y.C. Wang, C.W. Chien. 2011. The delivery mode and seasonal variation are associated with the development of postpartum depression. *J. Affect. Disord.*, 132: 158–164.
- Yant W.P., H.H. Schrenk, R.R. Sayers, A.A. Howarth, W.A. Reinhart. 1936. Urine sulfate determination as a measure of benzene exposure. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 18: 69.
- Yu R., C.P. Weisel. 1996. Measurement of the urinary benzene metabolite trans, trans-muconic acid from benzene exposure in humans. *J. Toxicol. Environ. Health*, 48: 453-477.
- Zenzes M.T., L.A. Puy, R. Bielecki, T.E. Reed. 1999. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 5: 125-131.
- Zhang D., P. Li, Y. Yang, Q. Zhang, W. Zhang, Xiao Z, Ding X. 2011. A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B1. *Talanta*, 85: 736-742.
- Zhang H., M.R. Spitz, G.E. Tomlinson, M.B. Schabath, J.D. Minna, X. Wu. 2002. Modification of lung cancer susceptibility by green tea extract as measured by the comet assay. *Cancer Detect. Prev.*, 26: 411-418.
- Zhang X., L. Jiang, C. Geng, J. Cao, L. Zhong. 2009. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol.*, 54: 513-518.

.



CUESTIONARIOS INFANCIA Y MEDIO AMBIENTE COHORTE NEWGENERIS



R. HISTORIA REPRODUCTIVA

RP. HISTORIA OBSTÉTRICA PREVIA

RP1. ¿Cuántos embarazos en total, a parte del actual, ha tenido Ud.?

RP1

RP2. ¿Aproximadamente cuál era su peso antes de su actual embarazo?

Kg

SI LA RESPUESTA ES **NINGUNO** PASAR A LA PREGUNTA RAC1

RA6

RP3. Talla en cm (medirla): cm

RA7

M. ANTECEDENTES MEDICOS

MC. ENFERMEDADES CRÓNICAS DE LA MADRE

MC1. ¿Algún médico le ha diagnosticado alguna de las siguientes enfermedades?

Enfermedades	Sí	No	Edad al diagnóstico	
a. Diabetes (sin relación con los embarazos)	1	2		MC1a <input type="text"/> <input type="text"/>
b. Enfermedades cardíacas	1	2		MC1b <input type="text"/> <input type="text"/>
c. Alteraciones de la coagulación sanguínea	1	2		MC1c <input type="text"/> <input type="text"/>
d. Enfermedades renales y suprarrenales	1	2		MC1d <input type="text"/> <input type="text"/>
e. Alteraciones de la glándula tiroides	1	2		MC1e <input type="text"/> <input type="text"/>
f. Tuberculosis	1	2		MC1f <input type="text"/> <input type="text"/>
g. Infección por VIH	1	2		MC1g <input type="text"/> <input type="text"/>
h. Ansiedad	1	2		MC1h <input type="text"/> <input type="text"/>
i. Depresión	1	2		MC1i <input type="text"/> <input type="text"/>
j. Afección del tracto urinario	1	2		MC1j <input type="text"/> <input type="text"/>
k. Enfermedad intestinal inflamatoria crónica	1	2		MC1k <input type="text"/> <input type="text"/>
l. Tumores del aparato reproductor	1	2		MC1l <input type="text"/> <input type="text"/>
m. Asma alérgico	1	2		MC1n <input type="text"/> <input type="text"/>
n. Dermatitis atópica	1	2		MC1o <input type="text"/> <input type="text"/>
o. Eccema	1	2		MC1p <input type="text"/> <input type="text"/>
p. Rinitis alérgica	1	2		MC1q <input type="text"/> <input type="text"/>
q. Otras, especificar	1	2		MC1r <input type="text"/> <input type="text"/>

F. CONSUMO DE FARMACOS

F1. ¿Ha tomado alguna medicación (de forma esporádica o habitual) desde un mes antes de quedarse embarazada y durante el presente embarazo?.

NOTA: INCLUIR los tratamientos adquiridos en herboristerías y/o automedicación, así como pomadas tales como cremas de corticoides. NO INCLUIR suplementos vitamínicos o minerales.

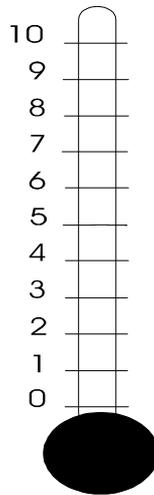
Nombre del medicamento	Motivo/Enfermedad	Fecha inicio	Fecha fin	Frecuencia	Posología	Comentarios	¿Quién se lo prescribió?
Por ejemplo. Efferegan	Dolor muscular						
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				

CUESTIONARIO EXPOSICION AMBIENTAL

1. ¿Hasta que punto le molesta la contaminación atmosférica del exterior de su vivienda si deja la ventana abierta (nos referimos a gases, humos, polvo etc procedente del tráfico, la industria etc.)?

1

Molestia insoportable



Ninguna molestia

L. LIMPIEZA

L1. ¿Utiliza alguno de los siguientes productos de limpieza en su casa?

	Sí	No	Ns/Nc	
a. Lejía	1	2	9	35a <input type="text"/>
b. Amoniaco	1	2	9	35b <input type="text"/>
c. Salfumán	1	2	9	35c <input type="text"/>
d. Disolventes quitamanchas	1	2	9	35d <input type="text"/>
e. Limpiamuebles	1	2	9	35e <input type="text"/>
f. Limpiacristales	1	2	9	35f <input type="text"/>
g. Spray para alfombras, mantas o cortinas	1	2	9	35g <input type="text"/>
h. Spray para la mopa del suelo	1	2	9	35h <input type="text"/>
i. Spray para el horno	1	2	9	35i <input type="text"/>
j. Ambientadores	1	2	9	35j <input type="text"/>
k. Spray para planchar	1	2	9	35k <input type="text"/>
l. Productos de limpieza perfumados	1	2	9	35l <input type="text"/>
m. Productos líquidos multiusos para limpiar	1	2	9	35m <input type="text"/>
n. Naftalina u otros antipolillas	1	2	9	35n <input type="text"/>
o. Otros productos de limpieza ¿Cuál/es?.....	1	2	9	35o <input type="text"/>

L2. ¿Utiliza algún producto de limpieza con acción antibacteriana?

1. Sí (especificar)
2. No

Nombre	Motivo	Frecuencia

36

L3. ¿Utiliza insecticidas o productos para ahuyentar mosquitos, cucarachas, hormigas, etc. en su casa?

- 1 Sí
- 2 No

SI LA RESPUESTA ES **NO** PASAR A LA PREGUNTA 40

39.

L3.1. ¿Qué tipo de insecticida utiliza (puede señalar más de uno) y con qué frecuencia?

	Frecuencia	1. Dormitorio madre	2. Resto de la casa
a. Sprays insecticidas	1 Todo el año	1	1
	2 De manera estacional	2	2
	3 Esporádicamente	3	3
	4 Nunca	4	4
b. Dispositivo químico de enchufe (pastilla, líquido,...)	1 Todo el año	1	1
	2 De manera estacional	2	2
	3 Esporádicamente	3	3
	4 Nunca	4	4
c. Loción repelente	1 Todo el año	1	1
	2 De manera estacional	2	2
	3 Esporádicamente	3	3
	4 Nunca	4	4
d. Otros	1 Todo el año	1	1
	2 De manera estacional	2	2
	3 Esporádicamente	3	3
	4 Nunca	4	4

39aa1 39aa2

39ab1 39ab2

39ac1 39ac2

39ad1 39ad2

39b

L3.2. ¿Recuerda los nombres comerciales de los productos que utiliza más frecuentemente?

- 1. Sí
- 2. No

L.3.3.

39b1.....

T. TABACO

T1. ¿Ha fumado a lo largo de su vida?

- 1 Sí
- 2 No

T1.1. ¿Cuál de las siguientes formas describe mejor su consumo de tabaco?

- 1 Fuma diariamente
- 2 Fuma pero no diariamente
- 3 No fuma aunque antes fumaba diariamente
- 4 No fuma aunque antes fumaba pero no diariamente

PASAR A LA PREGUNTA T2

T2. Fuma en la actualidad:

T2.1. Número de cigarrillos habituales: **cig/semana**

T2.2. ¿A qué edad empezó a fumar? **años**

T2.3. ¿Ha cambiado el consumo de tabaco debido al embarazo?

- 1 Sí
- 2 No

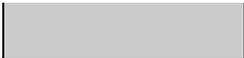
T3. ¿Cuándo cambió?

- 1 Antes de quedar embarazada
- 2 Durante el embarazo. Indique el mes de embarazo en el que cambió:

T4. ¿Cuánto fumaba antes? **cig/semana**

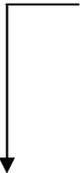
SI LA RESPUESTA ES **NO** PASAR A LA PREGUNTA T6

- 6 Más de 6 vasos por día
- 9 No sabe



V3. ¿Cuál es el origen principal del agua que bebe en su residencia durante el embarazo? (indicar un solo origen, el que usted considere más frecuente)

- 1 Agua municipal
- 2 Pozo privado
- 3 Agua embotellada
- 4 Otro origen (especificar) _____
- 9 No sabe



57a. Si el origen del agua que bebe es agua municipal ¿Utiliza algún tipo de filtro?

- 1 Sí → Indicar tipo: _____
- 2 No

V4. ¿Cuál es el origen principal del agua que utiliza para cocinar en su casa durante el embarazo? (indicar un solo origen, el que usted considere más frecuente)

- 1 Agua municipal
- 2 Pozo privado
- 3 Agua embotellada
- 4 Otro origen (especificar) _____
- 9 No sabe

V4.1a. Si el origen del agua que usa para cocinar es agua municipal ¿Utiliza algún tipo de filtro?

- 1 Sí → Indicar tipo: _____
- 2 No

V5. ¿Cómo se asea habitualmente durante el embarazo?

- 1 Ducha
- 2 Baño
- 3 Ambos
- 4 Otro (especificar) _____

V6. Durante el embarazo, ¿se suele bañar en la piscina?

- 1 Sí
- 2 No

V6.1 ¿Es una piscina pública?

- 1 Sí (especificar nombre) _____
- 2 No

V6.1. ¿Con qué frecuencia se baña en la piscina durante el embarazo?

57

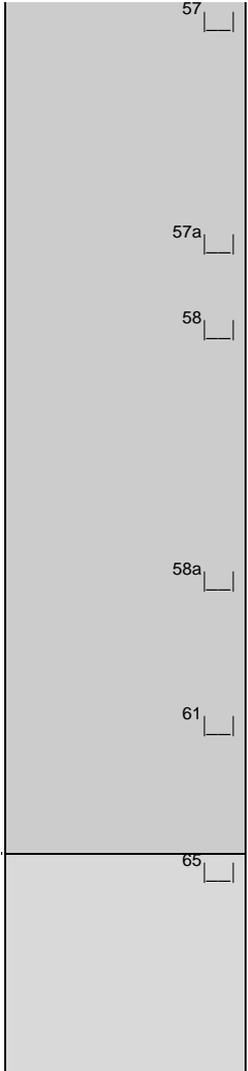
57a

58

58a

61

65



Pegar aquí etiqueta de
identificación



Cuestionario de Frecuencia Alimentaria

(CFA / new)

Estimada Sra., esta parte de la encuesta es para conocer la dieta que ha seguido durante todo su embarazo. Con ello tratamos de averiguar el papel que juega la dieta en relación al desarrollo de su embarazo y su futuro hijo. Sus respuestas serán muy útiles, y por ello, le rogamos preste su máxima atención y colaboración.

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA N° 2

IDNUM | | | | |

Para cada alimento, señalar cuantas veces como media ha tomado la cantidad que se indica durante el embarazo. Debe tener en cuenta el consumo del alimento solo y cuando lo añade a otro alimento o plato. Por ejemplo, en el caso del huevo, considere cuando lo toma solo (Ej. frito) y cuando lo toma añadido o mezclado con otros platos. Si ha comido una tortilla de 2 huevos cada 2 días, deberá marcar "1 por día". No debe considerar huevo de productos de bollería o dulces.

I. LACTEOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+
1. Leche entera (1 vaso o taza, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
2. Leche semi-desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
3. Leche desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
4. Leche condensada (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
5. Nata o crema de leche (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
6. Yogur entero (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
7. Yogur desnatado (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
8. Requesón, queso blanco o fresco (una porción o ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
9. Queso curado, semi-curado, o cremoso (un trozo, 50 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
10. Natillas, flan, puding (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
11. Helados (1 cucurucho, vasito o bola)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+
12. Huevos de gallina (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
13. Pollo CON piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
14. Pollo/pavo SIN piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
15. Carne de ternera, cerdo, cordero como plato principal (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
<i>A-casi nunca, B-alguna vez, C-mitad, D-mayor parte, E-casi siempre F-otra (especificar)</i>									
15a. % carne de ternera: A B C D E F _____									
15b. % carne de cerdo A B C D E F _____									
15c. % carne de cordero A B C D E F _____									
16. Carne de caza: conejo, codorniz, pato (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
17. Hígado de ternera, cerdo, pollo (1 plato, ración o pieza mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
18. Vísceras: callos, sesos, mollejas (1 ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19. Embutidos: jamón, (1 ración de unos 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19a. % jamon cocido (de york o similar): A B C D E F(especificar) _____									
19b. % jamon ahumado/curado: A B C D E F(especificar) _____									
20. Salchichas y similares (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
20a. % seco/semi-seco curado (ej. salami, salchichón, fuet) : A B C D E F(especificar)									
20b. % cocidos (p.ej mortadela) : A B C D E F(especificar) _____									
20c. % frescos/no curados (p.ej. butifarra) : A B C D E F(especificar) _____									
20d. % Frankfurt/hot dog: A B C D E F(especificar) _____									
21. Patés, foie-gras (media ración, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
22a. Hamburguesas/albondigas de cerdo/mixto (una mediana/3-4, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
22b. Hamburguesas/albondigas de ternera (una mediana/3-4, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
23. Tocino, beicon, panceta (2 tiras o lonchas, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
25. Pescado BLANCO (fresco/cong): merluza, lenguado, dorada (plato o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
26. Pescado AZUL (fresco/cong >grasa): atún, bonito, salmón, caballa, salmonete, arenque	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
27. OTROS pescados AZULES (fresco/congelado <grasa): ej. emperador, sardinas, boquerón/ anchoas	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
28. Una lata pequeña de conserva de atún o bonito en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
29. Una lata pequeña de conserva de sardinas o caballa en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
30. Pescados en salazón y/o ahumados: anchoas, bacalao, salmón (media ración, 50g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
31. Almejas, mejillones, ostras (1 ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
32. Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo (1 ración o plato, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
33. Marisco: gambas, cangrejo, langostino, langosta (1 ración 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

No olvidar marcar todas las casillas

IIA. PLATOS MEZCLADOS DE CARNE O PESCADO	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
92. Croquetas de pollo, jamón (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
93. Croquetas, palitos o delicias de pescado fritos (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
103. Bocadillos de shawarma, doner o similar	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
104. Otros platos preparados (p.ej. canelones, pizzas, lasañas/ pasteles de carne, lasañas/pasteles de verduras, lasañas/pasteles de atún) (especificar) _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

IIB. COCCION DE CARNES, PESCADO	¿Con qué frecuencia come las carnes cocinados de las siguientes maneras?					¿Cómo toma normalmente de hecho las carnes respecto a las fotos? [marcar 1: < menos, = igual, > más vs. foto]		
	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de veces	La mayor parte del tiempo	Siempre	Foto A	Foto B	Foto C
Pollo CON piel						< = >	< = >	< = >
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤			
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤			
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤			
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤			
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤			
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤			
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤			
Pollo/pavo SIN piel						< = >	< = >	< = >
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤			
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤			
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤			
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤			
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤			
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤			
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤			
Carne de ternera (bistek etc)						< = >	< = >	< = >
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤			
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤			
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤			
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤			
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤			
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤			
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤			
Carne de cerdo (chuletas etc)						< = >	< = >	< = >
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤			
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤			
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤			
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤			
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤			
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤			
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤			
Carne de cordero (chuletas etc)						< = >	< = >	< = >
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤			
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤			
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤			
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤			
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤			
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤			
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤			

No olvidar marcar todas las casillas

IIB. COCCION DE CARNES, PESCADO	¿Con qué frecuencia come las carnes cocinados de las siguientes maneras?					¿Cómo toma normalmente de hecho las siguientes carnes o el pescado?			
	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de veces	La mayor parte del tiempo	Siempre	Poco hecho	Medio hecho	Hecho	Muy hecho/ quemado
Salchichas frescas									
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤				
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤				
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤				
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤				
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤				
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤				
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤				
Hamburguesas									
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤				
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤				
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤				
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤				
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤				
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤				
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤				
Pescado fresco/congelado AZUL									
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤				
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤				
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤				
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤				
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤				
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤				
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤				
Pescado fresco/congelado BLANCO									
i. A la plancha o sartén	①	②	③	④	⑤				
ii. Frito (en mucho aceite)	①	②	③	④	⑤				
iii. Rebozado, empanado o enharinado y frito	①	②	③	④	⑤				
iv. Al horno o al ast/asado	①	②	③	④	⑤				
v. A la brasa/parilla/barbacoa (contacto con fuego)	①	②	③	④	⑤				
vi. Guisado/estofado, hervido, cocido	①	②	③	④	⑤				
vii. Otro (especificar) _____	①	②	③	④	⑤				
¿Después de cocinar la carne, suele usar los restos/el líquido en el sartén para preparar salsas?	① Nunca o < de una vez al mes	② Una vez al mes	③ 2-3 veces al mes	④ 1 vez a la semana	⑤ 2+ veces a la semana	⑥ Ns/Nc			
¿Cómo de frecuente come lo tostado o quemado de la <u>carne</u> ?	① Nunca o < de una vez al mes	② Una vez al mes	③ 2-3 veces al mes	④ 1 vez a la semana	⑤ 2+ veces a la semana	⑥ Ns/Nc			
¿Cómo de frecuente come la parte tostada del <u>pescado</u> ?	① Nunca o < de una vez al mes	② Una vez al mes	③ 2-3 veces al mes	④ 1 vez a la semana	⑤ 2+ veces a la semana	⑥ Ns/Nc			
¿Qué hace Vd. con la grasa visible, cuando come carne?	① La quita toda.	② Quita mayoría.	③ Quita un poco.	④ No quita nada	⑤ Ns/Nc				

No olvidar marcar todas las casillas

III. VERDURAS, LEGUMBRES.	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
34. Espinacas o acelgas cocinadas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
35. Col, coliflor, brócolis cocinadas (1 plato mediano)?	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
36. Lechuga, endibias, escarola (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
37. Tomate (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
38. Cebolla (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
39. Zanahoria, calabaza (una o plato pequeño)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
40. Judías verdes cocinadas (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
41. Berenjenas, calabacines, pepinos (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
42. Pimientos (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
43. Alcachofas (una ración o plato mediano, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
44. Espárragos (una ración o plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
45. Maíz hervido (plato o lata pequeña, 82 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
91. Sopa o puré de verduras (un plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
46. Legumbres: lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas, habas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
46a. Otra verdura (especificar) (p.ej. nabos, remolacha, guisantes, col rojo, puerros)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

IV. FRUTAS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
47. Naranjas, mandarinas (Una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
48. Zumo de naranja natural (un vaso pequeño, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
48b. Zumo de otra fruta natural (un vaso pequeño, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
49. Plátano (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
50a. Manzana (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
50b. Pera (una mediana) : 4mcg vs 12 mcg	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
51. Melocotón, nectarina, albaricoque (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
52. Sandía, melón (1 tajada o cala, mediana)?	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
53. Uvas (un racimo mediano o plato de postre)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
54. Prunas, ciruelas frescas/secas (una, 37 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55. Kiwi (una unidad)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55a. Otra fruta fresca (p.ej. limon, pomelo, aguacate) (especificar) _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55b. Otra fruta fresca en temporada (p. ej. piña, cereza, mango, chirimoya, kaki, frambuesa, fresa, higo, papaya) (especificar) _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55c. Frutas en almíbar (melocotón, piña)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
56. Aceitunas (un platito o tapa de unas 15 unidades pequeñas)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
57. Frutos secos: almendras, cacahuets, piñones, avellanas (1 platito o bolsita, 30g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

V. PAN, CEREALES Y SIMILARES	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
58. Pan blanco (Una pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde, 60 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
59. Pan integral (Pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
<i>A-casi nunca, B-alguna vez, C-mitad, D-mayor parte, E-casi siempre F-otra (espec)</i>									
59a. Con que frecuencia se come tostada el pan? A B C D E F(espec) _____									
59b. Suele quitar el quemado del pan? Si No									
59c. Tostadas o similares	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
60. Cereales desayuno (30 g en seco)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
60b. % cereales desayuno integrales: A B C D E F(especificar) _____									
60c. Marca habitual de cereales de desayuno (especificar): _____									
61. Patatas fritas (1 ración o plato, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
62. Patatas cocidas, asadas (1 patata mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
62b. Platos preparados de patatas con mahonesa o salsas (ensalada rusa o parecidos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
64. Arroz cocinado (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
65. Pastas: espaguetis, fideos, macarrones y similares (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
66. Pizza (1 porción o ración, 200 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

No olvidar marcar todas las casillas

VI. ACEITES Y GRASAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
67. Aceite de oliva añadido en la mesa a ensalada, pan y a platos (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
68. Otros aceites vegetales (idem): girasol, maíz, soja (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
69. Margarina añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
70. Mantequilla añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VII. DULCES, APERTIVOS Y MISCELANEAS

- GALLETAS Y BOLLERIA, SALSAS Y ESPECIES, AZUCARES, SNACKS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
71. Galletas tipo María (1 galleta) <i>A-casi nunca, B-alguna vez, C-mitad, D-mayor parte, E-casi siempre F-otra (espec)</i>	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
71b. % galletas integrales: A B C D E F(especificar) _____									
72. Galletas con chocolate (1 galleta doble)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
73. Bollería: croissant, donut, magdalena, bizcocho, tarta o similar (uno o porción)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
74. Chocolate, bombones y similares (1 barrita o 2 bombones)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
75. Chocolate en polvo, cola-cajo y similares (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
94. Mayonesa (1 cucharada) <i>94b. Suele comer mayonesa "light"? Si ____ No ____</i>	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
95. Salsa de tomate (media taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
96. Ketchup ó catchup (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
97. Sal añadida a los platos en la mesa (1 pizca del salero o pellizco con dos dedos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
98. Ajo (1 diente)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
99. Mermeladas, miel (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
100. Azúcar (ej. en el café, postres, etc.) (1 cucharadita)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
63. Bolsa de patatas fritas (1 bolsa pequeña, 25-30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
63b. Palomitas (1 bolsa pequeña, 25-30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

¿Consume algún otro alimento regularmente al menos una vez a la semana?

105 _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
106 _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VIII. BEBIDAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
76. Vino tinto (1 vaso, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
77. Vino blanco o rosado (1 vaso, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
78. Jerez, vinos secos, vermú (copa, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
79. Cerveza (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
80. Cerveza sin alcohol (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
81. Licores (20-25°): de frutas (manzana), de crema (Catalana, Bayleys) (1 copa, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
82. Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka, aguardientes 40° (1 copa, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
83. Refrescos normales de cola, naranja, limón (ej. coca-cola, fanta) (Uno, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
84. Refrescos sin azúcar cola, naranja, limón (ej. coca-cola o pepsí light) (Uno, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
85. Agua del grifo (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
86. Agua embotellada sin gas (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
87. Agua embotellada con gas (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
88. Zumos de frutas envasado (1 vaso o envase de 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
102. Leche de soja, arroz o almendras	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
89. Café normal (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
90. Café descafeinado (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101a. Té normal (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101b. Té descafeinado (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101c. Té verde (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101d. Infusiones (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101e. Bebidas de cereales o sucedaneos de café (ej. EKO)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

¿Toma Vd. algún otra bebida regularmente al menos una vez a la semana?

107 _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

No olvidar marcar todas las casillas

Consumo de suplementos vitamínicos o minerales. Referido al tiempo del embarazo. ¿Ha tomado suplementos de vitaminas o minerales?...

	Marca y presentación	Dosis semanal (comp/sem)	Fecha inicio (mes/año)	¿Sigue tomándolo?	Si no, fecha de finalización
a. Sal yodada	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
b. Leche con vit A+D	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
c. Leche rica en Calcio	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
d. Fibra/supl ricos en fibra	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
e. Multivitaminas	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
f. Acido fólico	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
g. Complejo A + E	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
h. Vitamina A	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
i. Vitamina E	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
j. Vitamina C	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
i. Hierro	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
j. Calcio	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
l. Complejo B	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
m. Zinc	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
n. Yodo	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___
o. Otros Suplementos	-----	-----	___/___/___	① Si ② No	___/___/___

Restaurantes

¿Con que frecuencia habitualmente come las siguientes comidas en restaurantes?

Ej. Si suele comer la comida en restaurantes normales cada día de lunes a viernes, indicar 5 veces a la semana. Si suele comer un snack diariamente en un restaurante tipo fast food, indicar 1 vez al día.

	Restaurante "normal"		Restaurante "fast food"	
	# veces al día	# veces a la semana	# veces al día	# veces a la semana
Desayuno				
Comida/almuerzo				
Snacks (media mañana o media tarde)				
Cena				

REGIMENES ESPECIALES

1. ¿Ha seguido usted algún tipo de dieta durante el embarazo?

(Si responde NO pasar a pregunta 3)

① No ② Sí ③ No sabe/No contesta

2. ¿Podría indicar el motivo de seguir esta dieta? Puede marcar más de una respuesta

- ① para controlar su peso
- ② porque tiene colesterol
- ③ porque tiene azúcar o diabetes
- ④ porque tiene problemas de estómago
- ⑤ porque tiene problemas de vesícula o hígado
- ⑥ porque tiene problemas de tensión alta o de corazón
- ⑦ porque tiene problemas de riñón
- ⑧ porque tiene alergia a algunos alimentos
- ⑨ porque tiene ácido úrico o gota
- ⑩ porque es vegetariana
- ⑪ por otro motivo, ¿cual? -----

ACTIVIDAD FISICA Y EJERCICIO durante el embarazo

1. ¿Podría indicarme Vd. Cuántas horas al día suele dormir, incluida la siesta?

_____ horas

2. ¿Cuántos minutos de siesta suele dormir al día?

_____ min.

3. ¿Cuántas horas ve usted la televisión, a la semana? (ajustar al número entero más cercano)

_____ horas

4. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a usar el ordenador o leer?

- ① Menos de 1 hora al día
- ② 1 hora / día
- ③ 2 horas / día
- ④ 3 horas / día
- ⑤ 4 horas / día
- ⑥ 5-6 horas / día
- ⑦ Más de 6 horas / día

5. En en el trabajo u ocupación principal está...

- ① Casi siempre sentado
- ② Sentado la mitad del tiempo
- ③ Casi siempre de pie, quieto
- ④ Casi siempre caminando, levantando y llevando pocas cosas
- ⑤ Casi siempre caminando, levantando y llevando muchas cosas
- ⑥ Trabajo manual pesado

6a. ¿Cuánto tiempo suele caminar al la semana?

- ① Casi nunca
- ② Menos de 1/2 hora
- ③ Entre 1/2 hora y 1 hora
- ④ Entre 1-2 horas (≈10-20 minutos al día)
- ⑤ Entre 2-4 horas (≈20-35 minutos al día)
- ⑥ Entre 4-7 horas (≈35-60 minutos al día)
- ⑦ Más de 7 horas (>60 minutos al día)

6b. ¿Cuánto tiempo hace bicicleta al la semana?

- ① Casi nunca
- ② Menos de 1/2 hora
- ③ Entre 1/2 hora y 1 hora
- ④ Entre 1-2 horas (≈10-20 minutos al día)
- ⑤ Entre 2-4 horas (≈20-35 minutos al día)
- ⑥ Entre 4-7 horas (≈35-60 minutos al día)
- ⑦ Más de 7 horas (>60 minutos al día)

7a. ¿Cuánto tiempo dedica a actividades o tareas ligeras en casa (p ej hacer la cama, lavar ropa, planchar, cocinar)?

- ① Menos de 1 hora al día
- ② 1-2 horas / día
- ③ 3-4 horas / día
- ④ 5-6 horas / día
- ⑤ 7-8 horas / día
- ⑥ Más de 8 horas / día

7b. ¿Cuánto tiempo dedica a actividades o tareas mas pesadas en casa (p ej limpiar suelos, fregar cristales)?

- ① Casi nunca
- ② Menos de 1/2 hora al día
- ③ 1/2 - 1 horas / día
- ④ 1-2 horas / día
- ⑤ 3-4 horas / día
- ⑥ Más de 4 horas / día

7c. ¿Cuánto tiempo dedica a jugar activamente con otros niños al día?

- ① Casi nunca
- ② Menos de 1/2 hora al día
- ③ 1/2 - 1 horas / día
- ④ 1-2 horas / día
- ⑤ 3-4 horas / día
- ⑥ Más de 4 horas / día

8a. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a hacer ejercicio o deporte?

- ① Menos de 1 hora a la semana
- ② 1 hora / semana
- ③ 2 horas / semana
- ④ 3 horas / semana
- ⑤ 4-5 horas / semana
- ⑥ Más de 5 horas / semana

8b. ¿Cuales son los tipos de actividades mas habituales? (se puede indicar más que uno)

- ① Footing o correr
- ② Yoga
- ③ Danza
- ④ Natacion
- ⑤ Caminar o healthwalking
- ⑥ Ejercicios prenatales
- ⑦ Otra (especificar) _____

9. Considerando toda su actividad física (trabajo u ocupación principal, hogar y tiempo libre), ¿cómo se considera Vd.?

- ① **Sedentaria** (sentado casi siempre, sin actividad física, sin deporte, bajo cuidados).
- ② **Poco activa** (profesiones o actividades sentadas, amas de casa con electrodomésticos, escaso deporte).
- ③ **Moderadamente activa** (trabajos manuales, amas de casa sin electrodomésticos, deporte ligero, etc)
- ④ **Bastante activa** (trabajos o actividades de pie-andando, deporte intenso, etc.).
- ⑤ **Muy activa** (Trabajo muy vigoroso, deporte fuerte diario)
- ⑥ No sabe / no contesta

10. Antes de quedar embarazada, ¿cuánto tiempo dedicaba a hacer ejercicio o deporte?

- ① Menos de 1 hora a la semana
- ② 1 hora / semana
- ③ 2 horas / semana
- ④ 3 horas / semana
- ⑤ 4-5 horas / semana
- ⑥ Más de 5 horas / semana

COMPRESIÓN:

1. Nivel estimado de comprensión del cuestionario:

- 1. Excelente
- 2. Buena
- 3. Regular
- 4. Mala

2. ¿Quién responde a las preguntas referidas al marido o compañero?

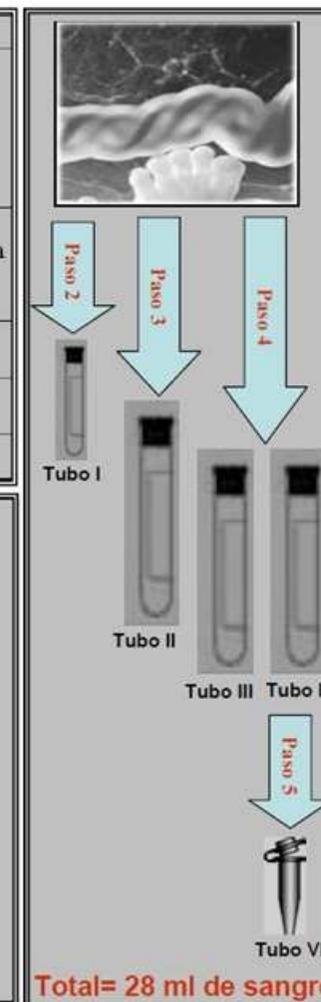
- 1. El mismo
- 2. La mujer
- 3. Otros.....

COMENTARIOS DEL ENTREVISTADOR

--	--

NewGeneris Sampling-II
 Protocolo para la extracción de muestras de sangre de cordón umbilical.
 Hospital del Mar, Barcelona

Tubos	I	II	III	IV	VI
					
Características del tubo	Tubo de 4ml de heparina de litio líquida + 0.5ml heparina Leo (5000U/ml)	Tubos de 10 ml de heparina de litio líquida			Microtubo de polipropileno con 1.2 ml de RNAlater
Cantidad de sangre	1ml	8ml	9ml	10ml - 0.4ml	0.4ml
Condiciones de almacenamiento	TA envuelto en papel de plata	TA	4°C	4°C	4°C
Paso	2	3	4	4-5	5



Paso 1

Etiquetar cada uno de los tubos con el código de la muestra proporcionado por la UAB (NGCB10X)

Paso 2

Extraer 1ml de sangre y depositar en tubo I. Mezclar por inversión.

Paso 3

Extraer 8ml de sangre y depositar en el tubo II. Mezclar por inversión.

Paso 4

Extraer 19ml de sangre repartidos en los dos tubos de 10 ml restantes (Tubos III y IV). Mezclar por inversión.

Paso 5

Extraer 0.4ml de sangre desde el tubo IV y depositar en el microtubo VI. Mezclar por inversión con la solución RNAlater

Paso 6

Almacenamiento y transporte

- Tubo I: envuelto en papel de plata y a temperatura ambiente (TA)
- Tubo II: Temperatura ambiente
- Tubos III, IV y VI: 4°C

NewGeneris Sampling-II

Protocolo para la extracción de muestras de sangre materna.

Hospital del Mar, Barcelona

Tubos	I	II	III	IV	V	VI
						
Características del tubo	Tubo de 4ml de heparina de litio líquida + 0.5ml heparina Leo (5000U/ml)	Tubos de 10 ml de heparina de litio líquida				Microtubo de polipropileno con 1.2 ml de RNAlater
Cantidad de sangre	1ml	8ml	9ml	10ml	10ml-0.4ml	0.4ml
Condiciones de almacenamiento	TA envuelto en papel de plata	TA	4°C	4°C	4°C	4°C
Paso	2	3	4	4	4-5	5

Paso 1

Etiquetar cada uno de los tubos con el código de la muestra proporcionado por la UAB (NGMB10X)

Paso 2

Extraer 1ml de sangre y depositar en tubo I. Mezclar por inversión.

Paso 3

Extraer 8ml de sangre y depositar en el tubo II. Mezclar por inversión.

Paso 4

Extraer 29ml de sangre repartidos en los tres tubos de 10 ml restantes (Tubos III, IV y V). Mezclar por inversión.

Paso 5

Extraer 0.4ml de sangre desde el tubo V y depositar en el microtubo VI. Mezclar por inversión con la solución RNAlater

Paso 6

Almacenamiento y transporte

- Tubo I: envuelto en papel de plata y a temperatura ambiente (TA)
- Tubo II: Temperatura ambiente
- Tubos III, IV, V y VI: 4°C

